



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

*Bases moleculares en la interacción del
bloqueador TTA-A2 en el canal $Ca_v3.1$*

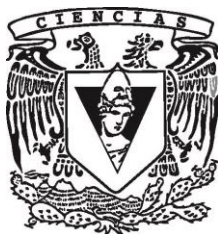
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Físico

P R E S E N T A:

EDUARDO CHÁVEZ COLORADO



DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

Cd. Universitaria, D. F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del Alumno
Eduardo
Chávez
Colorado
26 43 75 00
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Física
301059608
2. Datos del tutor
Dr.
Juan Carlos
Gómora
Martínez
3. Datos del sinodal 1
Dr.
Rubén
Santamaría
Ortiz
4. Datos del sinodal 2
Dr.
León David
Islas
Suárez
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Arturo
Picones
Medina
6. Datos del sinodal 4
Dr.
Edgar
Álvares
Zauco
7. Datos del trabajo escrito
Bases moleculares en la interacción del bloqueador TTA-A2 en el canal $Ca_v 3.1$
104 p
2015

Agradecimientos.

Gracias a mis padres, Juan Carlos Chávez Esquivel y Evelia Colorado Limias. La ética y los valores inculcados por ustedes, resultaron ser la herramienta más valiosa que puedo poseer como científico, y sin duda, como persona.

Al Dr. Juan Carlos Gómora por su amable asesoría, paciencia y por la confianza que tuvo hacia mi persona durante mi paso por su laboratorio. El apoyo, y la libertad que me otorgo para retar y probar mis ideas, me han convencido de que si tengo algo que aportar a la ciencia y de que estoy en el camino correcto.

Al los miembros del laboratorio, cuya compañía y convivencia hicieron que me sintiera como en un segundo hogar.

A la Dra. Zazil Herrera Carrillo por su apoyo en la preparación de muchos de los experimentos de electrofisiología de este trabajo.

Y a mis amigos. Ustedes saben que mi “anti-sistema” ser me impide ir mas halla de este enorme esfuerzo que estoy haciendo por cumplir con este formalismo. Para mi esta pagina es una molestia, ya que la gratitud no es algo que se escriba en un pedazo de papel y quede expuesto como vitrina para cualquiera que lo lea. La gratitud es algo que se demuestra, pero como de cualquier forma debo agradecer al CONACyT, pues de menos me tomo un tiempo para agradecer a las personas que me ayudaron a culminar el presente trabajo.

Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia Tecnologia (CB-2011/167790).

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES IÓNICOS EN LA EXCITABILIDAD ELÉCTRICA DE LAS CÉLULAS	3
1.2. CANALES DE CALCIO ACTIVADOS POR VOLTAJE	5
1.2.1. CLASIFICACIÓN	5
1.2.2. COMPOSICIÓN MOLECULAR Y ESTRUCTURA	9
1.2.3. CANALES DE CALCIO TIPO T	10
1.2.3.1. Estructura de canales de calcio tipo T	11
1.2.3.2. Propiedades biofísicas	13
Activación	13
Desactivación	15
Inactivación	15
1.2.3.3. Estudios estructura-función	16
1.2.3.4. Farmacología	18
1.2.3.5. Caracterización del efecto farmacológico del TTA-A2 en los canales de calcio tipo T	20
1.3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
2.1. HIPÓTESIS	24
2.2. OBJETIVO GENERAL	24
2.3. OBJETIVOS PARTICULARES	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. CONSTRUCCIÓN DE LOS CANALES $Ca_v3.1$ MUTANTES	25
3.2. CULTIVOS CELULARES Y TRANSFECCIONES TRANSITORIAS	27
3.3. ELECTROFISIOLOGÍA	28
3.3.1. SOLUCIONES DE REGISTRO	28
3.3.2. PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS PARA EXPERIMENTOS DE ELECTROFISIOLOGÍA	28
3.3.3. PIPETAS DE REGISTRO	28
3.3.4. EXPERIMENTOS DE <i>PATCH CLAMP</i>	29
3.3.5. PROTOCOLOS DE VOLTAJE	31
3.3.6. ANÁLISIS DE DATOS	34
3.4. MODELADO POR HOMOLOGÍA DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL CANAL $Ca_v3.1$	35
3.5. SIMULACIONES DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR	35
3.5.1. SIMULACIONES DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR EN EL MODELO DEL CANAL $Ca_v3.1$ BASADO EN LA ESTRUCTURA DEL CANAL KCSA	36
3.5.2. SIMULACIONES DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR EN LOS NUEVOS MODELOS DEL CANAL $Ca_v3.1$	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38

4.1. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL TTA-A2 EN UN MODELO DEL DOMINIO DEL PORO DEL CANAL $Ca_v3.1$: SELECCIÓN Y CONSTRUCCIÓN DE MUTACIONES	38
4.2. PROPIEDADES BIOFÍSICAS DE LOS CANALES MUTANTES	41
4.2.1. DEPENDENCIA AL VOLTAJE DE LA ACTIVACIÓN	41
4.2.2. INACTIVACIÓN EN EL ESTADO ESTACIONARIO	46
4.2.3. CINÉTICA DE LAS CORRIENTES	48
4.3. EFECTO ANTAGONISTA DEL TTA-A2 EN LOS CANALES MUTANTES	51
4.4. MODELADO DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DEL CANAL $Ca_v3.1$	56
4.4.1 IDENTIFICACIÓN DE ESTRUCTURAS HOMÓLOGAS	57
4.4.2. MODELADO POR HOMOLOGÍA	59
4.4.3. ACOPLAMIENTO MOLECULAR DEL TTA-A2 EN MODELOS DEL CANAL $Ca_v3.1$ BASADOS EN LA ESTRUCTURA DE LOS CANALES Na_vAB Y Ca_vAB : PRIMERA APROXIMACIÓN	63
4.5. PERFIL DE BLOQUEO DEL TTA-A2 EN LOS CANALES MUTANTES Q1805A, Q1805R Y Q1805P	65
4.5.1. PROPIEDADES BIOFÍSICAS DE LAS MUTACIONES DEL CANAL $Ca_v3.1$ EN LA POSICIÓN Q1805	68
4.5.1.1. Dependencia al voltaje de la activación e inactivación	68
4.5.1.2. Cinética de las corrientes: activación, inactivación, desactivación y recuperación de la inactivación	72
4.6. DETERMINACIÓN DEL MODO DE UNIÓN DEL TTA-A2 EN EL CANAL $Ca_v3.1$	75
4.7. EFECTO DEL TTA-Q4 Y MIBEFRADIL EN ALGUNAS DE LAS MUTACIONES INTRODUCIDAS EN EL CANAL $Ca_v3.1$	83
4.8. MECANISMO DE BLOQUEO DEL TTA-A2 EN LOS CANALES Ca_v3 Y SU RELACIÓN CON EL MECANISMO DE BLOQUEO DE OTROS ANTAGONISTAS DE LOS CANALES DE CALCIO TIPO T	86
5. CONCLUSIONES	92
6. BIBLIOGRAFÍA	94

RESUMEN

Los canales de calcio tipo T (también llamados LVA o Ca_v3) son proteínas de membrana que se expresan en una gran diversidad de células excitables y no excitables, y son responsables de modular el flujo de iones calcio a través de la membrana celular en respuesta a cambios en el voltaje transmembranal. En particular, se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro y algunos tejidos periféricos. En el sistema nervioso central se encuentran abundantemente expresados en las regiones del tálamo y corteza cerebral, donde juegan un papel importante en la integración y el correcto accionar de la actividad neuronal. El correcto funcionamiento de la actividad tálamo-cortical es crítica para la generación de patrones normales en el ritmo de las actividades oscilatorias cerebrales y el mal funcionamiento de estas, conlleva a varios desordenes neurológicos como la epilepsia, dolor crónico, desordenes motrices e incluso depresión. Por ello, es de gran interés científico y clínico, el descubrimiento y caracterización de moléculas capaces de modular selectivamente la función de estos canales.

Recientemente los laboratorios de investigación Merck sintetizó una nueva serie de antagonistas altamente selectivos y potentes para los canales de calcio tipo T denominados TTAs (por sus siglas en ingles de *T-Type Antagonist*) entre los cuales se incluyen los compuestos TTA-A2, TTA-P2 y TTAQ4. A la fecha se desconocen las bases moleculares que inducen el acoplamiento de moduladores selectivos en los canales de calcio tipo T, y las propiedades físicas de estas regiones, las cuales son importantes en el funcionamiento del canal.

En el presente trabajo de tesis se realizan los primeros pasos en esta dirección. De manera experimental, se identifico a uno de los aminoácidos más importantes para el acoplamiento del TTA-A2 en el canal $Ca_v3.1$. Se demuestra además, que el TTA-A2 conserva el mismo sitio de unión en los tres miembros de la familia de los canales de calcio tipo T. A partir de estos resultados, se estableció un modelo probable del mecanismo de bloqueo empleado por el TTA-A2, y otros bloqueadores dependientes de estado “como el TTA-A2”, para inhibir la función de estos canales, el cual es consistente con la evidencia experimental reportada en este trabajo y la de otros grupos de investigación. Asimismo, se demuestra la importancia de los cambios conformacionales que algunos aminoácidos sufren cuando el canal se inactiva. Con lo que respecta a otros

bloqueadores de estos canales, se demuestra experimentalmente que el TTA-A2 no comparte el mismo sitio de unión con el TTA-Q4, pero los resultados indican de manera indirecta que el sitio de unión para el mibefradil se encuentra dentro un perímetro cercano al sitio de unión del TTA-A2.

El presente trabajo sienta las bases de futuras perspectivas sobre la posibilidad del diseño racional de fármacos basados en la estructura del sitio de unión del TTA-A2 e introduce la noción de prescripción de terapias basadas en el mecanismo de bloqueo empleado por el antagonista más adecuado, para el tratamiento de enfermedades que involucren a estos canales en su patofisiología, ya sea de forma directa o indirecta.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Participación de los canales iónicos en la excitabilidad eléctrica de las células

Las células regulan muchas de sus funciones esenciales, simplemente manteniendo las concentraciones iónicas en su citoplasma diferentes a las de su entorno extracelular. Tal diferencia, da origen a la formación de un gradiente químico y a un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática (V_m). Este gradiente electroquímico le provee a la célula de una fuente de energía intrínseca y de un mecanismo de comunicación, basado en la generación de señales eléctricas. Las células se pueden clasificar como células excitables o no excitables, en función de si emplean de alguna manera el potencial eléctrico en la membrana para la producción de señales eléctricas [1]. Las neuronas son el ejemplo arquetípico de células excitables especializadas en la generación de señales eléctricas, para el establecimiento de redes de comunicación complejas. El establecimiento y regulación de la diferencia en las concentraciones iónicas, es posible gracias a la presencia de proteínas insertadas en la membrana de las células, que se especializan en el transporte de iones y moléculas cargadas del interior al exterior de la célula y viceversa. Estas proteínas de membrana se pueden clasificar como transportadores activos, canales iónicos y co-transportadores, dependiendo del tipo de gasto energético empleado para llevar a cabo su función. Los transportadores de iones, conocidos también como bombas, permiten el paso de iones y otras moléculas en contra de su gradiente electroquímico empleando algún mecanismo dependiente de energía, como lo puede ser la hidrólisis de ATP. Por otro lado, los canales iónicos emplean a su favor el gradiente electroquímico para el transporte de iones, lo cual implica un transporte pasivo sin gasto energía.

La existencia de los canales iónicos comenzó a vislumbrarse gracias a los trabajos pioneros de Hodgkin y Huxley a principios de la década de los 1950s. Durante su análisis de la actividad eléctrica del axón de calamar gigante, establecieron que tanto los iones Na^+ y K^+ producen corrientes a través de la membrana, y que el flujo de estos ocurre en direcciones opuestas, siendo el Na^+ transportado al interior de la membrana y el K^+ hacia el exterior [2]. Esto sugirió la existencia de conductos por los cuales los iones podían permear la membrana plasmática, la cual por sí misma es impermeable al paso de moléculas cargadas. La naturaleza física y química de estos conductos no fue clara sino hasta 20 años después, cuando Hladky y Haydon [3]

reconstituyeron el polipéptido gramicidina A, una proteína dimérica selectiva a cationes, en un modelo de membrana lipídica, demostrando así la naturaleza fisicoquímica de estos conductos. Desde entonces, gracias al desarrollo y mejoramiento de técnicas para detectar y medir la actividad eléctrica de preparaciones celulares, junto con avances tecnológicos en la química de proteínas y farmacología, ha sido posible la identificación y caracterización de la enorme diversidad de canales iónicos que se conocen hoy en día.

Los canales iónicos son típicamente complejos formados por una o varias subunidades proteicas, idénticas u homologas, ensambladas con simetría axial, formando en el eje de simetría, un poro de conducción, el cual simula las condiciones de hidratación de los iones en su medio acuoso [1].

Con lo que respecta a su permeabilidad (conductancia), la tasa de flujo de iones a través de muchos canales iónicos excede los 10^6 ion s^{-1} , y en algunos casos llega a ser tan rápido como 10^7 ion s^{-1} , lo cual se aproxima al límite de flujo por difusión. Por ejemplo, la conductancia del canal de K^+ activado por Ca^{2+} (canal BK) permite el flujo de mas 3×10^7 ion s^{-1} [4], lo cual refleja la enorme selectividad que posee este canal por el K^+ sobre otros iones como el Ca^{2+} y el Na^+ .

El origen molecular del funcionamiento de los canales iónicos está relacionado con los cambios conformacionales que su estructura puede realizar en respuesta a un estímulo. Estos cambios incluyen estados estables o meta-estables tales como el estado cerrado, activado, desensibilizado, inactivado, etc. Cada canal iónico puede ser activado en respuesta a uno o varios estímulos en particular. Entre los posibles estímulos se encuentran, cambios en el voltaje de la membrana, la unión de un neurotransmisor, cambios en el pH, la deformación mecánica de la membrana, cambios en la temperatura, e incluso radiación electromagnética [4].

En células excitables, la activación de un canal iónico en respuesta a un estímulo, da lugar un cambio en el potencial eléctrico en una región localizada durante un tiempo determinado. Este cambio local en el potencial eléctrico de una célula, puede derivar en la apertura de otros canales iónicos, que al mismo tiempo, desplazan la despolarización en la membrana. A la propagación de esta diferencia de voltaje en la membrana se le conoce como potencial de acción. Los principales responsables en propagar los estímulos eléctricos a lo largo de la célula son la súper familia de canales iónicos activados por voltaje. Estos canales permiten la difusión de iones tales como el

Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^- de manera altamente selectiva, en respuesta a cambios en el potencial de la membrana. Un gran número de desordenes hereditarios en organismos vivos tienen su origen en mutaciones de genes que codifican a canales iónicos, usualmente conocidos como canalopatías. Los canales iónicos también son blancos de una amplia variedad de fármacos, entre los que se incluyen los anestésicos generales. En particular, esta tesis se centra en los canales de calcio tipo T, los cuales son parte de la familia de canales de calcio activados por voltaje y a continuación revisaremos algunas de sus características.

1.2. Canales de calcio activados por voltaje

Los canales de calcio activados por voltaje (canales Ca_V), permiten el flujo del ion Ca^{2+} al interior de la célula en respuesta a despolarizaciones en la membrana. Por otro lado, el Ca^{2+} intracelular es un segundo mensajero importante en diversos procesos fisiológicos [5], por lo que los canales Ca_V se convierten en transductores que acoplan cambios en el potencial de membrana en cambios transitorios en el Ca^{2+} intracelular, regulando de esta forma diversos procesos celulares.

En células cardíacas, de musculo liso y musculo esquelético, la activación de los canales Ca_V es responsable de iniciar las contracciones musculares [6-8], además de regular su duración e intensidad en respuesta a trenes de impulsos nerviosos de alta frecuencia [9-10]. En células endocrinas se encargan de mediar la entrada de calcio, lo cual inicia la secreción de hormonas [11]. En neuronas dan origen a la transmisión sináptica [12-14] y a los ritmos oscilatorios en células talamocorticales [15], entre otros efectos. Casi todos los tipos de células expresan, en mayor o menor medida, diferentes subtipos de canales Ca_V , y cada subtipo posee diferentes propiedades regulatorias, fisiológicas y farmacológicas. Estas propiedades han permitido distinguir y clasificar a nivel molecular a la familia de los canales Ca_V , así como comprender los papeles específicos que cada uno de ellos juegan en el correcto funcionamiento de un organismo.

1.2.1. Clasificación

Desde 1975 estudios electrofisiológicos identificaron la existencia de al menos dos tipos principales de canales Ca_V [16]. Aunque fue hasta los primeros años de la siguiente década, cuando diversos grupos de investigación de varias partes del mundo describieron las propiedades biofísicas y farmacológicas de estas dos variedades de canales de calcio en varias preparaciones biológicas [17-20]. El primer grupo de canales requiere de pequeñas despolarizaciones del

potencial de membrana (V_m), con respecto al potencial de reposo (10-20 mV) para ser activados, por lo que recibieron el nombre de canales de calcio de bajo umbral de activación o LVA (por sus siglas en ingles); mientras que el segundo grupo requiere de mayores despolarizaciones (más de 30 mV) con respecto al potencial de reposo, por lo que se les designó con el nombre de canales de calcio de alto umbral de activación o HVA (Figura 1).

Posteriormente, experimentos de electrofisiología combinados con el empleo de antagonistas de los canales de calcio (compuestos sintéticos, iones inorgánicos y toxinas), permitieron una clasificación más amplia de los canales LVA y HVA. Se observó que las corrientes iónicas generadas por algunos canales HVA eran bloqueadas por fármacos antihipertensivos, tales como las 1,4-dihidropiridinas [21], además estos canales expresaban corrientes de larga duración y una conductancia grande (de 24 pS), por lo que se les designó con el nombre de canales de corriente tipo L o simplemente canales tipo L. Mientras que a los LVA se les clasificó como canales tipo T, debido a su rápida inactivación (*transient*) y pequeña conductancia (*tiny*). Poco tiempo después, se encontró que los canales HVA incluían canales tipo L y no L. Estos últimos son responsables de la liberación de neurotransmisores de las vesículas asociadas a las terminales presinápticas. Empleando toxinas producidas por caracoles del género *Conus* [22], se logró identificar a los canales con corrientes tipo N, de la palabra en ingles (*neither*) ya que sus corrientes no eran ni grandes (*large*; por lo tanto no eran canales tipo L) ni pequeñas (*tiny*;; por lo que tampoco eran canales tipo T). De igual forma se distinguieron a las corrientes tipo P, de canales descritos por primera vez en las neuronas de Purkinje; y corrientes tipo Q, caracterizadas farmacológicamente en neuronas granulares del cerebelo [23]. Ambos canales son codificados por un solo gen con variantes de empalme (*splice variant*), lo que da lugar a dos canales con diferente sensibilidad a la toxina de araña ω -Aga-IVA [24] (Tabla 1). En las células granulares del cerebelo también se logró aislar una corriente residual de tipo no L, y no reconocida como N o P/Q, por lo que se le designó con el nombre de tipo R. Entonces los miembros de la familia HVA ampliaron su clasificación a canales tipo L, N, P/Q y R [25].

Mediante el empleo de técnicas bioquímicas relacionadas a la purificación de proteínas, se logró saber que los canales Ca_v , al menos los canales HVA (véase más adelante Sección 1.2.2.), están conformados por hasta cuatro subunidades proteicas, llamadas $\alpha 1$, $\alpha 2\delta 1$, β y γ [26-29]. A la

subunidad principal de estos canales se le designó $\alpha 1$, ya que en ella se encuentran las estructuras que forman el poro de conducción y las estructuras encargadas de detectar los cambios de voltaje en las membranas, además las subunidades $\alpha 1$ poseen la mayoría de sitios de reconocimiento involucrados en la regulación de estos canales por segundos mensajeros, fármacos y toxinas [25].

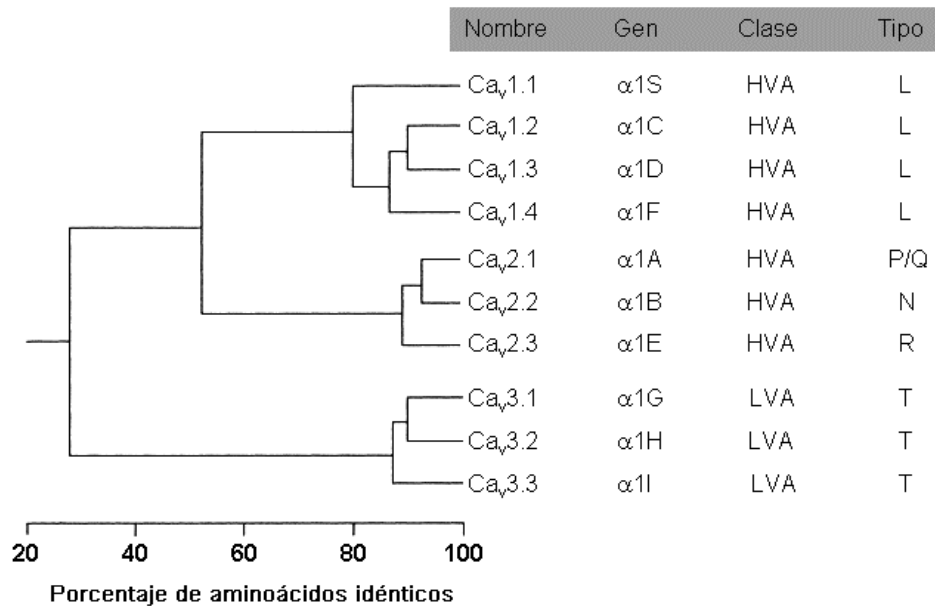


Figura 1. Árbol filogenético de las subunidades $\alpha 1$ de los canales Ca_v . Porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos de las subunidades $\alpha 1$ de los canales Ca_v . En los alineamientos, se considero únicamente a los aminoácidos en las regiones que atraviesan la membrana y las asas que forman parte del poro de conducción. Estas secuencias se alinearon empleando el software DNAsis con el algoritmo CLUSTAL. El alineamiento múltiple de secuencias define tres subfamilias, las cuales se indican en la figura. Con tales condiciones, se puede observar que en el caso de los canales de calcio tipo T, el porcentaje de identidad entre miembros es de más del 80%. Adaptada de [30].

En el año 2000 se propuso clasificar a los canales de calcio activados por voltaje en familias y subfamilias basados en el porcentaje de identidad que las subunidades $\alpha 1$ comparten entre si [31]. Esta clasificación dio origen a la nomenclatura que se utiliza hoy en día más comúnmente para designar a estos canales, la cual se basa en la utilizada para clasificar a los canales de K^+ [32] y de Na^+ [33]. La nomenclatura conviene que el nombre de cada canal debe comenzar con el símbolo químico del ion que permean principalmente, Ca, seguido del principal regulador fisiológico (voltaje) indicado como un subíndice, Ca_v . A continuación se emplea un identificador numérico (que va del 1 al 3), el cual indica a que familia pertenece el gen que codifica a cada subunidad $\alpha 1$, y por ultimo un numero, separado por un punto, el cual indica el orden cronológico en que se descubrió dicho canal. Por lo tanto, los canales Ca_v se dividen en tres subfamilias, Ca_v1 , Ca_v2 y

Ca_v3. La primera incluye los canales tipo L, de los cuales existen 4 subunidades $\alpha 1$. La segunda contiene a los canales tipo N, P/Q y R. Mientras que la subfamilia Ca_v3 agrupa a los canales tipo T, y que incluye 3 diferentes subunidades $\alpha 1$: $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$ [34-36], que con la nueva nomenclatura corresponden a los canales Ca_v3.1, Ca_v3.2 y Ca_v3.3 (Figura 1). Esta nueva clasificación de los canales Ca_v permite hacer relaciones inmediatas de las similitudes estructurales y parentescos evolutivos entre los miembros de esta familia. Además vislumbran un patrón en las propiedades biofísicas y farmacológicas que se habían descrito en estos canales (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades farmacológicas y funcionales de los tipos de canales Ca_v

Tipo de I _{Ca} ²⁺	Subunidad $\alpha 1$	Principal bloqueador	Función fisiológica principal	Enfermedades hereditarias
L	Ca _v 1.1	DHPs	Acoplamiento de la excitación-contracción del musculo esquelético, regulación de la transcripción	Parálisis periódica hipocaliémica
	Ca _v 1.2	DHPs	Acoplamiento de la excitación-contracción del musculo liso y musculo esquelético, transitorios de Ca ²⁺ en el soma y dendritas de neuronas, secreción de hormonas, regulación de actividad enzimática, regulación de la transcripción	Síndrome de Timothy: arritmia cardiaca con desarrollo de anormalidades y trastornos del espectro autista
	Ca _v 1.3	DHPs	Secreción de hormonas, actividad de marcapasos, transitorios de Ca ²⁺ en el soma y dendritas de neuronas, transducción auditiva	
	Ca _v 1.4	DHPs	Transducción visual	Ceguera nocturna estacionaria
N	Ca _v 2.1	ω -CTx-GVIA	Liberación de neurotransmisores, transitorios de Ca ²⁺ en dendritas	
P/Q	Ca _v 2.2	ω -Agatoxin	Liberación de neurotransmisores, transitorios de Ca ²⁺ en dendritas	Migraña Familiar Hemiplegica, Ataxia cerebelar
R	Ca _v 2.3	SNX-482	Liberación de neurotransmisores, transitorios de Ca ²⁺ en dendritas	
T	Ca _v 3.1	TTAs	Actividad de marcapasos y disparo en ráfagas del potencial de acción	
T	Ca _v 3.2	TTAs	Actividad de marcapasos y disparo en ráfagas del potencial de acción	Crisis de ausencia
T	Ca _v 3.3	TTAs		

Modificada de [25].

1.2.2. Composición molecular y estructura

Estudios en los perfiles de hidrofobicidad, junto con estudios de cristalografía de rayos X de los canales de Na^+ y de K^+ , sugieren que la subunidad $\alpha 1$ de los canales Ca_v está formada por cuatro dominios homólogos, enumerados del I al IV y que se arreglan en el sentido de las manecillas del reloj (Figura 2). Este ordenamiento particular, fue determinado a partir de estudios de los sitios de unión de dihidropiridinas en canales HVA [37-38]. A su vez, cada dominio comprende seis segmentos transmembranales, designados como S1 al S6, interconectados por asas intracelulares y extracelulares. Los segmentos S1 a S4 dan lugar a la parte exterior del canal mientras que los segmentos S5 y S6 están en el centro de la subunidad, formando el poro de conducción. Particularmente, los segmentos S5 y S6 están unidos por un asa que se invagina parcialmente en la membrana y a la cual se denomina como el asa del poro. Mutaciones dirigidas en estas asas, muestran que en ellas se encuentran los aminoácidos responsables de conferirle la selectividad por el ion Ca^{2+} a estos canales sobre otros iones [39-41]. Por ejemplo, en cada asa del poro de cada dominio de los canales HVA existe un ácido glutámico localizado en la misma posición, dando lugar a la notación EEEE para designar a la secuencia de aminoácidos que les confiere la selectividad por el ion Ca^{2+} a estos canales, a esta secuencia se suele llamar firma del filtro de selectividad. En los canales LVA la firma es EEDD, mientras que en los canales de sodio es DEKA [42-43].

Los canales HVA son complejos multiméricos compuestos por la subunidad $\alpha 1$ y las subunidades auxiliares $\alpha 2\delta$, β y γ , las cuales son importantes para el correcto funcionamiento de estos canales [44] (Figura 2). La subunidad $\alpha 2\delta$ es una glicoproteína producto de un solo gen, cuya subunidad $\alpha 2$ es extracelular y se encuentra anclada a la glicoproteína δ transmembranal mediante enlaces disulfuro [45]. Existen cuatro variantes de esta subunidad, ($\alpha 2\delta$ -1, $\alpha 2\delta$ -2, $\alpha 2\delta$ -3, $\alpha 2\delta$ -4). Cada una se expresa en diferentes tejidos celulares y cada una regula de manera diferente a la subunidad $\alpha 1$ formadora del poro [44]. También se les ha asociado con la ubicación de sitios en donde podrían estar actuando fármacos antiepilépticos y analgésicos [46-47]. La subunidad β regula a la subunidad $\alpha 1$ mediante interacción directa en el sitio denominado AID (*Alpha interaction domain*), situado en el asa citoplasmática que une a los dominios I y II de la subunidad $\alpha 1$. La presencia de esta subunidad es necesaria para que las subunidades $\alpha 2\delta$ y γ puedan ejercer su efecto de forma significativa [48]. De la subunidad β se conocen cuatro isoformas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, y $\beta 4$), las

fertilización, desarrollo celular, proliferación, contracción muscular, actividad de marcapasos, procesamiento del dolor [55-56], generación de disparos de bajo umbral (LTS, por sus siglas en inglés) y ritmos talamocorticales durante etapas del sueño y epilepsia [57-60]. Por otra parte, mutaciones en los genes que codifican esta proteína dan lugar a enfermedades conocidas como canalopatías, como la epilepsia de tipo ausencia, la cual se manifiesta principalmente en niños [61-62].

Las propiedades biofísicas distintivas de los canales tipo T tienen sus bases moleculares en las características fisicoquímicas de la secuencia de aminoácidos que conforman estas proteínas, mismas que determinan su estructura y su función. Debido a que uno de los objetivos del presente trabajo de tesis fue la construcción de un modelo de la estructura tridimensional de un miembro de la familia de canales LVA, el canal $\text{Ca}_v3.1$, es importante revisar algunos aspectos generales de la relación función estructura que se conocen para estos canales.

1.2.3.1. Estructura de canales de calcio tipo T

En la sección 1.2.2 se describieron algunas generalidades estructurales de la subunidad $\alpha 1$, las cuales son comunes para los canales iónicos activados por voltaje, incluyendo a los canales Ca_v3 [37, 63]. En la Figura 3A se ilustra de forma esquemática la distribución de los aminoácidos en los canales de calcio tipo T a través de la membrana. El amino y carboxilo terminales de la proteína se encuentran en el citoplasma de la célula. Menos del 50% de los aminoácidos que constituyen a estas proteínas se encuentran insertados en la membrana. Perfiles de hidrofobicidad y de estructura secundaria en la secuencia de aminoácidos de estos canales, muestran que la estructura de los segmentos insertados en la membrana corresponden a hélices alfa [30]. Existen diversos problemas fundamentales que dificultan obtener experimentalmente imágenes en alta resolución de la estructura de los complejos proteicos que conforman a los canales iónicos de las células eucariontes. Las únicas imágenes disponibles a la fecha, corresponden a imágenes de baja resolución obtenidas experimentalmente a través de microscopia electrónica de transmisión (TEM) criogénica, o con tinción negativa. Particularmente se ha logrado determinar la estructura del canal de calcio $\text{Ca}_v3.1$ de rata, a una resolución de 23 Å [64] (Figura 3B). A esta resolución no es posible obtener detalles que permitan vislumbrar la posición relativa de cada uno de los átomos que conforman a esta proteína. Coordenadas aproximadas de los segmentos transmembranales

pueden ser inferidas a partir de otras estructuras de proteínas homologas resueltas a mayor resolución por difracción de rayos X. La estructura de la subunidad $\alpha 1$ de todos los canales cationicos activados por voltaje y cristalizados a la fecha, poseen la misma arquitectura básica ilustrada en las Figuras 3C y 3D.

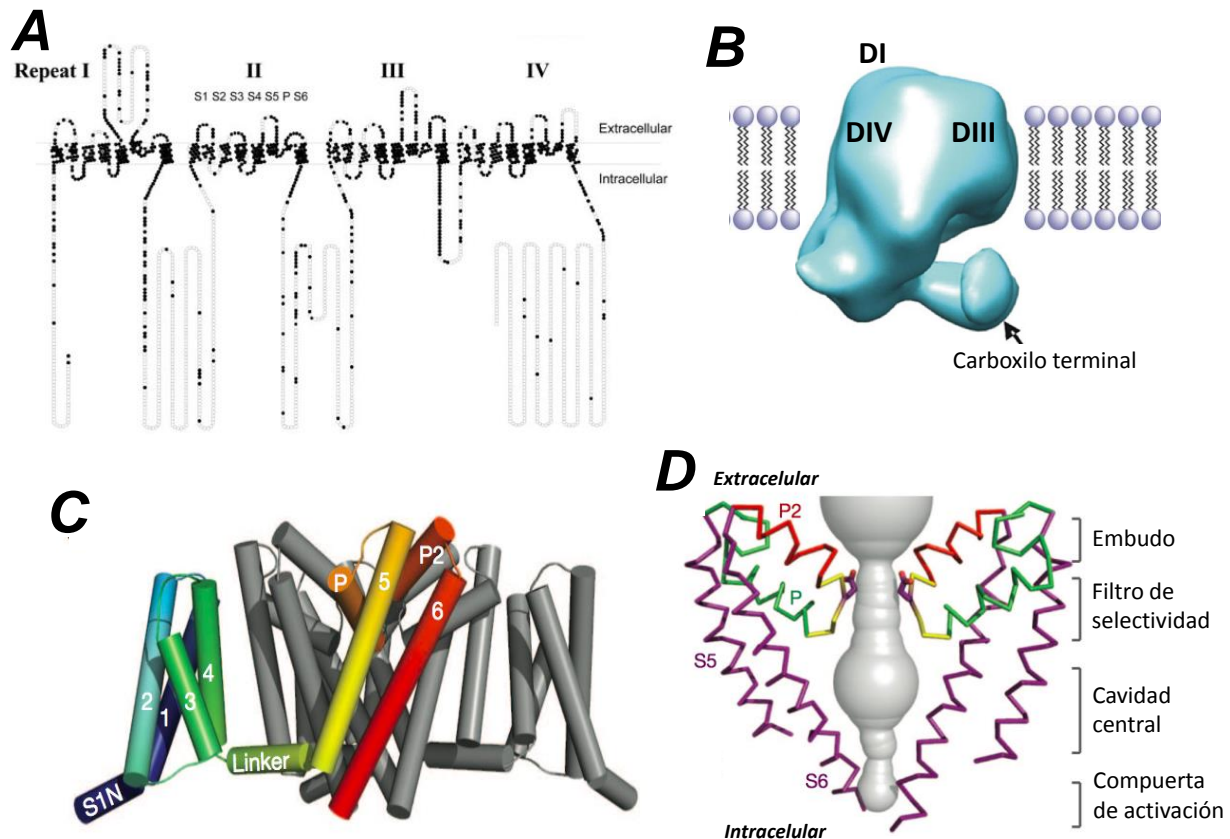


Figura 3. Aspectos estructurales generales de los canales de calcio tipo T. **A)** Distribución en la membrana de los aminoácidos que forman la subunidad $\alpha 1$ de los canales de calcio tipo T. Cada aminoácido es representado con un círculo. Los círculos negros representan aminoácidos que se conservan en los tres miembros de los canales Ca_v3 . Tomada de [55]. **B)** Reconstrucción tridimensional de la estructura del canal $\text{Ca}_v3.1$ de rata, obtenida a partir de micrografos 2D de 11,500 partículas en complejo con detergentes y lípidos (~320 kDa, peso molecular del canal $\text{Ca}_v3.1$ ~250 kDa), resuelta a 23 Å mediante microscopia electrónica con tinción negativa. Se ilustra la posición aproximada de cada dominio así como su ubicación en la membrana. Modificada de [64]. **C)** Representación esquemática de la subunidad α del canal de sodio de bacteria Na_vAb (PDB ID 3RVY), obtenida por difracción de rayos X a una resolución de 2.7 Å. Los cilindros representan hélices alfa. Esta subunidad es un homotetrámero formado por cuatro subunidades α idénticas. Se resalta con colores una de estas subunidades, los segmentos están numerados del 1 al 6. Los segmentos S1 a S4 forman el dominio del sensor de voltaje, mientras que los segmentos S5 y S6 forman el dominio del poro de conducción, estos dominios están unidos a través de un péptido conocido como conector S4-S5 (*linker*). **D)** Esquema de la estructura del poro de los canales Na_v de bacteria, representada con los carbonos alfa unidos mediante barillas. El filtro de selectividad es soportado por dos hélices alfa (P y P2). En el extremo intracelular de los segmentos S6 se ubican aminoácidos que son parte de la compuerta de activación, la cual se abre o se cierra en respuesta a cambios conformacionales en la estructura de estas hélices. Paneles C y D, modificadas de [65].

En general los canales iónicos activados por voltaje poseen tres estados conformacionales estables a través de los cuales su estructura y función pueden transitar (Figura 4). Las manifestaciones eléctricas de estas transiciones, en respuesta a cambios en el V_m , pueden ser medidos por diversas técnicas experimentales, entre ellas la más comúnmente empleada, debido a su gran versatilidad, es la técnica de *patch clamp* (fijación de voltaje en micro áreas de membrana) [66]. Esta poderosa técnica permite registrar la actividad eléctrica de un solo canal o la de toda una población presente en una célula en tiempo real (Figura 4B y 4C).

1.2.3.2. Propiedades biofísicas

Activación

La activación está asociada a nivel molecular con la apertura de la compuerta de activación del canal (Figura 3D). A voltajes de membrana considerados como hiperpolarizados, -90 mV a -100 mV, esta compuerta adopta una conformación que impide físicamente el paso de iones a través del canal, por lo que se le conoce como estado cerrado. La activación permite que el canal conduzca una determinada cantidad de corriente que es característica de cualquier tipo de canal. Los canales tipo T poseen una conductancia unitaria intrínseca (medida en pico Siemens, pS), la cual depende, entre otras cosas, de la concentración del acarreador de carga (la especie iónica que permea a través del canal), que varía entre 6 y 8 pS en presencia de 110 mM de Ca^{2+} o Ba^{2+} isotónico [67] y en concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} (2 mM), el valor esperado es de alrededor de 1 pS [15]. Registros de canal unitario revelan que en los canales de calcio tipo T, la apertura del canal ocurre en ráfagas (Figura 4B), con una duración promedio que va en aumento con la despolarización [67]. La probabilidad de apertura es bastante baja (~ 0.15) y el tiempo medio de apertura es independiente del voltaje. Mientras que la probabilidad de re-apertura es alta (0.8) e independiente del voltaje. La primera latencia promedio es altamente dependiente del voltaje, por lo que la duración promedio de la ráfaga de la primera latencia se correlaciona con el curso temporal de la corriente macroscópica. Por otro lado, los registros de corrientes macroscópicas indican que las amplitudes de las corrientes evocadas son máximas cuando se despolariza la membrana a valores de entre -30 a -20 mV, y es dependiente de las concentraciones de calcio extracelular. El curso temporal, en el que la población de canales permanece en el estado abierto, es determinado por la constante de tiempo de activación, τ_{act} . Esta constante disminuye de forma exponencial con la despolarización de la membrana. A potenciales cercanos al umbral de activación, pulsos en el

rango de 15 a 20 mV menos negativos que el potencial de reposo, la apertura del canal es más lenta que a potenciales mas despolarizantes, por ej., -30 mV. Los canales $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.2$ muestran cinéticas de activación similares, mientras que los canales $\text{Ca}_v3.3$ poseen constantes de activación más lentas [68].

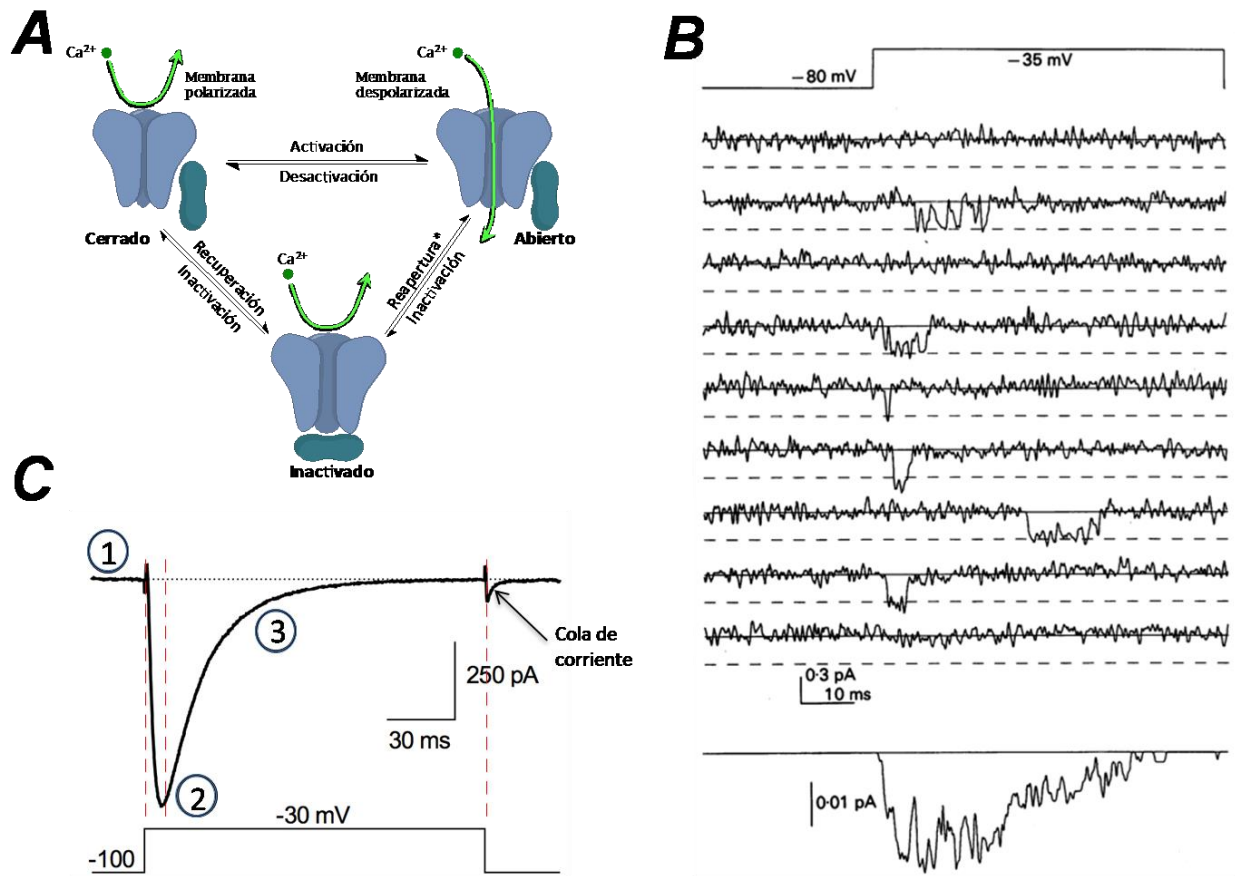


Figura 4. Modelo simplificado del funcionamiento de los canales Ca_v3 . **A)** Representación esquemática de los estados conformacionales por los que pueden transitar los canales Ca_v3 . **B)** Registros de corriente de canal unitario de canales de calcio tipo T de células de corazón de conejillo de indias. La actividad de los canales fue evocada por despolarizaciones de 70 ms a -35 mV y en presencia de 10 mM de Ca^{2+} en la solución que baña las células. Partiendo de un potencial de membrana (V_m) de -80 mV, la despolarización a -35 mV favorece la apertura del canal (evidenciado por deflecciones negativas de la señal de corriente respecto a la basal –línea recta continua), el cual se abre en ráfagas de diferente duración y en la mayoría de los casos, solo durante la primera parte del pulso despolarizante. La despolarización del V_m no siempre induce la apertura del canal (primer y último trazo de corriente). En la parte inferior de la figura se ilustra el promedio de un ensamble de 48 trazos de registros unitarios, en el cual se delinea las características del trazo típico obtenido en registros de célula completa. Adaptada de [69]. **C)** Registro de célula completa en células HEK-293 del canal $\text{Ca}_v3.1$. La señal de corriente evocada (nuevamente ilustrada por la deflección hacia valores negativos de la señal de corriente respecto a la basal –línea recta punteada) es el resultado de la actividad de todos los canales $\text{Ca}_v3.1$ funcionales en la membrana plasmática. La transición del estado cerrado al abierto (1 \rightarrow 2), y del estado abierto al inactivado (2 \rightarrow 3), se ven reflejados en el perfil del trazo de corriente. Cuando el canal transita del estado abierto al cerrado se producen colas de corriente (poco visibles en el trazo, debido a que prácticamente todos los canales se han inactivado). Trazo de corriente obtenido de los experimentos de la presente tesis.

Desactivación

En registros de célula completa, la desactivación de los canales suele observarse en las “colas de corriente” (Figura 4C). Al repolarizar la membrana después de la aplicación de un pulso despolarizante (no tan prolongado como para inactivar a todos los canales; ver inactivación en la siguiente sección), se generan colas de corriente que decaen como consecuencia de la transición del canal del estado abierto al estado cerrado (desactivado). Esta transición se asocia a nivel molecular con el cierre de la compuerta de activación. La desactivación relativamente lenta de los canales de calcio tipo T, de 5 a 20 veces más prolongada que en los canales HVA, es una característica distintiva de estos canales [30]. La amplitud de las colas de corriente es directamente proporcional a la fracción de canales que se encuentran abiertos al momento de repolarizar la membrana. Como se puede apreciar de la Figura 4C, al repolarizar la membrana la amplitud de la corriente se incrementa claramente con respecto a la observada justo antes de terminar el pulso despolarizante. Lo anterior es debido a que al repolarizar a -80 mV, la fuerza impulsora (magnitud del gradiente electroquímico) para el Ca^{2+} aumenta con respecto a la presente durante la etapa de despolarización (a -30 mV), por lo que la misma proporción de canales abiertos (que no se inactivaron) presentes justo antes de repolarizar, ahora conducen más corriente y por eso se observa esta magnificación en la amplitud. Sin embargo, debido a que los canales se cierran a -80 mV, el aumento en la amplitud es transitorio y la corriente tiende a cero reflejando así el cierre de los canales a ese voltaje.

Inactivación

En registros de corrientes macroscópicas (es decir, de célula completa), durante la despolarización sostenida de la membrana, el canal transita del estado activado o abierto a una conformación inactivada, la cual es una conformación no conductora del canal diferente a la desactivación. A nivel molecular, el proceso exacto por el cual los canales tipo T se inactivan, es aún desconocido, aunque existen algunas evidencias que involucran varias regiones de la subunidad $\alpha 1$ [70-72]. El curso temporal de esta transición se le conoce como constante de tiempo de inactivación (τ_{inac}), cuyo valor disminuye de manera exponencial conforme se despolariza la membrana. El estado inactivado no requiere que el canal se encuentre en el estado abierto para que se presente, es decir, un canal puede pasar del estado cerrado al inactivado directamente y a esto se le conoce como inactivación a partir de estados cerrados. La repolarización de la membrana a potenciales

negativos remueve la inactivación, a lo cual se le conoce como recuperación de la inactivación. La recuperación de la inactivación es más lenta conforme la duración del pulso despolarizante aumenta [73]. En otros canales iónicos activados por voltaje, como los de sodio $\text{Na}_v1.6$, la recuperación de la inactivación puede ocurrir de dos maneras, ya sea mediante la transición directa del canal del estado inactivado al estado cerrado, o indirectamente a través del estado abierto para posteriormente desactivarse. La transición de los canales del estado inactivado al abierto genera corrientes resurgentes [74], aunque parece ser que en los canales de calcio tipo T, la recuperación ocurre principalmente a través de la desactivación directa [75-76].

Estudios sobre el mecanismo por el cual los canales iónicos activados por voltaje acoplan los cambios de potencial eléctrico a las transiciones antes mencionadas, convergen en un mecanismo global que involucra el sensor del voltaje del segmento S4. Los aminoácidos con carga positiva conservados en los segmentos S4, en respuesta a la despolarización, facilitan el movimiento y rotación de este segmento en dirección ascendente, el cual tira del conector S4-S5 torciendo así los segmentos S6 para abrir el poro de conducción. Aunque este mecanismo de hélice deslizante explica de manera muy general la activación de los canales iónicos, el mecanismo molecular exacto por el cual los canales de calcio tipo T se activan, inactivan y desactivan aun no está bien establecido. La mayoría de la evidencia al respecto proviene de estudios de estructura-función, los cuales se revisaran brevemente a continuación.

1.2.3.3. Estudios estructura-función

Uno de los primeros estudios estructura-función que se llevo a cabo en los canales Ca_v se enfocó en dilucidar las regiones moleculares involucradas en determinar las diferencias de los umbrales de activación de los canales HVA y LVA. Para este fin se produjeron proteínas quiméricas en donde los dominios I, II, III y IV del canal $\text{Ca}_v1.2$ fueron substituidos por los dominios equivalentes en el canal $\text{Ca}_v3.1$. Cada uno de los canales quiméricos resultantes mostró una dependencia al voltaje de activación similar a los canales HVA, excepto por el que contenía el domino II del canal HVA. Para esclarecer si las alteraciones en la dependencia al voltaje se debían principalmente a la contribución del sensor de voltaje de cada canal, los segmentos S4 de los canales $\text{Ca}_v3.1$ fueron reemplazados por los del canal $\text{Ca}_v1.2$. Esta vez los resultados mostraron que la dependencia al voltaje de activación de las proteínas quiméricas no eran muy diferentes a

las del canal $\text{Ca}_v3.1$, lo cual sugiere que la activación de bajo umbral no está determinada exclusivamente por los sensores de voltaje (segmentos S4) [77]. Por otro lado, el remplazo del sensor de voltaje del dominio II, dio lugar a una proteína quimérica la cual poseía una dependencia al voltaje en la activación muy similar a la de la proteína quimérica a la cual se le había substituido el dominio II completo, en ausencia de subunidades auxiliares. Esto les permitió concluir que el pequeño efecto que el dominio II juega en la dependencia al voltaje de activación, es en mayor medida debido a el segmento S4, y que los principales determinantes de la dependencia al voltaje que caracteriza a los canales tipo T, se deben encontrar en otras regiones diferentes a los segmentos S4 de los dominios I, III y IV de estos canales. Por otro lado, la cinética de activación se vio enlentecida en la quimera del dominio II, mientras que para los otros dominios no se pudo hacer ninguna conclusión dada la baja densidad de corriente producida por estas quimeras. Las cuatro quimeras de los segmento S4 no mostraron cambios significativos en la cinética de activación, sugiriendo que la rápida activación característica de los canales de calcio tipo T no está involucrada de manera directa con el sensor de voltaje.

Otra propiedad distintiva de los canales tipo T es su rápida inactivación. En general, las bases moleculares del mecanismo encargado de la inactivación parecen estar dispersas en múltiples sitios de la proteína. Entre estas regiones se encuentra el lado amino del carboxilo terminal [72] y el segmento S6 del dominio III [70] de estas proteínas.

Un estudio más reciente en el que se investigó que aminoácidos podrían estar acoplados energéticamente durante el proceso de activación, inactivación y desactivación, fue llevado a cabo empleando modelado molecular de proteínas y análisis cíclico de mutaciones dobles en el canal $\text{Ca}_v3.2$ [78]. Los autores realizaron un *scanning* de glicinas (substitución sistemática de aminoácidos por glicinas) en el conector S4-S5 (Figura 3C) del dominio II (II-S4-S5) y en el segmento S6 de este mismo dominio (II-S6), además de otras mutaciones en los segmentos S6 de los dominios III y IV. En este exhaustivo estudio se caracterizaron las propiedades biofísicas de 47 mutaciones individuales y 20 mutaciones dobles. Se encontró que durante la activación, los aminoácidos Val-907, Leu-908 y Thr-911 del conector II-S4-S5 están acoplados energéticamente con la Ile-1013 del II-S6, aunque estas interacciones no tienen un efecto significativo en la dependencia al voltaje, modificando en no más de 11 mV la $V_{1/2}$ de activación (voltaje necesario para activar a la mitad de la población de canales) con respecto al canal silvestre. La cinética de

activación e inactivación tampoco fueron modificadas de manera significativa, salvo por el caso de las mutantes I1013G del S6-II y T911A de S4-S5-II, las cuales presentan una τ_{act} con un valor de poco más del doble con respecto al canal silvestre y una τ_{inac} siete veces mayor. Es importante destacar que al modificar el acoplamiento energético detectado para los aminoácidos T911 del conector II-S4-S5 y I1013 de II-S6, se modifican tanto a la cinética de activación como la cinética de inactivación, mostrando un acoplamiento en el desencadenamiento de estos eventos, pero no la dependencia al voltaje. Estos resultados son consistentes con el estudio ya descrito de las quimeras del canal $Ca_v3.1$ y el $Ca_v1.2$. Interesantemente, el acoplamiento energético entre los aminoácidos involucrados durante la activación, no mostro valores significativos de acoplamiento energético durante la inactivación y durante todo el estudio no se encontró ningún par de aminoácidos que interactuaran de manera significativa para este proceso. Esto los llevo a sugerir que la activación y la inactivación podrían ser dos procesos estructuralmente distintos, o bien la inactivación esta dispersada en mas regiones de la proteína y requiere de la participación de una mayor cantidad de puntos de contacto haciendo difícil su detección mediante el análisis cíclico de mutaciones dobles. Aunque realmente es difícil concluir algo con respecto a la inactivación en este trabajo, debido al enorme error asociado a sus resultados en este rubro.

1.2.3.4. Farmacología

El papel exacto que desempeñan los canales de calcio tipo T en diversos procesos fisiológicos y patofisiológicos ha sido oscurecido por mucho tiempo debido a la falta de antagonistas selectivos y potentes para estos canales [79]. El estudio farmacológico de estas proteínas en preparaciones celulares nativas también ha resultado particularmente difícil, debido a que estos canales se expresan en bajas densidades y casi nunca en ausencia de otras conductancias iónicas, en especial, de los canales HVA, lo cual dificulta la medición precisa del efecto de bloqueadores en las corrientes tipo T. Muchas drogas de uso clínico como antihipertensivos (verapamilo, flunarizina), antipsicóticos (penfluridol, clozapina, haloperidol, pimozida), antidepresivos (fluoxetina, trazodona), antiepilépticos (etosuximida, fenitoína, zonisamida) y anestésicos (isoflurano, ketamina), han mostrado tener actividad antagonista en los canales de calcio tipo T, pero la potencia media de bloqueo (IC_{50}) reportada suele variar dependiendo del tipo (Ba^{2+} o Ca^{2+}) y concentración del acarreador de carga, así como del potencial de reposo y el tipo de células empleadas durante los experimentos [79-80]. A pesar de que la mayoría de las moléculas antes

mencionadas, no son potentes ni selectivas a concentraciones clínicamente relevantes, estas han ayudado a esclarecer el potencial de los canales Ca_v3 como blancos terapéuticos, lo cual ha ampliado la investigación en este rubro. Se ha descubierto que algunas dihidropiridinas y fenilalquilaminas, moléculas que por mucho tiempo se pensó no tenían actividad en los canales de calcio tipo T, son capaces de bloquearlos a concentraciones clínicamente relevantes [80]. Por otra parte, otro grupo de bloqueadores de los canales Ca_v3 se ha encontrado en los metales iónicos trivalentes, como el grupo de los lantánidos y metales de transición La^{3+} y Y^{3+} [80] y en los cationes divalentes, tales como el Zn^{2+} , Cu^{2+} y Ni^{2+} . Particularmente estos últimos son los únicos bloqueadores que permiten diferenciar entre las diferentes isoformas de los canales Ca_v3 , bloqueado con mayor potencia al canal $\text{Ca}_v3.2$. También se ha demostrado que el funcionamiento de canales de calcio tipo T puede ser regulado por diversos lípidos endógenos, entre ellos el endocannabinoide anandamida, los ácidos grasos ω -3 y lipoaminoácidos [81].

El mibefradil fue el primer compuesto desarrollado como un bloqueador selectivo y potente para los canales Ca_v3 . Aprobado inicialmente para su uso en el tratamiento de la hipertensión [82], aunque posteriormente se demostró que también bloqueaba a los canales HVA a concentraciones clínicamente relevantes en diversas preparaciones celulares [79]. Esfuerzos posteriores se han realizado con el fin de identificar nuevos bloqueadores selectivos y potentes para estos canales, empleando ya sea modelos de farmacóforo, basado en grupos funcionales de compuestos que han demostrado alguna actividad, o el tamizado de librerías de compuestos de empresas farmacéuticas, que en combinación con técnicas de detección de alto rendimiento basadas en fluorometría, estudios de relación actividad-estructura (SAR) y química combinatoria, han conducido a la obtención de nuevos compuestos estructuralmente diversos, más selectivos y potentes de estos canales [83-84]. Particularmente, para los propósitos de este trabajo, uno de estos esfuerzos conducidos por los laboratorios de investigación Merck (West Point, PA, EUA) condujo a la síntesis de una nueva serie de antagonistas altamente selectivos y potentes para los canales de calcio tipo T designados bajo el nombre clave de TTA's, por sus siglas en inglés (*T-Type Antagonist*). A continuación se revisaran algunos aspectos básicos del TTA-A2 en las corrientes tipo T.

1.2.3.5. Caracterización del efecto farmacológico del TTA-A2 en los canales de calcio tipo T

El efecto sobre la amplitud y propiedades biofísicas de las corrientes de calcio generadas por los canales tipo T en presencia del TTA-A2 se ha estudiado en diversas preparaciones celulares [85-89]. De interés particular para el presente trabajo, son los resultados reportados para el canal $\text{Ca}_v3.1$ de humano expresado en células HEK-293 en presencia del TTA-A2 y los cuales revisaremos brevemente a continuación. Previamente, el grupo de Kraus y col. [89] demostró que la IC_{50} del TTA-A2 para el bloqueo de los canales $\text{Ca}_v3.1$ es aproximadamente 50 veces menor cuando se utiliza un potencial de mantenimiento (HP) de -80 mV comparado con un HP de -100 mV. Lo anterior muestra que el TTA-A2 es un bloqueador dependiente de estado, ejerciendo su efecto antagonista con mayor potencia en estados inactivados de los canales $\text{Ca}_v3.1$ (Figura 5). El mismo tipo de experimentos realizados en los canales $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{Ca}_v3.3$, mostraron resultados similares. Por otra parte, la caracterización del efecto del TTA-A2 sobre las propiedades biofísicas del canal $\text{Ca}_v3.1$ mostró que la inhibición de la corriente por el fármaco no modifica la dependencia al voltaje de la activación de los canales (Figura 6A), contrario a la inactivación en el estado estacionario, la cual mostró una clara asociación con la concentración del fármaco (Figura 6B). Además, la cinética de recuperación de la inactivación (Figura 6C) y el bloqueo dependiente del uso de los canales (Figura 6D) fueron significativamente modificados por la presencia del TTA-A2 en la solución de registro.

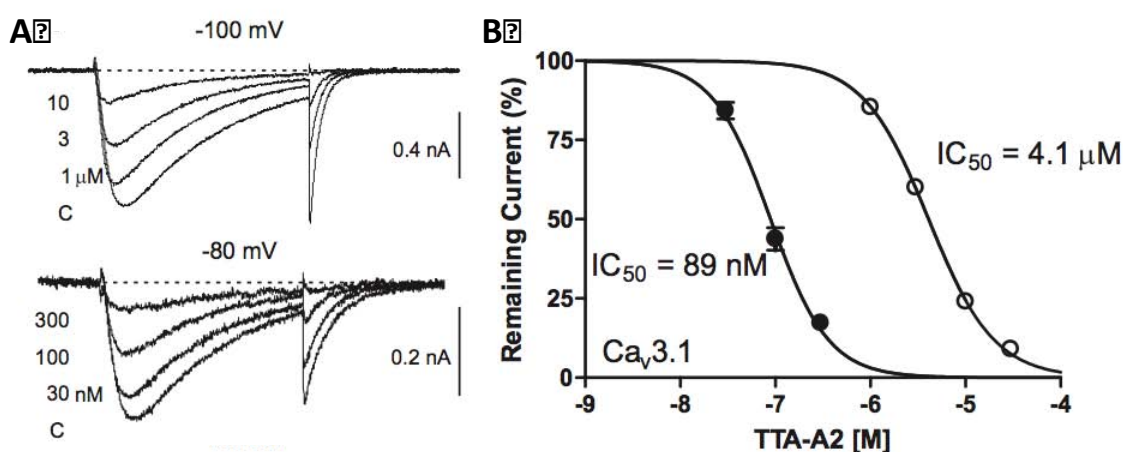


Figura 5. Inhibición del canal $\text{Ca}_v3.1$ por el TTA-A2. A) Trazos de corriente a -20 mV del canal $\text{Ca}_v3.1$, obtenidos a partir de un HP de -100 mV (trazos superiores) y de -80 mV (trazos inferiores), en ausencia (C) o presencia de las concentraciones de TTA-A2 indicadas. B) Curvas concentración-respuesta del bloqueo de la corriente del canal $\text{Ca}_v3.1$ por el efecto del TTA-A2 al usar un HP de -100 mV (círculos vacíos) y de -80 mV (círculos negros). Se nota claramente que la corriente del canal $\text{Ca}_v3.1$ es bloqueada por concentraciones de TTA-A2 más bajas cuando se utiliza el HP de -100 mV, lo que indica un bloqueo dependiente de estado del canal. Tomada de [89].

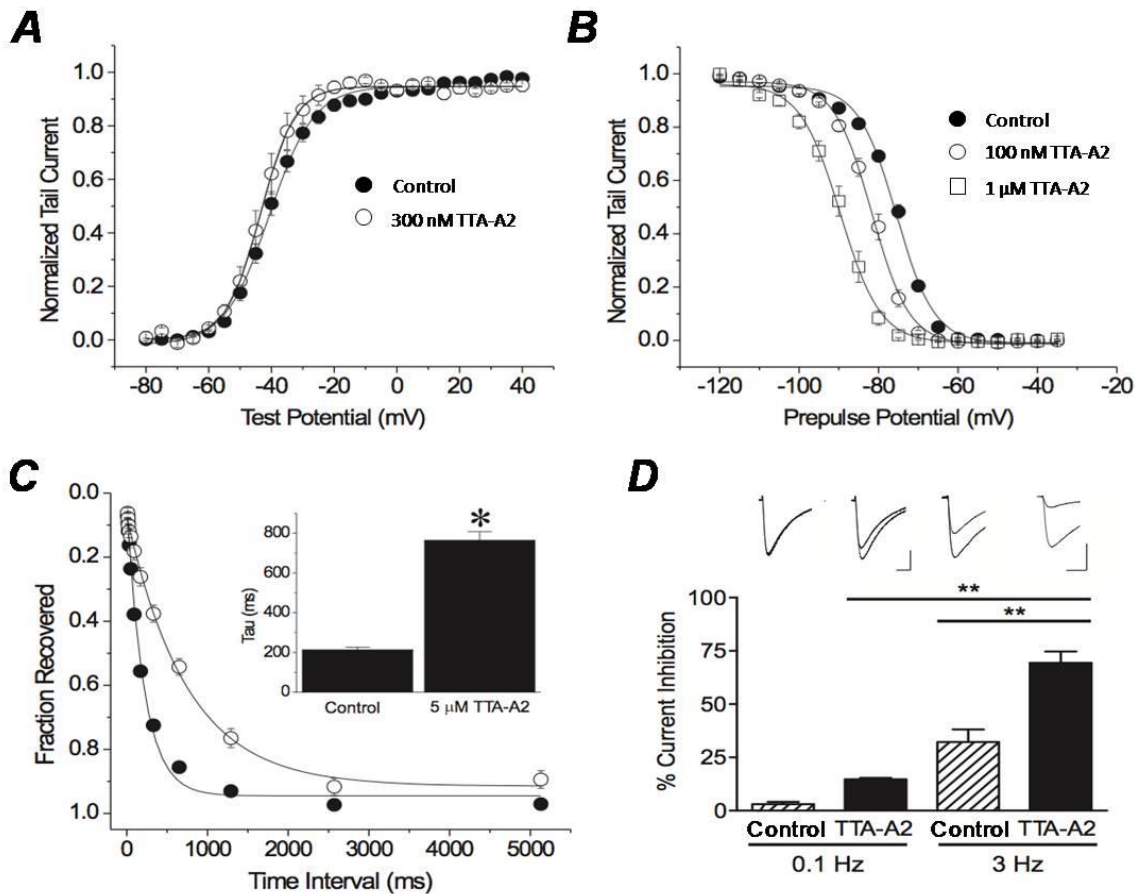


Figura 6. Bloqueo dependiente de estado del canal $\text{Ca}_v3.1$ inducido por el TTA-A2. **A)** Curva conductancia-voltaje del canal $\text{Ca}_v3.1$ en ausencia y presencia del TTA-A2. Los puntos experimentales representan la amplitud de las colas de corriente registradas a -80 mV después de pulsos despolarizantes de 8 ms de duración a los voltajes indicados en el eje de las abscisas. Las curvas de activación, no son significativamente diferentes, lo cual sugiere que el TTA-A2 no interfiere en la activación de los canales. **B)** Efecto del TTA-A2 en las curvas de inactivación del estado estacionario de los canales $\text{Ca}_v3.1$. Nuevamente la amplitud de las colas de corriente normalizadas con la corriente del pulso de prueba a -20 mV se graficaron en función del voltaje de cada uno de los prepulsos aplicados (de 10 s de duración). Estas curvas indican la fracción de canales inactivados a cada uno de los potenciales del prepulso. El TTA-A2 indujo un desplazamiento, dependiente de concentración, en dirección a potenciales más negativos en las curvas de inactivación, sugiriendo que el TTA-A2 estabiliza el canal en el estado inactivando. **C)** La recuperación de la inactivación del canal $\text{Ca}_v3.1$ se enlentece en presencia del TTA-A2. Los puntos representan la fracción de corriente que se recupera a diferentes tiempos después de haber inactivado los canales $\text{Ca}_v3.1$. Las constantes de tiempo (τ ; inserto) en ausencia (círculos negros) y presencia de $5 \mu\text{M}$ de TTA-A2 (círculos vacíos) fueron obtenidas a partir del ajuste con funciones exponenciales de los datos experimentales. **D)** Inhibición dependiente del uso de las corrientes del canal $\text{Ca}_v3.1$ alcanzada a despolarizaciones aplicadas a 0.1 Hz y 3 Hz en ausencia (Control) y presencia de $1 \mu\text{M}$ del antagonista (TTA-A2). Obsérvese como incluso en ausencia del bloqueador, el aumento en la frecuencia de las despolarizaciones induce una inhibición estacionaria en la amplitud de la corriente del 3 (0.1 Hz) y 32% (3 Hz), debido a la acumulación de canales inactivados entre los pulsos de prueba. Modificada de [89].

1.3. Planteamiento del problema

Los canales de calcio tipo T se han convertido en atractivos blancos terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades. Recientemente, la compañía Merck (West Point, PA, EUA), sintetizó una nueva serie de antagonistas, altamente selectivos y potentes para los canales de calcio tipo T, nombrados con el prefijo TTA [90-91]. Experimentos realizados en sistemas de expresión heterólogos (células HEK-293) y cultivos primarios (neuronas DRG), mostraron que algunos de estos compuestos bloquearon los canales tipo T de manera dependiente de estado mientras que otros lo hicieron de manera independiente de la conformación del canal [89, 92]. Para investigar la posibilidad de que estas diferencias fueran debidas al acoplamiento de estos compuestos en distintos sitios moleculares de los canales tipo T, se utilizó el compuesto [³H]TTA-A1 (un derivado del TTA-A2 marcado radioactivamente) para realizar experimentos de competición. Los resultados mostraron que los TTA y otros bloqueadores conocidos de los canales tipo T (como mibefradil, flunarizina y pimozide) compiten por el mismo sitio de unión, mientras que otros (etosuximida y zonisamida) no muestran competencia por tal sitio, lo cual sugiere que probablemente se acoplen a uno diferente, y que en algunos casos (como el TTA-Q4) se unen a un sitio que modula alóstericamente al primero [81, 93].

Por otro lado, existe una considerable diversidad de fármacos de uso clínico, para el tratamiento de diversas enfermedades y síndromes, en las que se ha implicado la inhibición de los canales de calcio tipo T como parte de su efecto terapéutico [79]. Al analizar el efecto de estos compuestos en sistemas de expresión heterólogos, se puede concluir que muchos de estos inducen efectos biofísicos en los canales de calcio tipo T similares a los exhibidos por el TTA-A2, por lo que a dicho conjunto de fármacos podrían clasificarse como “similares al TTA-A2”.

El TTA-A2 es un bloqueador dependiente de estado y cuyos efectos sobre las corrientes de los canales de calcio tipo T lo han hecho atractivo para el tratamiento de desordenes del sueño, efectos antipsicóticos, control de peso, adicción a la nicotina y en el tratamiento del dolor neuropático y patológico relacionado con el síndrome del intestino irritable [86-89, 94-95]. En estas investigaciones, usualmente se atribuye su efecto terapéutico en parte a su actividad diferencial dependiente de estado, además de la inhibición de la corriente de calcio per se. En consecuencia, el TTA-A2 representa un fármaco ideal para tratar condiciones cuya patofisiología incluya la hiperexcitabilidad celular de tejidos que expresen a estos canales.

Recientemente con la identificación de nuevos bloqueadores endógenos y sintéticos de los canales tipo T, los cuales también ejercen efectos farmacológicos del tipo “similar a TTA-A2”, han hecho evidente la necesidad de preguntarse, ¿por qué bloqueadores estructuralmente diversos, exhiben un mecanismo de bloqueo similar al exhibido por el TTA-A2?

La información bibliográfica al respecto es prácticamente nula al momento de iniciar el presente trabajo de tesis, por lo que hasta el momento se desconoce tanto el mecanismo molecular que media la inhibición de los canales de calcio tipo T por cualquier antagonista, así como su sitio molecular de unión. Debido a que el TTA-A2 es uno de los bloqueadores más potentes y selectivos que se han desarrollado para estos canales, aunado al hecho de que este antagonista es representativo de muchos otros bloqueadores dependientes de estado, en el presente trabajo de tesis se considerará al TTA-A2 como el modelo arquetípico de los bloqueadores dependientes de estado. La determinación de su sitio de unión a nivel molecular, ayudará a comprender como este y otros bloqueadores estructuralmente diversos, modulan de forma similar a los canales de calcio tipo T. Asimismo, es probable que paralelamente se obtengan indicios de las diferencias conformacionales que los canales de calcio tipo T adoptan durante la inactivación.

Por otro lado, debido a que aun no se cuenta con la estructura tridimensional de los canales de calcio tipo T, y mucho menos en complejo con algún ligando, el empleo de herramientas computacionales basadas en potenciales físicos y métodos estocásticos de optimización global [96] son una alternativa para producir modos de unión (orientación y conformación adoptada por la estructura tridimensional de un ligando, relativa a la conformación adoptada por el receptor durante su acoplamiento), entre el TTA-A2 y el canal $Ca_v3.1$ (uno de los tres canales tipo T existentes). A partir de dichas simulaciones *in silico* se puede obtener un mapa de interacciones asociadas a los aminoácidos que entran en contacto energético con átomos del ligando. Mutando a los aminoácidos predichos por tales simulaciones, se puede investigar su repercusión en el perfil de bloqueo del TTA-A2, permitiendo así determinar a nivel molecular si los aminoácidos seleccionados son parte del sitio de unión a dicho fármaco.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Debido a que la estructura molecular global entre los miembros de la familia de los canales iónicos activados por voltaje se conserva, es posible generar un modelo de la estructura del canal $\text{Ca}_v3.1$ con base a su homología con otros miembros de esta familia, cuya estructura haya sido resuelta experimentalmente mediante difracción de rayos X.

La predicción del sitio de unión del TTA-A2 en los canales de calcio tipo T, y en general el modo de unión entre un ligando y su receptor, puede deducirse del promedio de un ensamble de modos de unión probables, generados a partir de potenciales físicos calibrados empleando el paradigma computacional de aprendizaje automatizado (*Machine Learning*), implementado por el software de AutoDock Vina.

2.2. Objetivo General

Localizar el sitio molecular de unión del TTA-A2 en el canal $\text{Ca}_v3.1$ y proponer un mecanismo para su efecto antagonista en estos canales.

2.3. Objetivos particulares

- Obtener el modelo de la estructura tridimensional de la proteína del canal $\text{Ca}_v3.1$.
- Realizar simulaciones de acoplamiento molecular entre la estructura del TTA-A₂ y el canal $\text{Ca}_v3.1$.
- Construir canales mutantes del canal $\text{Ca}_v3.1$ en base a las predicciones de simulaciones de acoplamiento molecular.
- Caracterizar las propiedades electrofisiológicas de los canales mutantes y contrastarlos con las del canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre.
- Investigar el efecto antagonista del TTA-A2 en los canales mutantes y compararlos con el del $\text{Ca}_v3.1$ silvestre.
- Generar un mapa de interacciones entre el TTA-A2 y el canal $\text{Ca}_v3.1$ para proponer el mecanismo de bloqueo del TTA-A2 y compuestos relacionados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Construcción de los canales Ca_v3.1 mutantes

El DNA recombinante que expresa al canal Ca_v3.1 de humano (GenBank™ AF190860 [97]) fue donado amablemente por el Dr. Edward Pérez-Reyes de la Universidad de Virginia. Mutaciones en los aminoácidos seleccionados, basados en los resultados de acoplamiento molecular (ver Sección 3.4. y Figura 9), fueron introducidos al canal Ca_v3.1 recombinante empleando la técnica de PCR-SOEing [98-99]. Esta técnica consta de tres reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y cuatro oligonucleótidos específicos que sirven como iniciadores o *primers*. Para generar más de una mutación en la serie de tres reacciones de PCR se diseñaron *primers* degenerados, empleando el programa DNAsis (Hitachi, Ltd., San Bruno, CA, EUA) y sintetizados en la Unidad de Biología Molecular (UBM) del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Cada mutación requiere de dos oligonucleótidos, complementarios uno del otro, en donde se introducen las mutaciones deseadas (*primers* mutagénicos), y de otros dos oligonucleótidos (*primers* candado), los cuales son complementarios a la secuencia de DNA del canal Ca_v3.1 y delimitan el tamaño del fragmento mutante que será reemplazado en el canal silvestre (WT) (Figura 7).

Para cada mutante se realizaron dos reacciones de PCR simultáneas: la PCR1 incluyó el *primer* candado sentido (cF) y el *primer* mutante antisentido (xR); la PCR2 incluyó el *primer* candado antisentido (cR) y el *primer* mutante sentido (xF). La cantidad de primer en cada tubo de reacción varió entre 120 y 170 ng, mientras que la cantidad del DNA molde (cDNA del canal Ca_v3.1-WT) en ambos casos se mantuvo en 40 ng. En las reacciones PCR1 y PCR2 se emplearon 2 U de la enzima *Deep Vent* (New England BioLabs, Ipswich, MA, EUA), 5 µl de Buffer 10X, 1 µl de dNTPs (100 mM; Invitrogen, Carlsbad CA, EUA) y suficiente H₂O para alcanzar un volumen final de 50 µl en tubos Eppendorf de 0.2 ml. Las reacciones de PCR se realizaron en tres etapas utilizando un termociclador Veriti (Applied Biosystems, Carlsbad CA, EUA): primeramente un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 30 s; seguido de 33 ciclos consecutivos cada uno de ellos incluyendo tres fases, desnaturalización (30 s a 94°C), hibridación (60 s a 61°C) y extensión (60 s a 72°C). Por último, la tercera etapa consistió de una extensión final de 5 min a 72°C. En la tercera reacción de PCR (PCR3) se utilizó como templado a los productos de la PCR1 y PCR2 en concentraciones equimolares (por lo general 5 µl de cada reacción) y los *primers* candado

correspondientes. El volumen de reacción final se completo con los mismos componentes descritos para las reacciones PCR1 y PCR2, así como las condiciones de termociclado.

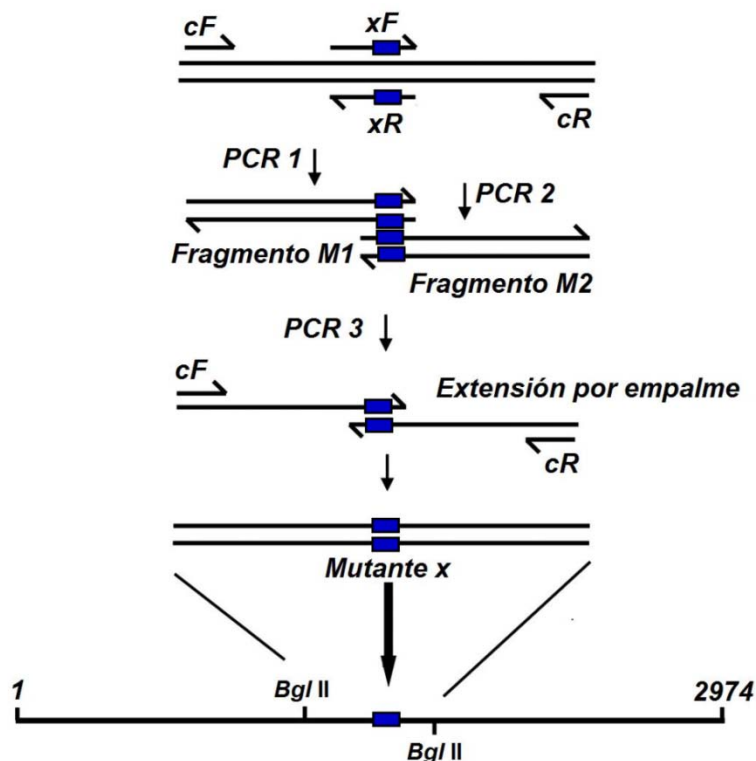


Figura 7. Representación esquemática de la técnica de extensión por empalme utilizada en la construcción de las mutantes de los canales Cav3.1. Se utilizaron tres reacciones de PCR para obtener cada mutante. En la PCR1 y PCR2 se utilizaron *primers* mutantes (indicados como xF y xR), y *primers* canchado (indicados como cF y cR). En la PCR3 se utilizaron únicamente los oligonucleótidos canchado, y se emplearon los fragmentos M1 y M2 amplificados anteriormente para unirlos por empalme y generar un fragmento completo mutante x. Este último se subclonó en el vector pJET1.2/Blunt, para determinar por secuenciación automática las mutantes correctas. El tamaño del fragmento mutante también puede ser verificado por digestión con la enzima *Bgl* II, cuyos sitios flanquean el fragmento ligado.

Los productos obtenidos de PCR-SOEing fueron subclonados en el vector pJET1.2/Blunt del kit *CloneJet, PCR Cloning* (Fermentas-Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) para su posterior amplificación en bacterias *E. Coli* DH5 α . El DNA plasmídico amplificado fue purificado mediante protocolos estándar y enviado a secuenciar a la UBM para verificar la presencia de las mutaciones deseadas. En las clonas positivas se emplearon enzimas de restricción para liberar los fragmentos de DNA mutantes de las construcciones pJET1.2/Blunt-fragmento-Cav3.1-mutante.

Los fragmentos mutantes fueron ligados en el plásmido que contiene la secuencia completa del canal Ca_v3.1 (pcDNA3.1- α 1G), mediante el uso de sitios de enzimas de restricción que permitieron intercambiar el fragmento silvestre por el mutante. Para tal fin se utilizó la enzima T4 DNA ligasa. Todas las construcciones fueron verificadas por secuenciación automática para descartar mutaciones no deseadas y constatar la presencia de las mutaciones insertadas. Posteriormente se amplificaron las clonas positivas empleando bacterias *E. coli*. El DNA fue purificado con el kit *Qiaprep Spin MiniPrep* de Qiagen (Hamburgo, Alemania). El DNA así purificado fue nuevamente enviado a secuenciar para garantizar su identidad molecular.

3.2. Cultivos celulares y transfecciones transitorias

Tanto las clonas silvestres como las construcciones mutantes del canal Ca_v3.1 fueron transfectadas en células HEK-293 de manera transitoria. Las células HEK-293 provienen de un tumor renal de embrión humano y no presentan corrientes de calcio endógenas, por lo cual son un buen modelo para estudiar la expresión heteróloga del canal Ca_v3.1 clonado de humano. Un día antes de comenzar la transfección, las células se crecieron en cajas Petri de plástico de 35 mm de diámetro, bajo condiciones estándar de incubación (95% de O₂ y 5% de CO₂ a 37 C) y en una atmósfera saturada de agua. El medio de cultivo fue DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO, Carlsbad, CA, EUA), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 UI/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin (DMEM complemento). Al día siguiente, cuando las el cultivo celular se encontraba a una confluencia del 85 al 95%, las células fueron transfectadas de manera transitoria con el cDNA de la proteína verde fluorescente (GFP) y con el cDNA de los canales Ca_v3.1 mutantes, siguiendo el método de transfección con *jetPEI* (PolyPlus Transfection, Illkirch, Francia). Después de 24 y hasta 72 h después, el medio de cultivo de las cajas fue retirado por succión con una pipeta Pasteur, las células se lavaron una vez con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS, en mM: 154 NaCl, 3 Na₂HPO₄ y 1.06 KH₂PO₄, pH 7.2). El PBS se retiro y las células se despegaron con 100 μ L de una solución de Hanks balanceada libre de calcio la cual contenía 0.05% de tripsina y 0.53 mM de EDTA. Posteriormente se realizo la disociación de las células de manera mecánica al adicionar 900 μ L de medio DMEM y resuspender con micropipetas de 1 mL. Se traspasaron 200 μ L de esta suspensión a cajas Petri de 35 mm nuevas, y debidamente etiquetadas con el nombre de la mutación correspondiente, en las cuales se habían colocado previamente de 5 a 7 cubreobjetos de vidrio de 25 mm² de área y 1.8 mL de medio DMEM

suplementado. Las células sembradas sobre los cubreobjetos de vidrio se mantuvieron en incubación durante al menos dos horas antes de comenzar con los registros electrofisiológicos y se desechaban pasadas 12 horas.

3.3. Electrofisiología

3.3.1. Soluciones de registro

En todos los experimentos de electrofisiología reportados en este trabajo de tesis se emplearon dos diferentes soluciones externas de registro identificadas como solución 39 y solución 17, cuya composición fue como sigue (en mM): Sol. 19, 160 cloruro de tetraetilamonio (TEA-Cl), 5 CaCl_2 y 10 HEPES; Sol 17, 155 TEA-Cl, 10 CaCl_2 , 10 HEPES. En ambas soluciones el pH se ajustó a un valor de 7.3 con TEA-OH. Las soluciones externas se usaron en combinación con la solución interna de registro (incluida en la pipeta de registro), cuya composición fue (en mM): 135 CsCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 EGTA, 10 HEPES, 4 Mg ATP y 0.3 TRIS GTP, pH 7.3 ajustado con CsOH. Bajo estas condiciones, las corrientes salientes registradas en el canal $\text{Ca}_v3.1$ son acarreadas mayoritariamente por el ion Cs^+ .

3.3.2. Preparación de los compuestos para experimentos de electrofisiología

Los “TTA’s” usados en este trabajo de tesis: TTA-A2 y TTA-Q4 fueron una donación de la compañía Merck (West Point, PA). Los compuestos se disolvieron en DMSO y se prepararon alícuotas a una concentración de 20 mM, las cuales fueron almacenadas a -20 C. El mibefradil (Sigma; St. Louis, MO, EUA) fue disuelto en agua destilada a una concentración de 10 mM. Justo antes de comenzar los experimentos de electrofisiología las soluciones externas de registro fueron suplementadas con los compuestos mencionados para obtener las siguientes soluciones: Sol. 17 + 3 μM TTA-A2, Sol 17 + 3 μM TTA-Q4, Sol 17 + 1.5 μM mibefradil y Sol 17 + 0.015% DMSO, este último fue la máxima cantidad de DMSO añadida en la solución 17 en presencia de cualquiera de los compuestos.

3.3.3. Pipetas de registro

Las pipetas de registro empleadas para los experimentos se construyeron a partir de capilares de borosilicato (TW150-3; WPI Inc., Sarasota, FL, EUA), los cuales fueron cortados con estirador

horizontal modelo P-97 (Sutter Instruments Co., Novato, CA, EUA). Posteriormente se pulieron al calor con una microforja (MF-830; Nerishigue Co. Japón). Para los experimentos de electrofisiología únicamente se emplearon electrodos con resistencias de entre 2 y 3.9 M Ω después de haberlos llenado con la solución interna de registro.

3.3.4. Experimentos de *patch clamp*

El registro de las corrientes macroscópicas producidas por el canal Ca_v3.1 y los canales mutantes, se llevo a cabo empleando la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana, mejor conocida como *patch clamp*, en la configuración de célula completa [66]. El sistema de registro electrofisiológico (*set up*), ilustrado en la Figura 8, consiste de un amplificador de *patch clamp* modelo Axopatch 200B conectado a una interface Digidata 1322 A/D (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Esta última se encarga de convertir las señales analógicas, del circuito eléctrico formado por la célula bañada en la solución de registro y el electrodo ubicado en el cabezal del equipo, en señales digitales para su posterior almacenamiento en una computadora. La actividad de los canales Ca_v3.1 de la célula fue evocada mediante el uso de protocolos de voltaje, los cuales fueron diseñados y ejecutados empleando el programa Clampex del paquete pClamp versión 9.02 (Molecular Devices).

Antes de iniciar los experimentos de electrofisiología, un cubreobjetos con células transfectadas se transportó de la incubadora a la cámara de registro, la cual está montada sobre la platina de un microscopio óptico invertido (modelos Eclipse TE300 o Eclipse 200U, Nikón, Japón), con el que las células fueron visualizadas a un aumento de 200X. Las células fueron bañadas con la solución externa de registro y mantenidas bajo perfusión constante mediante un sistema impulsado por gravedad, con un flujo de aproximadamente 2 mL/min. La selección de soluciones externas de registro fue controlada empleando una válvula de seis vías. Todos los registros se llevaron a cabo a una temperatura de 19 a 23 °C. El registro se inició después de cinco minutos de haber sido colocadas en la cámara de registro, y como máximo, cada hora se substituyó el cubreobjetos por uno nuevo. Únicamente se registraron células aisladas de agregaciones, con una morfología y membrana integra y en ausencia de detritus o algún otro contaminante en su periferia.

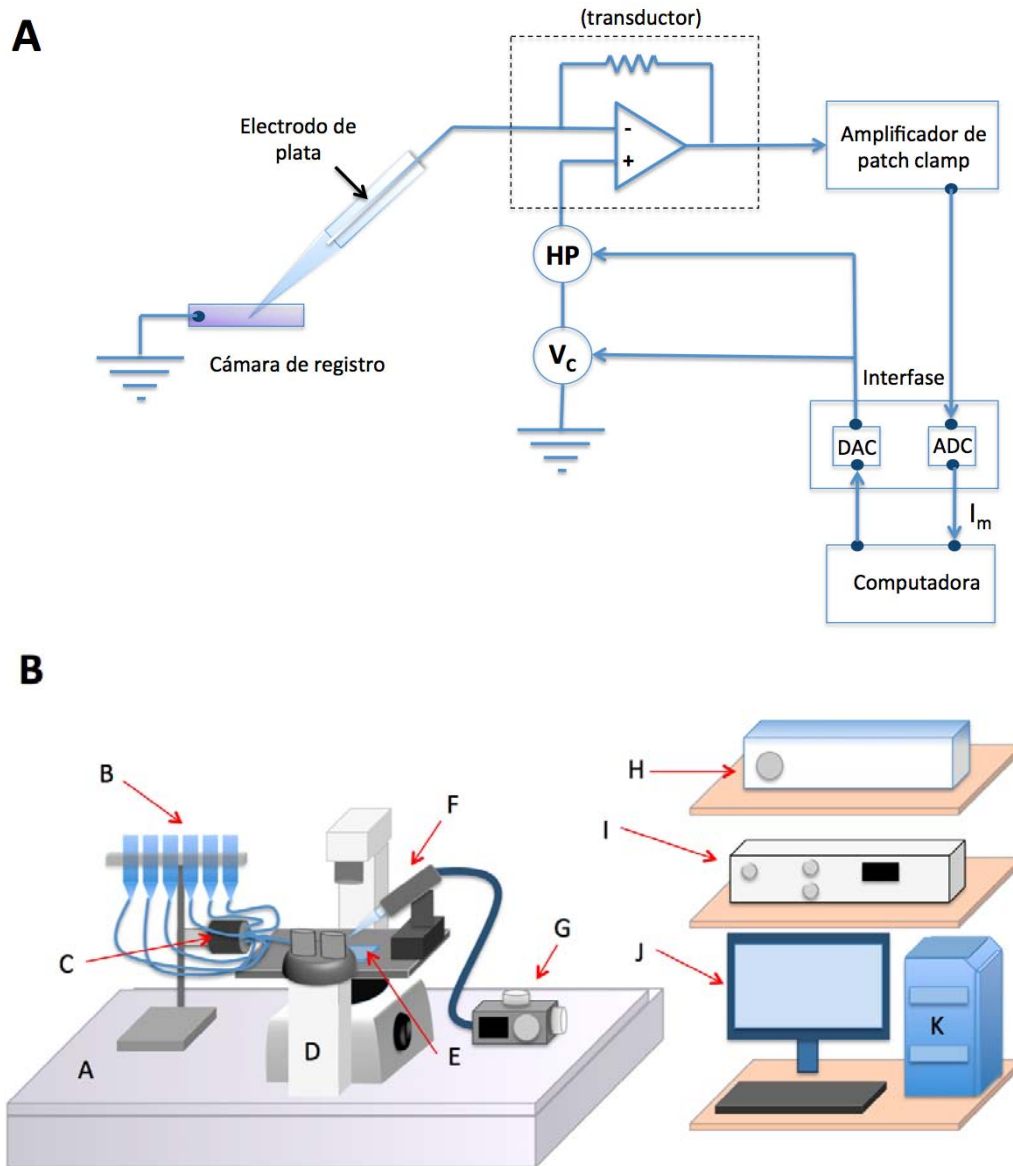


Figura 8. Esquema del sistema de registro empleado en los experimentos electrofisiológicos. **A)** El amplificador operacional incorporado en el cabezal (*headstage*) controla el valor de voltaje impuesto en la célula y al mismo tiempo mide la corriente iónica que fluye a través de la membrana celular. Los pulsos comando (V_c) se generan en el convertidor digital-analógico (DAC) de la interface, mientras que el potencial de mantenimiento HP es suministrado por el amplificador de *patch clamp*. El amplificador permite reducir manualmente las espigas de corriente capacitiva asociadas a la instalación y terminación de los pulsos comando. Las señales de las corrientes iónicas inducidas por V_c fueron digitalizadas mediante el convertidor analógico-digital (ADC) de la interface y almacenadas en el disco duro de una computadora para su posterior análisis. Las corrientes iónicas (I_m) son visualizadas en el monitor de la computadora en tiempo real para apreciar la formación del sello de alta resistencia entre la punta del electrodo y la membrana celular, así como para realizar la cancelación analógica de las espigas capacitivas. **B)** Diagrama ilustrando el *setup* de registro electrofisiológico; (A) mesa anti vibratoria, (B) sistema de perfusión, (C) válvula giratoria de seis vías con una salida común, (D) microscopio óptico invertido, (E) cámara de registro, (F) transductor y electrodo de registro, (G) micromanipulador eléctrico, (H) interface o convertidor A/D y D/A), (I) amplificador de *patch clamp*, (J) monitor, (K) CPU.

Las pipetas de registro conteniendo la solución interna fueron insertadas en el alambre de plata del *holder* (sostenedor) que se encuentra conectado directamente al *headstage* (cabezal) del amplificador de *patch clamp*, para así formar el electrodo de registro. El desplazamiento del electrodo fue controlado mediante el uso de un micro-manipulador eléctrico (Sutter Instruments Co.), el cual permite realizar movimientos micrométricos en las direcciones x, y, z. Empleando los filtros ópticos montados en el microscopio, las células fueron expuestas a radiación electromagnética con una longitud de onda de aproximadamente 488 nm, para así usar la fluorescencia de las células co-transfectadas con el gen reportero GFP como un indicador de éxito de la expresión de los canales.

La técnica de *patch clamp* consiste en la formación de un sello de alta resistencia ($> 1 \text{ G}\Omega$) entre la punta del electrodo de registro y la membrana de la célula. Cuando se alcanza esta condición se aplica un voltaje constante llamado potencial de mantenimiento (HP) a -100 mV, el cual será el potencial de membrana (V_m) durante todo el experimento. Posteriormente se rompe el sello permitiendo que la composición iónica del medio intracelular se equilibre casi instantáneamente con la de la solución interna contenida en la pipeta de registro. Finalmente se cancelan de manera analógica las espigas de corriente capacitiva asociadas a la instalación y corte de pulsos breves hiperpolarizantes de 5 mV. Una vez llegado a este punto se prosigue a registrar la actividad de los canales $\text{Ca}_v3.1$ presentes en la membrana plasmática de la célula empleando diversos protocolos de voltaje los cuales se describen en la siguiente sección.

3.3.5. Protocolos de voltaje

Como se describió en la sección 1.2.3.2, manipulando el valor de V_m es posible controlar los cambios conformacionales que adoptan los canales iónicos activados por voltaje. Estas transiciones pueden detectarse a través de la medición de las corrientes que generan en respuesta a diferentes protocolos de voltaje, los cuales consisten en pulsos de voltaje que varían en amplitud, duración y frecuencia. Antes de estudiar el efecto del TTA-A2 en los canales mutantes, fue necesario caracterizar sus propiedades biofísicas para poder contrastarla con la del canal silvestre y así evaluar de manera objetiva el efecto del TTA-A2. Para ello se emplearon los siguientes protocolos de voltaje. En todos los casos el potencial de mantenimiento HP fue fijado a -100 mV.

- ***sp-30150:*** A partir del HP se aplican pulsos despolarizantes a -30 mV de 150 ms de duración, aplicados cada 10 s (0.1 Hz). Bajo las condiciones de registro de nuestro laboratorio se ha establecido que las corrientes de calcio (I_{Ca}) en los canales Ca_v3 , alcanzan su valor máximo alrededor de -30 mV (con 5 mM de Ca^{2+} como acarreador de carga). Este protocolo fue el empleado para monitorear el patrón de bloqueo del TTA-A2 en el canal $Ca_v3.1$ y los canales mutantes.
- ***IV-100:*** Este protocolo consiste de una serie de pulsos de 100 ms de duración a voltajes que van desde -80 hasta +80 mV, en incrementos de 10 mV. Los datos obtenidos en este protocolo permiten construir curvas corriente-voltaje ($I-V$), las cuales representan la dependencia al voltaje de la corriente generada por los canales bajo estudio. Los registros de corriente obtenidos con este protocolo también permiten evaluar el curso temporal con el que se desarrollan las corrientes a los voltajes explorados.
- ***Hinf10ms-100:*** Este protocolo está diseñado para cuantificar la inactivación en el estado estacionario mediante la aplicación de dos pulsos de voltaje. El primero es un prepulso de 10 s de duración a diferentes valores de V_m , desde -110 hasta -40 mV. El segundo es un pulso de prueba a -30 mV con duración de 200 ms. El propósito del prepulso de larga duración es promover la transición de los canales del estado cerrado (reposo) al estado inactivado al potencial aplicado. El segundo pulso evoca la corriente de calcio generada por los canales que no se inactivaron durante el prepulso. Usualmente se grafican los resultados normalizando la amplitud de las corrientes registradas a -30 mV. Estos gráficos muestran la disponibilidad de canales a diferentes voltajes y como se mencionó en los antecedentes, con este protocolo se verificó la preferencia del TTA-A2 para bloquear canales en el estado inactivado, desplazando las curvas de disponibilidad hacia la izquierda.
- ***Recover-100:*** Mediante el empleo de este protocolo se estudió la recuperación de los canales del estado inactivado. Desde -100 mV, se aplican dos pulsos de voltaje a -30 mV con duraciones de 100 y 20 ms respectivamente. El intervalo de tiempo que separa ambos pulsos varió entre 1 y 2000 ms.

- **IIV2ms60-2ch:** Este protocolo se emplea para estudiar la desactivación o cierre de los canales $\text{Ca}_v3.1$. A partir del HP se aplica un pulso de corta duración (2 ms) a +60 mV con la finalidad de activar prácticamente todos los canales presentes en la membrana pero sin permitir que se inactiven. Después de los 2 ms del pulso a +60 mV, la membrana es repolarizada a diferentes valores de V_m , desde -120 hasta +80 mV, en incrementos de 10 mV con duración de 40 ms. Este protocolo de voltaje propicia la generación de colas de corriente, las cuales reflejan el cierre de los canales abiertos por el pulso a +60 mV. Al realizar el gráfico de la amplitud de cada una de las colas de corriente en función del potencial de repolarización se pueden construir curvas I - V instantáneas (haciendo referencia a la corriente “instantánea” generada por los canales abiertos a +60 mV). Además, el ajuste de cada una de las colas de corriente con funciones exponenciales permite determinar el curso temporal con el que se cierran los canales.

Como en cualquier sistema de fijación de voltaje, la calidad de los registros depende directamente de la constante de tiempo (τ) con la que se instalan los cambios de voltaje en la membrana inducidos por el amplificador de *patch clamp*. Esta constante de tiempo es el resultado del producto $C_m R_s$, en donde C_m es la capacitancia de la membrana y R_s la resistencia en serie (es decir, la suma de la resistencia de acceso a la célula y la resistencia del electrodo de registro). Para garantizar una excelente resolución temporal en el registro de las corrientes, es necesario que el producto no exceda los 40 μs . Esta restricción limita el tamaño de las células que se pueden registrar. El objetivo central del presente trabajo se enfoca en la medición de la amplitud de las corrientes a -30 mV, cuya amplitud y cinética no es modificada mayormente por la restricción mencionada. En este contexto, considerando que algunas mutantes generaron corrientes de calcio muy pequeñas y que la amplitud de las corrientes está directamente relacionada con el valor de C_m de las células, en algunos casos se aceptaron registros de corrientes cuyo valor de τ de fijación de voltaje fue cercano a los 65 μs . Las señales de corriente registradas fueron filtradas a 5 kHz con el mismo filtro del amplificador de *patch clamp*. La corriente de fuga asociada a la configuración de célula completa fue restada *off-line* de las corrientes iónicas usando el algoritmo de resistencia pasiva de Clampfit que es parte del programa pClamp.

3.3.6. Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron analizados empleando el programa Clampfit de pClamp 9.2 en combinación con los programas Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) y Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). La dependencia al voltaje en la activación de las corrientes de calcio producidas por los canales $Ca_v3.1$ se obtuvo a partir del protocolo *IV-100* y los datos experimentales se ajustaron con la siguiente ecuación de Boltzmann modificada:

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

En donde I_{Ca} es la corriente al pico de un voltaje en particular, I_{max} es la corriente máxima observada, V_m es el potencial de membrana, V_{rev} es el potencial de inversión de la corriente, $V_{1/2}$ es el voltaje al cuál se alcanza el 50% de la corriente máxima y k , es la pendiente de la relación. Los datos de la inactivación en el estado estacionario de los canales $Ca_v3.1$ se ajustaron con la siguiente función de Boltzmann:

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

donde I es una fracción de corriente a un voltaje particular, $V_{1/2}$ es el voltaje al que se inactivan la mitad de los canales disponibles (los demás términos tienen el mismo significado que para la Ecuación 1).

La cinética de las corrientes de calcio obtenidas mediante el protocolo *IV-100* se analizó realizando un ajuste con dos funciones exponenciales de cada uno de los trazos obtenidos, lo que permitió obtener las constantes de tiempo (τ) de activación e inactivación. Por otra parte, el curso temporal del cierre de los canales $Ca_v3.1$ se calculó a partir de las colas de corriente obtenidas al aplicar el protocolo *IIV2ms60-2ch*. El decaimiento de la corriente al repolarizar la membrana (colas de corriente) se ajustó con una función exponencial simple, con lo que se obtuvo la constante de tiempo con la que el canal se cierra. De igual forma, los datos de la recuperación de la inactivación, obtenidos con el protocolo *Recover-100*, se ajustaron con una función exponencial para obtener la constante de tiempo de recuperación (τ_h).

Todos los resultados se expresan como el promedio \pm el error estándar (EE) de los valores obtenidos en diferentes células. La comparación entre los promedios para determinar la significancia estadística se llevó a cabo con la prueba *t* de Student para muestras no pareadas. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de *P* fue inferior a 0.05.

3.4. Modelado por homología de la estructura tridimensional del canal Ca_v3.1

A la fecha no existe un procedimiento único e infalible que permita determinar la estructura de una proteína empleando exclusivamente modelado por homología, así como tampoco una herramienta, que permita detectar de forma precisa, si alguna de las estructuras generadas *in silico* se correlaciona con la estructura que la proteína adopta de forma nativa. Por esta razón, la estrategia empleada en lo que concierne a este rubro, es un procedimiento desarrollado para este trabajo, mismo que será descrito en la sección de resultados (Sección 4.4).

3.5. Simulaciones de acoplamiento molecular

Las simulaciones de acoplamiento molecular (*Docking*), se realizaron con el programa AutoDock/Vina 1.1.2 [96]. El modelo del compuesto TTA-A2 se obtuvo a partir de su estructura química empleando los programas Vega ZZ [100], Free Maestro (Schrödinger Release 2014-3: Maestro, version 9.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) y de la base de datos ZINC [101].

La asignación de las cargas parciales y los átomos de hidrógenos no polares en los modelos del canal Ca_v3.1 y el ligando TTA-A2 se llevó a cabo con el programa AutoDockTools (ADT) [102]. Las rotaciones de los enlaces químicamente permitidos del ligando y en las cadenas laterales de aminoácidos seleccionados del receptor, fueron asignados con la interfaz gráfica de ADT. El espacio de búsqueda y el análisis de los resultados fue realizado empleando el software PyMOL (DeLanoScientific, 2009), con la ayuda del *plugin* de Autodock/Vina de Seelinger's [103].

En general los algoritmos de *docking* calculan los modos de unión que un ligando adopta en un volumen definido que contenga átomos del receptor, y a este volumen se le denomina usualmente como espacio de búsqueda. AutoDock Vina define el espacio de búsqueda, en Angstroms, como el volumen ocupado por un paralelepípedo de dimensión X, Y, Z. Vina ha demostrado un alto grado de éxito en la predicción de la conformación que un ligando adopta en su receptor, cuando el espacio de búsqueda tiene un tamaño máximo de dimensiones 30 x 30 x 30 Å [96]. Para poder

definir espacios de búsqueda más grandes, es necesario aumentar el valor del parámetro *exhaustiveness* (*e*), el cual se define con un número entero positivo mayor a 9, siendo 9 el valor predefinido. A continuación se describirá de forma breve la manera en que se prepararon los archivos para las simulaciones.

3.5.1. Simulaciones de acoplamiento molecular en el modelo del canal Ca_v3.1 basado en la estructura del canal KcsA

Previamente en el laboratorio se produjo un modelo tridimensional del dominio del poro del canal Ca_v3.1 [104], basado en la estructura obtenida por difracción de rayos X del canal de potasio KcsA (PDB, *Protein Data Bank*: 1K4C), el cual es activado por pH [105]. El modelo previo del canal Ca_v3.1 consistía entonces únicamente de la estructura formada por los segmentos S5 y S6 de cada uno de los cuatro dominios de la subunidad $\alpha 1$ y las asas extracelulares que los unen. Empleando este modelo, se definieron cuatro regiones como espacios de búsqueda en el formato reconocido por el algoritmo de *Vina* y las cuales se describen a continuación.

Sitio 1. Región extracelular del dominio del poro del canal Ca_v3.1. Coordenadas del centro del espacio de búsqueda: $x = 150.32$, $y = 151.029$, $z = -15.593$. Dimensión del espacio de búsqueda (en Å): $x = 36$, $y = 20$, $z = 22$.

Sitio 2. Cavidad central del dominio del poro del canal Ca_v3.1. Coordenadas del centro del espacio de búsqueda: $x = 154.32$, $y = 134.029$, $z = -19.593$. Dimensión del espacio de búsqueda (en Å): $x = 30$, $y = 24$, $z = 30$.

Sitio 3. Región intracelular del dominio del poro del canal Ca_v3.1. Coordenadas del centro del espacio de búsqueda: $x = 145.32$, $y = 110.029$, $z = -30.593$. Dimensión del espacio de búsqueda (en Å): $x = 33$, $y = 23$, $z = 23$.

Sitio 4. Poro de conducción y cavidad central del canal Ca_v3.1. Coordenadas del centro del espacio de búsqueda: $x = 150.32$, $y = 143.029$, $z = -15.593$. Dimensión del espacio de búsqueda (en Å): $x = 31$, $y = 31$, $z = 26$.

En todos los casos el parámetro *e* (*exhaustiveness*) fue fijado en 200 y se realizaron 10 repeticiones por cada sitio. Durante las simulaciones, el receptor se mantuvo estático, (*i.e.*, ningún aminoácido adoptó diferentes conformaciones durante las simulaciones), mientras que al ligando se le permitió adoptar diferentes conformaciones en función de sus enlaces móviles según las predicciones de ADT. Cada corrida produjo nueve predicciones de las coordenadas de los modos de unión que el TTA-A2 pudo adoptar en el Ca_v3.1, así como sus respectivas energías asociadas, ordenadas de menor a mayor por la función de energía de AutoDock Vina, dando un total de 360 conformaciones. Los datos fueron procesados empleando el software *Mathematica* 9, (Wolfram Research, Inc., Mathematica, Version 9.0, Champaign, IL. 2012). Se seleccionaron el 15% de las conformaciones con las menores energías, estas estructuras fueron analizadas visualmente y separadas en grupos, la conformación con un mayor número de repeticiones en el ensamble así construido, se seleccionó para los posteriores experimentos de mutagénesis y electrofisiología.

3.5.2. Simulaciones de acoplamiento molecular en los nuevos modelos del canal Ca_v3.1

Teniendo en cuenta que no existe un método eficaz que permitan detectar cual de las estructuras del canal Ca_v3.1 producidas durante la etapa de modelado, es la más próxima a su conformación nativa, en lugar de emplear un único modelo durante las simulaciones de acoplamiento molecular, se emplearon un conjunto de modelos, seleccionados como los más probables a representar la estructura del canal Ca_v3.1 en un estado pre-abierto (ver Sección 4.4.1). Las reglas usadas para seleccionar estos modelos, se describen en la Sección 4.4.2 y los detalles de los procedimientos empleados para realizar las simulaciones de acoplamiento molecular en este ensamble, son descritos en las secciones 4.4.3 y 4.6.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La importancia de la investigación y desarrollo de moléculas altamente selectivas y potentes en la modulación de los canales de calcio tipo T ya ha sido puntualizada en la Introducción. Por esta razón es importante enfatizar en este momento la relevancia de los resultados aquí presentados, siendo los primeros en dilucidar las bases moleculares de la acción de un antagonista potente y selectivo de los canales de calcio tipo T. Lo anterior abre el camino para el diseño racional de fármacos, así como la posibilidad de desarrollar terapias basadas en el mecanismo molecular empleado por el fármaco bajo prescripción, para modular a estos canales. Los resultados no solo se limitan a la presentación de un modelo de interacciones (Receptor-Ligando), consistente con los resultados experimentales obtenidos en este trabajo y en el publicado por otros grupos de investigación, por el contrario, también se propone un mecanismo molecular por el cual el antagonista TTA-A2 inhibe la función del canal de calcio $\text{Ca}_v3.1$. Como se mostrará más adelante, estas interacciones involucran aminoácidos de los dominios III y IV, y las conformaciones que estos adoptan cuando el canal está inactivado.

4.1. Acoplamiento molecular del TTA-A2 en un modelo del dominio del poro del canal

$\text{Ca}_v3.1$: selección y construcción de mutaciones

Utilizando un modelo tridimensional del dominio del poro del canal $\text{Ca}_v3.1$, en el laboratorio se obtuvo previamente un mapa de interacciones entre el TTA-A2 y el canal $\text{Ca}_v3.1$, el cual muestra como los átomos de la proteína se acoplan energéticamente con los átomos que constituyen al compuesto. El primer objetivo del presente trabajo de tesis consistió en la realización de nuevas simulaciones de acoplamiento molecular, empleando una estrategia para explorar de manera más exhaustiva las conformaciones que el ligando puede adoptar en diferentes regiones de la proteína (ver métodos, sección 3.5). Como resultado se obtuvo un mapa de interacciones diferente al generado inicialmente. Para tener una mayor probabilidad de éxito en la localización experimental del sitio de unión del TTA-A2 en el canal $\text{Ca}_v3.1$, se decidió utilizar ambos mapas de interacciones obtenidos hasta el momento, y así explorar dos regiones diferentes de la proteína. Mediante un análisis visual de las interacciones de los dos posibles sitios de unión, se seleccionaron dos aminoácidos de cada uno de ellos para ser mutados por diversos aminoácidos como se indica en la Figura 9.

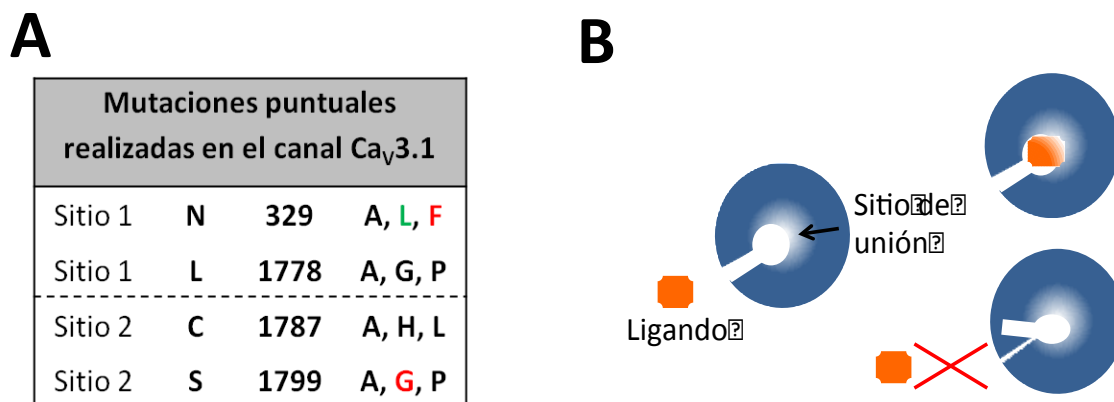


Figura 9. Mutaciones y modelo de acoplamiento receptor-ligando. **A)** Empleando el código de una sola letra, se identifican los cuatro aminoácidos (N, L, C y S), así como su posición en la secuencia completa de la proteína del canal Ca_v3.1 (UniProt ID: O43497-2), que fueron mutados por los residuos indicados a la derecha de cada uno de ellos. En color rojo se señalan las mutaciones que no se lograron producir y en verde las mutaciones que no fueron investigadas, (ver Sección 4.2). N, asparagina; C, cisteína; L, leucina; S, serina; A, alanina; H, histidina; G, glicina; F, fenilalanina; P, prolina. **B)** El modelo de acoplamiento o encaje inducido, indica que tanto el receptor como su ligando efectúan los cambios conformacionales necesarios para encontrar el acoplamiento energéticamente más favorable [106]. En principio la destrucción completa o parcial del sitio de unión, o de la ruta de acceso, mediante una deformación local, tendría que evitar que el compuesto se acople a la proteína de manera completa o parcial.

En general, para comprobar experimentalmente los resultados obtenidos en simulaciones de *docking*, es usual substituir por alaninas los aminoácidos que forman parte del mapa de interacción predicho, con el fin de afectar la energía de formación (entalpía) o disminuir la energía libre de Gibbs del sistema. La alanina posee como cadena lateral un grupo metilo (CH³), es decir, un solo átomo de carbono enlazando covalentemente a tres átomos de hidrogeno. Cuando un átomo de carbono forma enlaces covalentes simples, este se hibrida en orbitales atómicos SP³ lo cual da lugar a una molécula con un arreglo espacial tetraédrico. Puesto que la electronegatividad de los átomos de hidrogeno y carbono son muy similares, la distribución de carga de esta disposición atómica es muy uniforme, por lo que la alanina posee una cadena lateral poco reactiva que solo puede tener interacciones energéticamente favorables con otras moléculas no reactivas a través de interacciones de Van der Waals [107]. Por esta razón, su introducción sistemática en el sitio de unión, va eliminando los contactos energéticamente favorables que estabilizan a un ligando con su receptor. De esta manera se puede evaluar, mediante algún ensayo, los cambios en la sensibilidad que las proteínas mutantes tienen a un compuesto bajo investigación. A pesar de que cada aminoácido posee propiedades fisicoquímicas únicas que influyen en la estructura secundaria de la cual forman parte, así como de su entorno proteico, (estructura terciaria y cuaternaria), la

substitución de un aminoácido por alanina es la mutación estructuralmente más neutral. De esta forma se puede interpretar que los cambios en la sensibilidad de una proteína a un compuesto se deben a cambios en la afinidad del compuesto por su sitio de unión. Es importante, no obstante, considerar posibles excepciones, ya que el plegado de cada proteína impone restricciones estructurales propias en la identidad de los aminoácidos que la conforman y los efectos producidos por substituciones específicas no son fáciles de predecir.

En el presente trabajo de tesis se decidió abordar el problema de manera contraria a la usual. Debido a los bajos parámetros estéreo-químicos obtenidos para el modelo basado en la estructura del canal de potasio KcsA, en conjunción con la ausencia de referencias previas de los sitios de unión de algún otro compuesto en los canales de calcio tipo T, o de algún reporte de estructura-función que sustentará la probabilidad de los mapas de interacciones predichos, no se tenía mucha certeza en la confiabilidad de los resultados producidos por las simulaciones de *docking* como para invertir todos los esfuerzos en un escaneo de alaninas en los sitios de unión predichos. Por esta razón se consideraron además de las substituciones usuales por alanina, aminoácidos que pudieran producir alteraciones en la estructura secundaria, como lo son la glicina y prolina, cuyos ángulos de torsión principales (ϕ , ψ) poseen un rango de valores inusuales con respecto a los demás aminoácidos [108]. Se incluyeron también aminoácidos cuyas cadenas laterales pudieran causar alteraciones locales debido a su volumen de ocupación, lo cual podría dar lugar a reordenamientos en los átomos adyacentes, modificando así el sitio de unión del TTA-A2. Uno de los principales inconvenientes de esta estrategia es la posible producción de canales no funcionales, además de que los resultados positivos no conducen a una interpretación directa, por lo que se requiere de pruebas adicionales para evitar una interpretación incorrecta de los resultados.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se procedió a generar los canales mutantes del canal Cav3.1 como se describió en la Sección 3.1. (Materiales y Métodos). Cada una de las mutaciones fue verificada mediante secuenciación automática, comprobando así la presencia exclusiva de la mutación introducida. Paralelamente a la producción de los canales mutantes y a la caracterización de sus propiedades biofísicas, se decidió generar un nuevo modelo tridimensional del canal de calcio Cav3.1 con las últimas herramientas que el estado del arte en este rubro provee, con el fin

de contar con un modelo más fiable para realizar nuevas simulaciones de acoplamiento molecular cuyos resultados puedan reforzar los resultados obtenidos previamente, o bien producir nuevos resultados para ser validados experimentalmente. A continuación se presentan los resultados de la caracterización electrofisiológica de los canales mutantes y posteriormente se presentarán los resultados del nuevo modelo del canal Cav3.1.

4.2. Propiedades biofísicas de los canales mutantes

Con el propósito de relacionar los resultados de estructura (obtenidos en las etapas de modelado y acoplamiento molecular) con los resultados de función (provenientes de los experimentos de electrofisiología, en los que se investigó el efecto del TTA-A2 en la actividad de los canales Cav3.1 mutantes), se consideró necesario conocer primero las propiedades biofísicas de los canales mutantes y cómo éstas difieren del canal Cav3.1 silvestre (WT). En total se construyeron nueve canales mutantes: N329A, L1778A, L1778G, L1778P, C1787A, C1787L, C1787H, S1799A y S1799P en tres de los cuatro aminoácidos indicados en la Figura 9. Con lo que respecta a las mutaciones en N329, la mutación por alanina no fue funcional, ya que de las seis células investigadas ninguna de ellas expuso corrientes, motivo por el cual no se pudo estudiar el efecto del TTA-A2 en esta mutante. Por otra parte, las mutantes N329L y N329F no se produjeron puesto que conforme avanzo el trabajo de modelado y los experimentos de electrofisiología, el interés por investigar la substitución en N329 disminuyó, debido a que se encontraron otros aminoácidos más prometedores para el objetivo global del proyecto. La mutante S1799P generó corrientes cuyas amplitudes fueron muy pequeñas (9.9 ± 2.8 pA/pF, $n=10$: 5 células con 5 mM de Ca^{2+} y 5 con 10 mM de Ca^{2+}). Por esta razón no se realizó la caracterización biofísica de sus propiedades con los diversos protocolos de voltaje enlistados en la sección de Materiales y Métodos. Sin embargo, como se discutirá más adelante, esta mutante fue útil para dilucidar el sitio de unión del TTA-A2. En las siguientes cuatro secciones se presentan y discuten los resultados de las propiedades biofísicas de las mutantes estudiadas.

4.2.1. Dependencia al voltaje de la activación

Como se discutió en la sección 1.2.3.2, en registros de célula completa, la población de canales que transitan del estado cerrado al abierto, y posteriormente al estado inactivado, ocurre en diferentes proporciones y a diferentes velocidades (cinética de las corrientes) dependiendo del valor del potencial de membrana, lo cual genera corrientes macroscópicas como las ilustradas en la

Figura 10A. En el presente trabajo, el efecto macroscópico de estas transiciones se estudio con el empleo del protocolo denominado *IV-100*, con el cual se puede medir la dependencia al voltaje de activación, así como la cinética de las corrientes. En el caso particular de los canales de calcio tipo T, este protocolo genera un patrón característico de corrientes entrecruzadas (“criss-crossing”) en donde el aumento en la despolarización de la membrana va acompañado de un aumento en la cinética de la corriente (Figura 10A). El patrón de entrecruzamiento puede variar su forma dependiendo del gradiente electroquímico presente para el Ca^{2+} en la membrana. Si la concentración de calcio intracelular se mantiene constante, diferentes soluciones externas de registro producirán diferentes patrones de entrecruzamiento. En la Figura 10A se ilustran las familias de corrientes generadas por los canales $\text{Ca}_v3.1$ de la misma célula HEK-293 en presencia, primero de 5, y posteriormente de 10 mM de Ca^{2+} en la solución externa de registro. Como puede observarse en la figura, el efecto más evidente de aumentar la concentración del acarreador de carga al doble es un incremento apreciable en la amplitud de las corrientes, además de que el voltaje al cual se registra la corriente de mayor amplitud cambia de -30 (trazo negro) a -20 mV (trazo azul marino).

En los experimentos de electrofisiología con los canales de calcio tipo T, es usual emplear 5 mM de Ca^{2+} como acarreador de carga en la solución externa de registro; esto permite registrar corrientes de suficiente amplitud para discriminarlas claramente del ruido eléctrico. Sin embargo, debido a que varios de los canales mutantes utilizados exhibieron corrientes de muy pequeña amplitud, se decidió utilizar una solución externa de registro con 10 mM Ca^{2+} , con la finalidad de registrar corrientes más grandes en dichos canales y poder cuantificar adecuadamente el efecto antagonista del TTA-A2. No obstante, la parte inicial de la caracterización de las propiedades biofísicas de estas mutantes se llevo a cabo empleando la solución a 5 mM de Ca^{2+} . Como se pondrá en evidencia a continuación, los datos obtenidos con 5 mM de Ca^{2+} son extrapolables a los que se pueden obtener a 10 mM de Ca^{2+} .

La caracterización de las corrientes del canal $\text{Ca}_v3.1$, requiere como primer paso calcular la densidad de corriente de cada célula registrada. La amplitud de corriente (en pA) que se registra directamente de los experimentos de patch clamp, es un parámetro extensivo y varía dependiendo del tamaño de cada célula. Con el propósito de eliminar el tamaño de la célula como una variable, en cada una de las células estudiadas se dividió la amplitud de la corriente, evocada a cada valor

de V_m , entre el valor de C_m de la célula bajo estudio. El cociente que se obtiene es una medida de la cantidad de corriente que fluye por unidad de área de membrana (pA/pF), considerando que la capacitancia específica de la mayoría de las membranas biológicas es de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ [1]. En la Figura 10C se grafica la densidad de corriente promedio a cada valor de V_m expresada por los canales $\text{Ca}_v3.1$ indicados, en presencia de 5 y 10 mM de Ca^{2+} respectivamente. Como puede observarse existe una gran variabilidad en la densidad de corriente producida por cada mutante, en comparación con el canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre, la cual es de hecho, independiente de la concentración del acarreador de carga presente en el experimento. Con la finalidad de comparar de manera cuantitativa las posibles diferencias en la dependencia al voltaje de activación de los diferentes canales mutantes con respecto al canal $\text{Ca}_v3.1$ -WT, la densidad de corriente fue normalizada con respecto al pico de las curvas I - V para cada canal y posteriormente estos datos fueron ajustados con una ecuación de Boltzmann modificada (Ecuación 1; Figura 10D), lo que proporcionó los parámetros $V_{1/2}$, k_{act} y V_{rev} , mismos que se resumen en las Tablas 2 y 3.

Los desplazamientos de las curvas I - V , Figura 10D, hacia la izquierda o hacia la derecha con respecto a la curva I - V del canal $\text{Ca}_v3.1$ -WT, son indicativos de variaciones en la dependencia al voltaje de activación. En presencia de 5 mM de Ca^{2+} , los desplazamientos más evidentes fueron los de las mutantes C1787A y, más discretamente C1787L, hacia la izquierda (potenciales más negativos) mientras que hacia potenciales más positivos se desplazó la curva I - V de la mutante L1778A (Figura 10D, grafico de la izquierda). Interesantemente, esta última mutante es la que exhibió las propiedades biofísicas más contrastantes con respecto al control. El valor de $V_{1/2}$ (voltaje al que se activa la mitad de la corriente entrante máxima) se desplazó en la misma proporción que el pico de la curva I - V , ~ 11 mV (Tabla 2), a diferencia de la mutante C1787L, en donde el $V_{1/2}$ también acompañó al desplazamiento del pico a potenciales más negativos pero de manera menos marcada. Para la mutante C1787A el corrimiento de $V_{1/2}$ fue más notorio, y aproximadamente igual al desplazamiento del pico de la curva I - V , ~ 8 mV (Tabla 2). En presencia de 10 mM de Ca^{2+} la mutante C1787A también indujo un desplazamiento en la dependencia al voltaje de la curva I - V (Figura 10D, grafico de la derecha), aunque en este caso el cambio fue de solo 8 mV (Tabla 3).

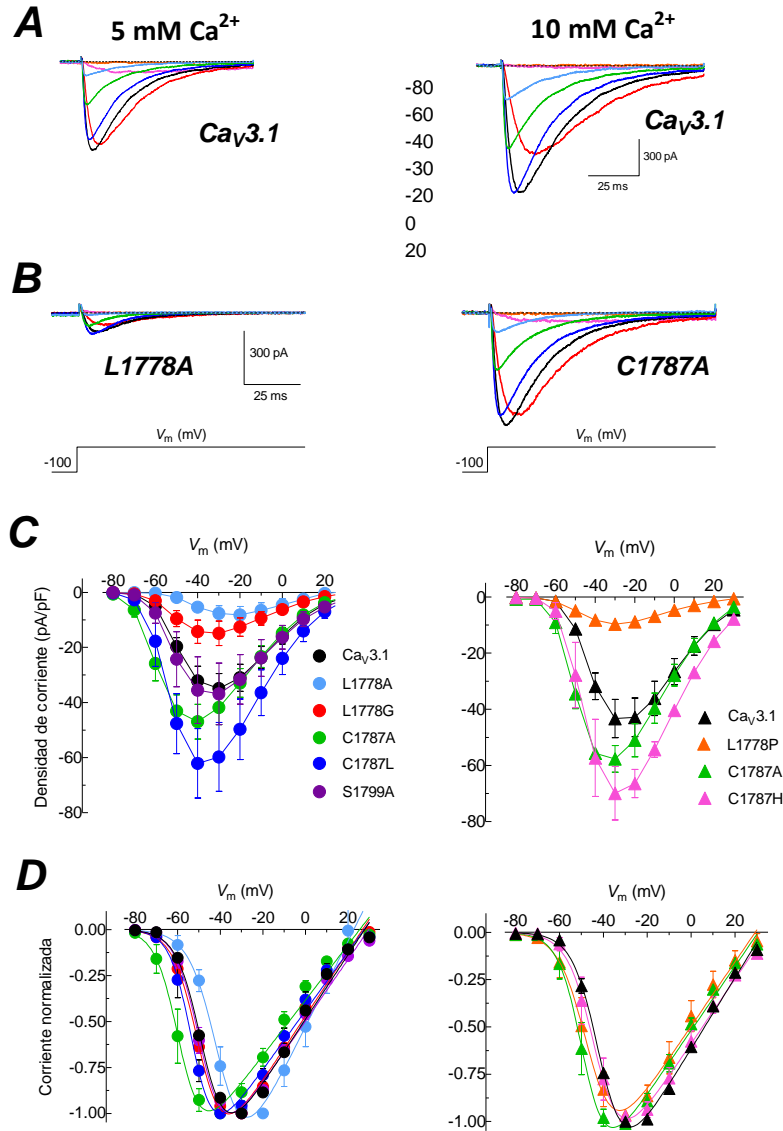


Figura 10. Dependencia al voltaje de la activación de los canales $\text{Ca}_v3.1$ silvestre y mutantes. **A)** Ejemplos de corrientes de Ca^{2+} registradas de una célula HEK-293 transfectada con el canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre en presencia de 5 y 10 mM de Ca^{2+} en la solución externa de registro. Las corrientes fueron evocadas con el protocolo *IV-100* a partir de un HP de -100 mV. Para fines de claridad solo se ilustran los potenciales indicados con los trazos en colores. Nótese que en al aumentar al doble la concentración del acarreador de carga, la amplitud de las corrientes aumentan de manera apreciable y el voltaje al que se alcanza el pico máximo de corriente se modifica de -30 a -20 mV. El mapa de colores muestra el cambio del pico de corriente de -30 a -20 mV para esta mutante con respecto al control. **B)** Ejemplo de la variabilidad de amplitudes de las corrientes generadas por los canales $\text{Ca}_v3.1$ mutantes. La mutante L1778A generó las corrientes más pequeñas de todos los canales mutantes, mientras que los canales de la mutante C1787A produjeron corrientes incluso más grandes que las del canal silvestre (ver paneles en **C**). Ambas mutantes modificaron el valor de voltaje al que se alcanza la amplitud máxima, la primera hacia voltajes más positivos (a -20 mV) y la segunda a valores más hiperpolarizados (a -30 mV), ambas respecto al control. **C)** Curvas *I-V* de la densidad de corriente promedio \pm EE para los canales indicados en presencia de 5 (izquierda) y 10 mM de Ca^{2+} (derecha). **D)** Curvas *I-V* normalizadas para los mismos canales del panel (**C**). Las líneas continuas son ajustes de los datos experimentales con la Ecuación 1, cuyos parámetros se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Propiedades biofísicas de la dependencia al voltaje de activación e inactivación de estado estacionario de los canales $\text{Ca}_v3.1$ silvestre y mutantes en presencia de 5 mM de Ca^{2+}

Canal	pA/pF	n	Activación			n	Inactivación	
			$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	V_{rev} (mV)		$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)
$\text{Ca}_v3.1$	-35.0 ± 5.5	9	-47.8 ± 1.2	5.5 ± 0.1	27.7 ± 1.1	5	-77.8 ± 0.6	5.0 ± 0.2
L1778A	$-8.2 \pm 3.0 \rightarrow$	3	$-39.7 \pm 2.1^*$	$6.3 \pm 0.1^*$	23.2 ± 4.9	1	-77.7	6.1
L1778G	-14.9 ± 4.4	2	-49.3 ± 0.4	5.8 ± 0.6	26.8 ± 0.1	2	-80.4 ± 1.9	5.0 ± 0.1
C1787A	$-47.0 \pm 6.3 \leftarrow$	4	$-58.8 \pm 3.0^*$	$4.7 \pm 0.2^*$	25.2 ± 1.3	3	$-85.3 \pm 0.8^*$	4.2 ± 0.3
C1787L	$-62.1 \pm 12.6 \leftarrow$	3	-52.8 ± 1.6	$4.9 \pm 0.4^*$	27.6 ± 1.8	3	-77.7 ± 3.2	$3.8 \pm 0.1^*$
S1799A	-36.8 ± 11.2	4	-48.5 ± 1.7	5.5 ± 0.2	29.5 ± 0.8	4	-77.9 ± 1.8	4.3 ± 0.1

Valores (promedio \pm error estándar) de los parámetros biofísicos indicados para el canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre y las mutaciones indicadas empleando la solución externa de registro con 5 mM de Ca^{2+} . La densidad de corriente, en pA/pF, es el valor máximo obtenido de las curvas I - V . Las flechas indican la dirección del corrimiento del pico con respecto al control (-30 mV), a la izquierda (a -40 mV) y a la derecha (a -20 mV). Los parámetros de activación, $V_{1/2}$ y k , así como el V_{rev} son el promedio de los ajustes individuales de la relación I - V de cada célula con la Ecuación 1. El $V_{1/2}$ y la k de la inactivación en estado estacionario provienen del ajuste de los datos experimentales obtenidos al aplicar el protocolo *Hinf10s-100* en cada célula estudiada y ajustados con la Ecuación 2. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores del control ($\text{Ca}_v3.1$) se muestran con (*), $p < 0.05$. El número de células para cada condición se muestran en la columna n .

Tabla 3. Propiedades biofísicas de la dependencia al voltaje de activación e inactivación de estado estacionario de los canales $\text{Ca}_v3.1$ silvestre y mutantes en presencia de 10 mM de Ca^{2+}

Canal	pA/pF	n	Activación			n	Inactivación	
			$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	V_{rev} (mV)		$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)
$\text{Ca}_v3.1$	-43.3 ± 6.8	9	-41.0 ± 0.8	5.8 ± 0.3	32.9 ± 1.2	3	-73.4 ± 2.5	5.8 ± 0.7
L1778P	-9.7 ± 1.5	4	-46.4 ± 3.7	5.5 ± 0.2	28.7 ± 3.0	3	-78.8 ± 0.7	6.4 ± 0.6
C1787A	$-57.7 \pm 4.8 \leftarrow$	2	$-48.8 \pm 2.7^*$	5.2 ± 0.1	30.5 ± 0.6	-	-	-
C1787H	-69.9 ± 9.5	3	-43.0 ± 3.3	5.6 ± 0.3	34.2 ± 1.3	3	-71.7 ± 1.9	5.1 ± 0.9

Misma leyenda que en la Tabla 1, con la excepción que en este caso se utilizó la solución externa de registro con 10 mM de Ca^{2+} . El pico de la densidad corriente promedio del canal $\text{Ca}_v3.1$ se obtuvo a -30 mV, aunque la densidad de corriente promedio a -20 mV fue apenas menor.

El voltaje al cual el valor de la corriente se hace cero, para posteriormente invertir su dirección, se le conoce como potencial de inversión, V_{rev} . Modificaciones en el potencial de inversión se relacionan con cambios en la selectividad de los canales Ca_v por el ion Ca^{2+} sobre otros cationes monovalentes [67, 109]. Bajo las condiciones de registro del presente trabajo, las corrientes salientes del canal $\text{Ca}_v3.1$ ocurren a potenciales cercanos a +30 mV (Tabla 2 y 3), y son debidas al flujo del ion Cs^+ a través del canal $\text{Ca}_v3.1$ [110]. Al voltaje que tiene lugar el V_{rev} , la fuerza impulsora del gradiente electroquímico para la permeación del Ca^{2+} al interior de la célula es

menor que la del Cs^+ para salir de ésta. En las mutaciones investigadas en esta sección, este parametro no fue modificado significativamente. Por otra parte, el valor de la pendiente k de las curvas I - V no cambio significativamente con respecto al control en ninguna de las mutaciones evaluadas (Tablas 2 y 3), por lo que la tasa de canales activados por unidad de voltaje aplicado se mantuvo constante. Esto indica que la dependencia al voltaje de activación de los canales mutantes investigados, es prácticamente la misma que la del canal $\text{Ca}_v3.1$.

En la figura 10D se observa como la mutante C1787A presenta el mismo comportamiento en presencia de 5 y 10 mM de Ca^{2+} , es decir, desplazó el pico de la corriente hacia potenciales más negativos y en la misma magnitud con la que desplaza a $V_{1/2}$, ~ -8 mV (Tablas 2 y 3). Tales observaciones nos permitieron inferir que las propiedades biofísicas encontradas para las mutantes que se estudiaron únicamente con 5 mM de Ca^{2+} pueden extrapolarse cuando son estudiadas con 10 mM de Ca^{2+} . Lo anterior se ejemplifica con la mutante L1778P, que se comportó de forma similar a la mutante C1787A, pero en menor magnitud (comparar datos de $V_{1/2}$ en Tabla 3). Por otra parte, a diferencia de la mutante C1787A las mutantes C1787L y C1787H poseen propiedades biofísicas más similares a las del canal $\text{Ca}_v3.1$ (comparar datos de $V_{1/2}$ en Tablas 2 y 3).

4.2.2. Inactivación en el estado estacionario

La inactivación en el estado estacionario es una propiedad que describe la transición de los canales del estado cerrado al inactivado, y es una medida de la proporción de canales que están disponibles para ser activados a diferentes valores de V_m . Esta propiedad biofísica de los canales $\text{Ca}_v3.1$ se exploró mediante el empleo del protocolo de voltaje *Hinf10s-100*, el cual consiste de dos pulsos, uno (prepulso) de larga duración a varios valores de V_m , seguido de un segundo pulso (breve) de prueba siempre a -30 mV. La amplitud de las corrientes registradas durante el pulso de prueba fue normalizada con respecto al valor de la corriente máxima y los datos se graficaron en función del voltaje del prepulso correspondiente (Figura 11A y B). Los datos experimentales fueron ajustados con una ecuación Boltzmann (Ecuación 2, ver Métodos). Los parámetros obtenidos de dichos ajustes se presentan en las Tablas 2 y 3. Las curvas de inactivación en el estado estacionario de la Figura 11A muestran que únicamente la mutante C1787A (círculos verdes) desplaza a la izquierda la proporción de canales inactivados a cualquier voltaje, en relación al canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre (círculos negros). El voltaje al cual se encuentran inactivados el 50% de los canales, cambio de -78

a -85 mV aproximadamente al introducir la mutación C1787A en el canal $\text{Ca}_v3.1$ (Tabla 2). Esta observación es consistente con el efecto de esta misma mutante sobre la activación dependiente de voltaje (Figura 10D, Tabla 2), por lo que se puede decir que la introducción de la alanina en lugar de la cisteína en esa posición, promueve la inactivación de los canales $\text{Ca}_v3.1$ a voltajes más negativos, es decir, requieren menos energía para transitar del estado cerrado al inactivado. No obstante, la proporción de canales inactivados a -100 mV es prácticamente la misma en los canales $\text{Ca}_v3.1$ silvestre y las mutantes investigadas, independientemente de la concentración del acarreador de carga utilizado en los experimentos (Figura 11A y B). En consecuencia, las posibles variaciones en la potencia de bloqueo del TTA-A2 sobre los canales mutantes no serán debidas a un aumento en la fracción de canales inactivados en el estado estacionario a -100 mV.

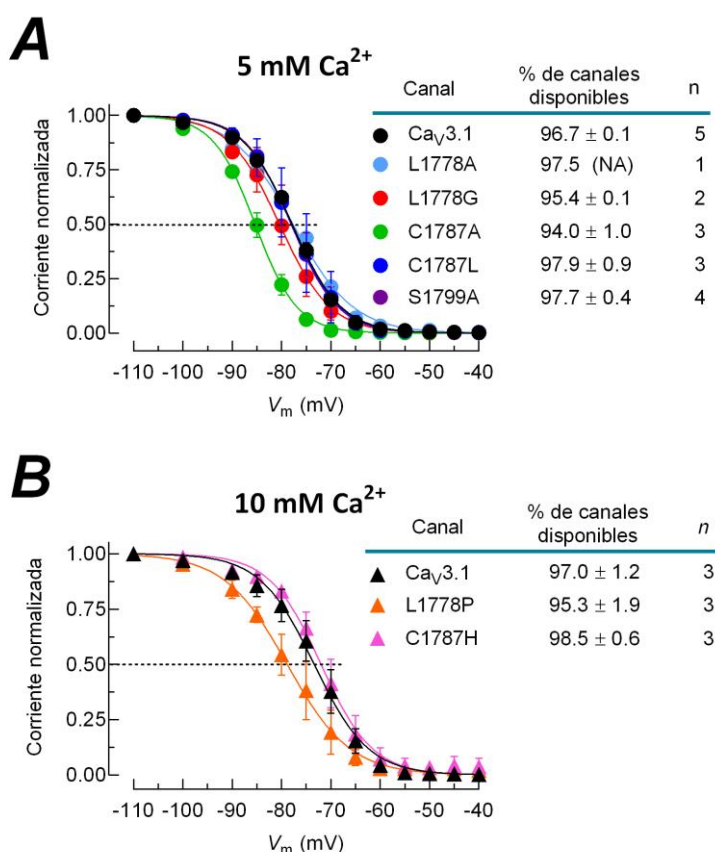


Figura 11. Inactivación en el estado estacionario de los canales $\text{Ca}_v3.1$. Los datos (media \pm EE) muestran la proporción de canales disponibles para ser activados a cada voltaje explorado en el canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre y las mutantes estudiadas en presencia de 5 (A) y 10 (B) mM de Ca^{2+} en la solución externa de registro. Las líneas continuas son el ajuste de los datos experimentales con una función Boltzmann (Ecuación 2), cuyos parámetros se presentan en las Tablas 2 y 3. A la derecha de cada gráfico se presenta el porcentaje de canales disponibles para ser activados a -100 mV, el cual fue el valor de potencial de mantenimiento empleado en los experimentos con el TTA-A2. Los casos en donde solo se cuenta con un dato, no tienen un error estándar asociado y no pueden ser considerados como un resultado definitivo. NA= no aplicable.

4.2.3. Cinética de las corrientes

La evaluación de la cinética con la que la población de canales transita a diferentes estados conformacionales en respuesta a cambios en el V_m se llevo a cabo con la utilización de dos protocolos de voltaje. Primero, los trazos de corriente generados en respuesta al protocolo *IV-100* (como los que se muestran en la Figura 10), fueron ajustados con dos funciones exponenciales, una para la fase de activación y otra para la de inactivación (ver Figura 4), a partir de las cuales se obtuvieron las respectivas constantes de tiempo. Las constantes τ_{act} y τ_{inact} obtenidas fueron promediadas entre grupos de canales y los resultados se graficaron en función del voltaje (Figura 12). Bajo ambas condiciones de registro (5 y 10 mM de Ca^{2+} en la solución externa), los valores de las constantes de tiempo de activación e inactivación disminuyen exponencialmente conforme se despolariza la membrana, principalmente en el intervalo de voltajes entre -50 y -10 mV. A voltajes más positivos la cinética de las corrientes se vuelve independiente de los cambios en voltaje, tal como se ha descrito previamente [35, 111].

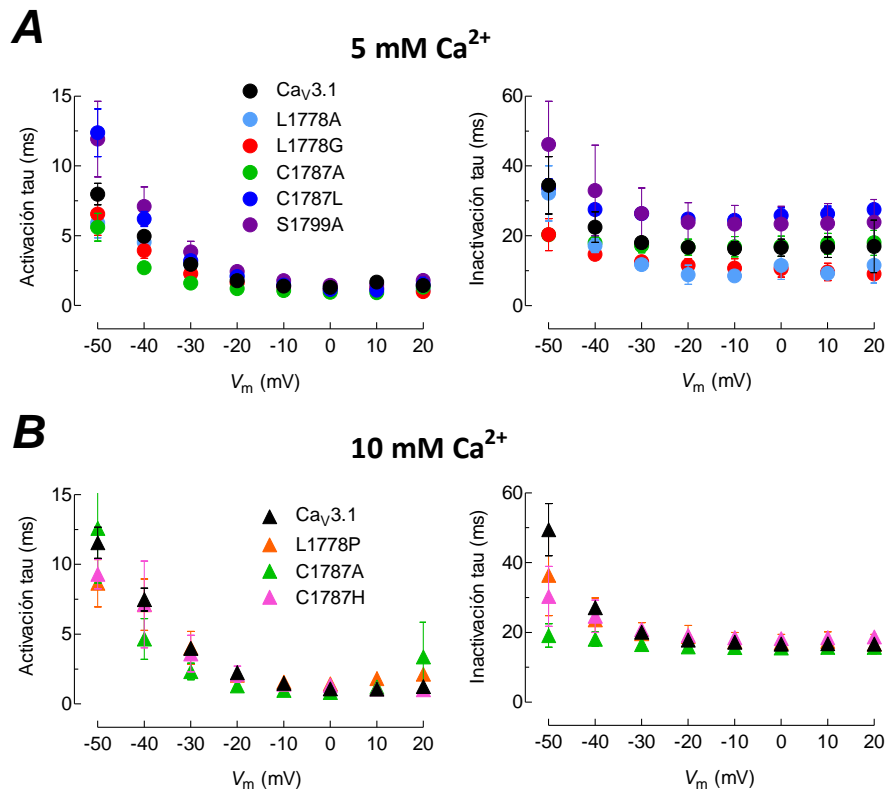


Figura 12. Curso temporal de la activación e inactivación de las corrientes de los canales $Ca_v3.1$. Constantes de tiempo de activación (izquierda) e inactivación (derecha) para las mutantes indicadas en presencia de 5 (A) y 10 (B) mM de Ca^{2+} . Cada punto experimental es el promedio \pm el error estándar de cada grupo de canales a los voltajes indicados. En las Tablas 4 y 5 se presentan los valores de las respectivas constantes de tiempo a -30 mV.

Tabla 4. Propiedades cinéticas de los canales $\text{Ca}_v3.1$ silvestre y mutantes en presencia de 5 mM de Ca^{2+}

Canal	<i>n</i>	τ_{act} (ms)	τ_{inact} (ms)	<i>n</i>	τ_h (ms)
$\text{Ca}_v3.1$	9	3.0 ± 0.3	18.1 ± 0.6	4	125 ± 11
L1778A	3	3.0 ± 0.5	$11.7 \pm 1.0^*$	1	144
L1778G	2	2.3 ± 0.1	$12.6 \pm 1.3^*$	2	109 ± 3
C1787A	4	$1.6 \pm 0.1^*$	17.2 ± 1.0	2	165 ± 40
C1787L	3	3.2 ± 0.1	$26.4 \pm 0.3^*$	1	188
S1799A	4	3.9 ± 0.8	$26.4 \pm 3.7^*$	4	$176 \pm 16^*$

Los valores son el promedio \pm error estándar, con el número de células indicado en las columnas *n*. Las constantes de tiempo (τ) de activación e inactivación se obtuvieron a partir del ajuste con dos exponenciales de los registros de corriente -30 mV (protocolo *IV-100*). La constante de recuperación de la inactivación (τ_h), se obtuvo del promedio de los ajustes con una función exponencial de los valores de la corriente recuperada en función del tiempo a -100 mV (protocolo *Recovery-100*). Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con (*), $p < 0.05$.

Tabla 5. Propiedades cinéticas del canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre y mutantes en presencia de 10 mM de Ca^{2+}

Canal	<i>n</i>	τ_{act} (ms)	τ_{inact} (ms)	<i>n</i>	τ_h (ms)
$\text{Ca}_v3.1$	9	4.0 ± 0.3	20.1 ± 1.2	2	144 ± 10
L1778P	4	4.0 ± 1.2	19.7 ± 3.2	3	148 ± 12
C1787A	2	$2.3 \pm 0.6^*$	16.6 ± 1.8	-	-
C1787H	3	3.6 ± 1.3	20.9 ± 1.6	3	192 ± 27

Misma leyenda que en la Tabla 4. No se realizaron experimentos de la recuperación de la inactivación en el caso de la mutante C1787A.

A potenciales más negativos que -50 mV, así como a aquellos cercanos al V_{rev} , la amplitud de las corrientes es muy pequeña (prácticamente una línea plana) por lo que el ajuste de exponenciales a esas corrientes no es confiable. Por consiguiente, solo se muestran los valores de las taus en el intervalo de -50 a +20 mV, siendo el valor a -30 mV el más relevante para los propósitos del presente trabajo. El único cambio significativo en la cinética de activación fue el observado para la mutante C1787A, cuyo valor de τ_{act} se redujo aproximadamente en un 50% respecto al valor del canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre, tanto en 5 (Figura 12A) como en 10 mM de Ca^{2+} (Figura 12B). Por su parte la inactivación fue afectada principalmente en presencia de 5 mM de Ca^{2+} (Figura 12A). En este caso las mutantes S1799A y C1787L se inactivan más lentamente, mientras que las mutantes L1778 A y G lo hacen en casi la mitad del tiempo que el canal silvestre. Aunque los cambios pudieran ser significativos desde el punto de vista estadístico, funcionalmente son poco relevantes.

Uno de los parámetros más relevantes a considerar cuando se analicen los experimentos con el TTA-A2, es el tiempo de recuperación del estado inactivado, el cual definiremos como el tiempo mínimo necesario para que los canales inactivados, por la aplicación de un pulso a -30 mV durante 150 ms, estén nuevamente disponibles para ser activados y conducir corriente. A nivel molecular, esto implica una transición del canal del estado inactivado al estado cerrado.

Para investigar la recuperación de la inactivación, se empleo el protocolo *Recover-100* (ver Materiales y Métodos). Los datos experimentales se obtuvieron normalizando la amplitud de la corriente registrada en respuesta al segundo pulso despolarizante, respecto a la amplitud del primero, luego se promedió entre grupos de células que expresan el mismo canal y se graficó en función del tiempo que separó a los dos pulsos a -30 mV (Figura 13). Las líneas continuas en dichos gráficos representan el mejor ajuste de cada grupo de datos con funciones exponenciales, mismas que proporcionaron la constante de tiempo de recuperación de la inactivación (τ_h) para cada canal. Dicho valor representa el tiempo promedio necesario para que el 63% de la población de canales se recupere del estado inactivado. No obstante que el canal Cav3.1 silvestre muestra una tendencia a recuperarse más lentamente del estado inactivado en presencia de 10 mM de Ca^{2+} que cuando la concentración de éste se reduce a la mitad, dicha diferencia no es significativa (Tablas 4 y 5). La única mutante con diferencias significativas en este parámetro resultó ser la S1799A, cuyo curso temporal de recuperación de la inactivación fue aproximadamente 40% más lento que el del canal silvestre (Tabla 4). Las mutantes C1787A y L mostraron una tendencia muy similar que la S1799A, pero es probable que debido al bajo número de observaciones las diferencias no fueran significativas. En presencia de 10 mM de Ca^{2+} , por otra parte, la mutante C1787H también recuperó más lentamente pero otra vez sin llegar a ser significativo el cambio (Tabla 5). Estos resultados sugieren que las diferencias observadas en la inactivación del estado estacionario (Figura 11), no tendrán un efecto sustancial en el bloqueo que pueda presentar el TTA-A2. Por lo que en principio, cualquier diferencia significativa observada en este contexto será atribuible directamente a cambios en el acoplamiento del TTA-A2 en su sitio de unión.

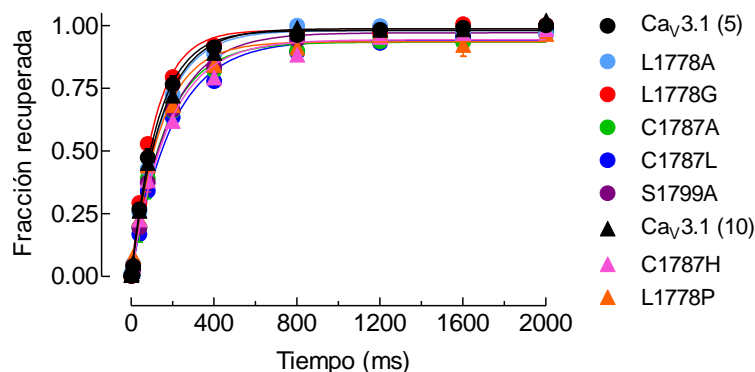


Figura 13. Recuperación de la inactivación. Fracción de corriente recuperada de cada uno de los canales $\text{Ca}_v3.1$ indicados, a diferentes intervalos de tiempo, después de inducir la inactivación de los canales con una despolarización a -30 mV (protocolo *Recover-100*). $\text{Ca}_v3.1$ (5) y $\text{Ca}_v3.1$ (10) son los datos del canal silvestre en presencia de 5 y 10 mM de Ca^{2+} en la solución externa de registro, respectivamente. En consecuencia, las mutantes simbolizadas mediante un triángulo se registraron en presencia de 10 mM de Ca^{2+} . Los datos son el promedio \pm EE. Las líneas continuas son el ajuste de los datos experimentales con funciones exponenciales, cuyas constantes de tiempo (τ_h) se presentan en la Tablas 4 y 5.

4.3. Efecto antagonista del TTA-A2 en los canales mutantes

Previamente, el grupo de Kraus y col. [89] mostraron que en células HEK-293 y en presencia de 2 mM de Ca^{2+} , el TTA-A2 bloquea a los canales $\text{Ca}_v3.1$ con una IC_{50} de 4.1 μM . Bajo las condiciones experimentales del presente trabajo de tesis se estableció que a concentraciones de 3 μM la amplitud de la corriente del canal $\text{Ca}_v3.1$ de humano se reduce aproximadamente en un 60 %. Este porcentaje de bloqueo permite observar adecuadamente variaciones en la disminución o el aumento en la potencia de bloqueo del TTA-A2, por lo que a esta concentración de 3 μM se realizaron la mayoría de los experimentos.

En la Figura 14A se ejemplifican un par de experimentos representativos en los que se estudió el efecto del TTA-A2. En la parte superior de esta figura, se ilustran trazos de corriente a -30 mV (evocados con el protocolo *SP-100*) obtenidos en la condición basal, en presencia de DMSO, de TTA-A2 y después de lavar ambos compuestos, en una célula HEK-293 transfectada con el canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre, y en la parte inferior, en una célula que expresa el canal S1799P. Debido a que el TTA-A2 es poco soluble en agua, se utilizó DMSO para disolverlo. Por ello, en todos los experimentos donde se investigó el efecto del TTA-A2, primeramente se cuantificó el bloqueo de las corrientes del canal bajo estudio por el DMSO. En los experimentos de la Figura 14A la aplicación de DMSO provocó una disminución del 11 y 12% en la corriente de Ca^{2+} del canal

Cav3.1 silvestre y en la mutante S1799, respectivamente (trazos azules). En promedio, el DMSO redujo la amplitud de la corriente de Ca^{2+} en $16 \pm 2\%$ ($n = 68$), dicha reducción fue restada en cada célula del bloqueo registrado en presencia del TTA-A2 (trazos rojos), de tal forma que el porcentaje de bloqueo reportado en este trabajo para el TTA-A2 sobre las corrientes de los canales Cav3.1 y sus mutantes, corresponde exclusivamente a la acción de éste compuesto y no a la acción del DMSO.

A la derecha de los registros de corriente (Figura 14B) se muestra el respectivo curso temporal del cambio en la amplitud de la corriente a -30 mV en respuesta a las diferentes condiciones experimentales investigadas. Tales despolarizaciones se aplicaron hasta que la amplitud de la corriente alcanzo un estado estacionario. En particular, para el caso del TTA-A2, esta condición se logró aproximadamente cuatro minutos después de su aplicación (Figura 14B). Posteriormente, se perfundió la célula nuevamente con solución control (Lavado) permitió recuperar paulatinamente, en un periodo de 4 a 6 min, la corriente bloqueada por el TTA-A2 (trazos verdes), sin embargo, la recuperación fue incompleta, al menos durante dicho tiempo de lavado ($82 \pm 3\%$; $n = 61$).

El porcentaje de bloqueo de las corrientes de calcio por el TTA-A2 en las mutaciones investigadas se resume en la Figura 14C. Ninguna de las tres substituciones por alanina disminuyó significativamente el porcentaje de bloqueo del TTA-A2, lo cual sugiere en primera instancia, que estos aminoácidos no se acoplan energéticamente con este compuesto y por lo tanto ninguno de los aminoácidos predichos por los mapas de interacciones (L1778, C1787 y S1799) forman parte del sitio de unión.

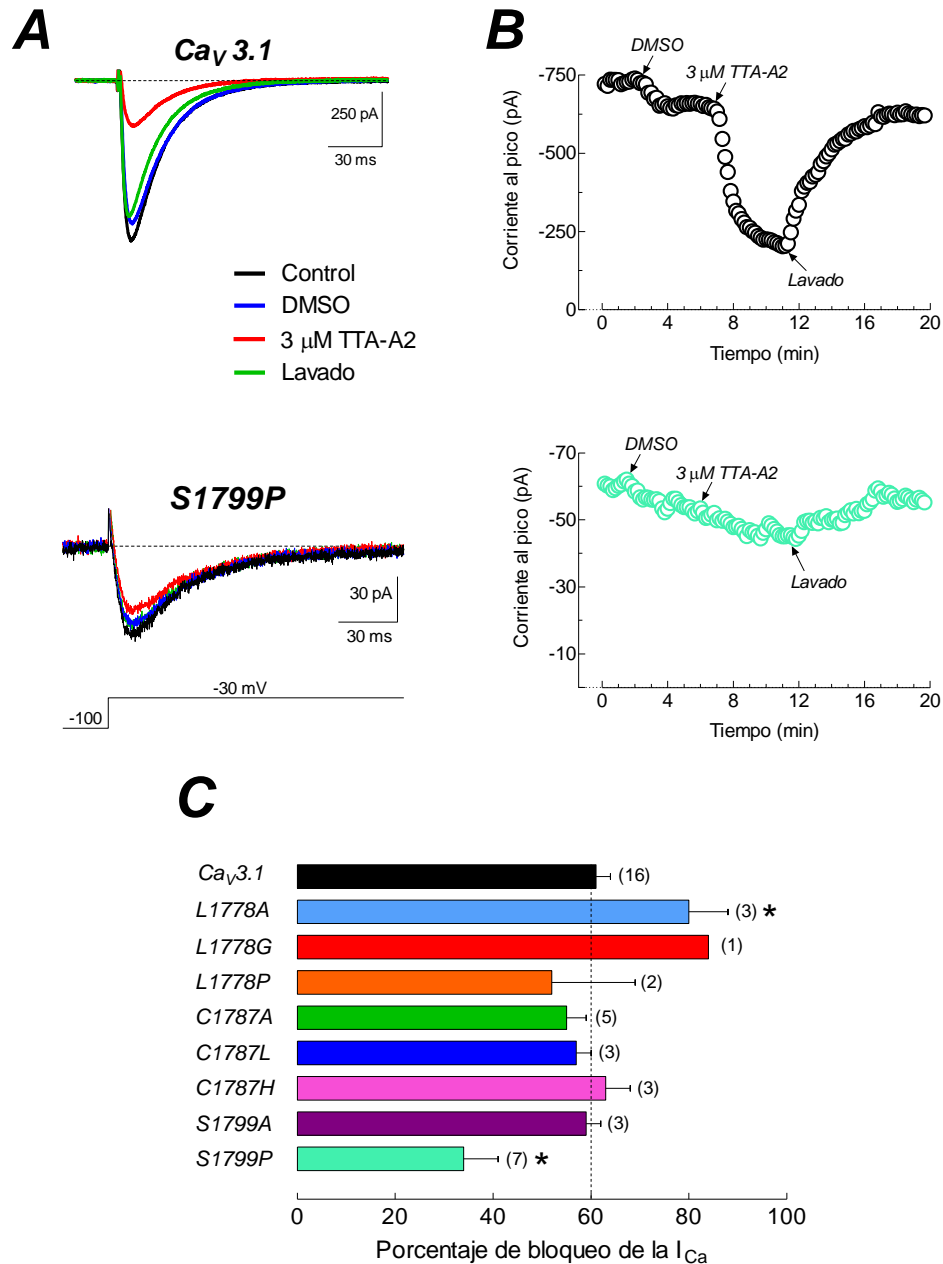


Figura 14. Diferente sensibilidad de las mutantes del canal Ca_V3.1 al bloqueo por TTA-A2. **A)** Trazos representativos de las corrientes de calcio evocadas a -30 mV en el canal Ca_V3.1 y la mutante S1799P en condiciones Control (solución externa de registro con 10 mM Ca²⁺; trazos negros), en presencia de DMSO (0.015%; trazos azules), de 3 μ M de TTA-A2 (trazos rojos), y después de retirar el TTA-A2 y el DMSO (Lavado, trazos verdes). **B)** Curso temporal del bloqueo de la corriente de calcio por las condiciones experimentales indicadas, correspondientes a las mismas células representadas por los trazos en (A). **C)** Porcentaje de la inhibición de la corriente de calcio del canal Ca_V3.1 y las mutantes señaladas inducido por la presencia de 3 μ M de TTA-A2 en la solución de registro externa. Los datos son el promedio \pm EE. Entre paréntesis se indica el número de células investigadas para cada mutante. Las mutantes cuyo porcentaje de inhibición fue estadísticamente diferente con respecto al control (Ca_V3.1) se distinguen con un asterisco ($P < 0.05$).

El perfil de bloqueo obtenido en este tipo de experimentos es dependiente de la frecuencia de los estímulos aplicados (inhibición dependiente del uso). El grupo de Kraus también investigó la diferencia entre el bloqueo tónico y el bloqueo dependiente del uso [89]. Después de exponer los canales $\text{Ca}_v3.1$ al TTA-A2 ($1\mu\text{M}$) por un periodo de 2 min, se observó un bloqueo del 5% en respuesta a la primera despolarización. Mientras que a la frecuencia de 0.1 Hz, la inhibición del TTA-A2 fue del 14% y a 3 Hz el bloqueo aumentó hasta el 69% (ver Figura 6D). El bloqueo dependiente del uso está relacionado con la exposición de un fármaco a las diferentes conformaciones que los canales iónicos activados por voltaje transitan durante despolarizaciones repetidas. Estimulaciones frecuentes aumentan la posibilidad de encontrar canales abiertos y/o inactivados, y por lo tanto, facilitan la acción de los bloqueadores dependientes de estado. En este caso, la afinidad del TTA-A2 por su sitio de unión es mayor en el estado inactivado y el aumento en la inhibición debido al uso se atribuye al enlentecimiento en el tiempo de recuperación del estado inactivado que el TTA-A2 induce en el canal $\text{Ca}_v3.1$, retrasando su recuperación en aproximadamente 3.6 veces con respecto al control [89]. Entonces durante la aplicación de estímulos repetidos, la población de canales acumula estados inactivados entre cada pulso, hasta que se alcanza un estado estacionario, y esto se ve reflejado en la Figura 14B.

Sorprendentemente, la substitución de la leucina 1778 por alanina o glicina produce un resultado opuesto al esperado, propiciando un aumento en el porcentaje de bloqueo de las corrientes de calcio de estas mutantes. Es necesario hacer notar que la mutante L1778G solo fue estudiada en una ocasión en presencia del TAT-A2, por lo que, a pesar de mostrar una tendencia similar a la mutación L1778A, será imperioso realizar más experimentos para confirmar esta observación. Como se ha venido mencionando, el TTA-A2 se une con mayor afinidad a su sitio de unión en estados inactivados del canal $\text{Ca}_v3.1$ [89], por lo que modificaciones que favorezcan la inactivación de los canales podrían explicar este resultado. En este sentido, el tiempo de recuperación del estado inactivado (τ_h) de las substituciones L1778A y L1778G no fue estadísticamente diferente del control (Tabla 4). Asimismo, ambas mutantes poseen una proporción de canales inactivados a -100 mV similares a las del canal $\text{Ca}_v3.1$, (Figura 11), por lo que el aumento en la potencia de bloqueo del TTA-A2 en estas mutantes no puede atribuirse a un incremento en la proporción de canales inactivados en el estado estacionario, ni tampoco a cambios en la recuperación de la inactivación. El único parámetro biofísico que se correlaciona

con el patrón de bloqueo observado en estas mutantes, es la disminución en la constante de inactivación (τ_{inact}) exhibida por las corrientes de estos canales. Tanto L1778A como L1778G se inactivan más rápidamente desde el estado abierto, en comparación con el canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre (Tabla 4). La aceleración en el tiempo de inactivación facilitaría la exposición de dichas mutantes al efecto del TTA-A2, probablemente por acceder más rápido al estado inactivado. Interesantemente, solo estas dos mutaciones aceleraron la inactivación durante la despolarización. Una incógnita que surge a partir de estos resultados, es conocer si el tiempo de recuperación del estado inactivado en presencia del TTA-A2 aumenta con respecto al control. Sin embargo, este tipo de experimentos no fueron llevados a cabo ya que están fuera de los objetivos planteados en esta tesis. Por esta razón tampoco se realizaron los experimentos necesarios para aumentar la confiabilidad de los resultados presentados para estas mutantes.

El sentido opuesto a la mutante L1778A, la mutación S1799P fue significativamente menos sensible al bloqueo por TTA-A2 con respecto al control (Figura 14C). La disminución en el porcentaje de bloqueo de las corrientes de Ca^{2+} por efecto del TTA-A2 en esta mutante puede interpretarse como una modificación directa en la afinidad de este compuesto por su sitio de unión en el canal $\text{Ca}_v3.1$. Por otro lado, el TTA-A2 bloquea la mutante S1799A con una potencia similar que al canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre (Figura 14C). Lo anterior sugiere que la disminución en la potencia de bloqueo del TTA-A2 se debe a un efecto indirecto causado por la introducción de una prolina en esta posición y descarta la posibilidad de una participación directa de la S1799 en la estabilización del TTA-A2 en su sitio de unión.

Adicionalmente, como se puede apreciar en la Figura 15, en un nuevo modelo tridimensional del canal $\text{Ca}_v3.1$ generado con base en la estructura del canal Ca_vAB (PDB ID 4MS2) y obtenido de la etapa de modelado (Sección 4.4), la S1799 del canal $\text{Ca}_v3.1$ forma parte de la hélice alfa que forma al segmento S6 del dominio IV. Esta información está en concordancia con las predicciones de estructura secundaria y las anotaciones del servidor UniProtKB para el canal $\text{Ca}_v3.1$ de humano (UniProt ID: O43497, isoforma 1).

Las distorsiones causadas por prolinas en hélices alfa transmembranales ya han sido documentadas con anterioridad [112-113]. Los efectos de estas substituciones son diversos, siendo los más

comunes el quiebre de la hélice y/o la introducción de una región “flexible” en las proximidades de la prolina [112]. La prolina es el único aminoácido que forma una cadena cíclica entre el átomo de nitrógeno de su esqueleto (*backbone*) y su cadena lateral, por lo que su introducción en una hélice alfa en la posición N, destruye la continuidad de puentes de hidrogeno formados por el oxígeno del grupo carbonilo del aminoácido en la posición N-4 y el nitrógeno del grupo amida del aminoácido en la posición N, además de restringir los ángulos de torsión principales (ϕ , ψ) en esta posición. Por lo tanto, la disminución de la afinidad (bloqueo) del TTA-A2 en la mutante S1799P puede interpretarse como un efecto indirecto causado por el quiebre inducido por la prolina del segmento S6 del dominio IV, o por la ganancia en la movilidad de esta hélice, o por ambas; lo cual sugiere que el verdadero sitio de unión se encuentra conectado de alguna manera por este segmento y en dirección al carboxilo de la secuencia. Esta primera serie de evidencias circunstanciales sobre la ubicación del sitio de unión del TTA-A2 en el canal $\text{Ca}_v3.1$ fueron complementadas y refinadas con la ayuda de la construcción de nuevos modelos tridimensionales de este canal, cuya construcción se describe a continuación.

4.4. Modelado de la estructura tridimensional del canal $\text{Ca}_v 3.1$

Existen diferentes técnicas experimentales que permiten resolver la estructura tridimensional de una proteína. Entre las más comúnmente empleadas se encuentran la difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear (NMR) y la crio-microscopía electrónica, las cuales proporcionan diferentes niveles de resolución de la proteína bajo estudio. Usualmente las estructuras resueltas por difracción de rayos X poseen las mejores resoluciones, permitiendo conocer en los mejores casos, la posición relativa de cada uno de los átomos que constituyen a una proteína. Dilucidar la estructura de proteínas de membrana experimentalmente, es particularmente difícil, debido a que es necesario conservar integro el entorno hidrófobo de las membranas en donde estas se encuentran insertadas, por lo que los pocos casos de éxito, se limitan a proteínas de membrana altamente simétricas, de bajo peso molecular y, en algunos casos, provenientes de organismos extremófilos. Sin embargo, mediante el empleo de cálculos computacionales es posible obtener una aproximación (predicción teórica) de la estructura de una proteína o parte de ella. Estos cálculos se basan en la exploración del espacio de conformaciones que una secuencia de aminoácidos puede adoptar haciendo uso de algoritmos de optimización tales como, métodos Montecarlo, *simulated annealing* [114] o *replica exchange* [115] acoplados a potenciales físicos (tales como potenciales armónicos, Lennard-Jones, etc.), con los cuales es posible hacer

estimaciones de la energía interna de cada conformación generada. Posteriormente la selección del plegado mas probable se basa en la hipótesis de que la estructura que debe adoptar una proteína de manera nativa, es la que posee menor energía. Una de las grandes limitaciones que enfrentan estos métodos es el enorme espacio de conformaciones que se deben explorar antes de lograr encontrar un subconjunto que represente el ensamble de conformaciones con la menor energía. Existen situaciones en las que el número de conformaciones a explorar puede ser reducido drásticamente, haciendo uso de estructuras determinadas experimentalmente cuyas secuencias de aminoácidos sean homólogas a la proteína que se desea modelar. En estos casos, los carbonos alfa de la estructura homóloga se emplean como plantillas, para posteriormente reconstruir las regiones que no fueron alineadas. Estas regiones representan inserciones y deleciones de dos proteínas relacionadas, en un camino evolutivo divergente.

Usando la secuencia de aminoácido del canal Cav3.1 se modeló por homología su estructura, excluyendo las asas intracelulares que unen a cada dominio, así como los extremos amino y carboxilo. De manera breve, tanto el procedimiento como los resultados obtenidos se describen a continuación.

4.4.1 Identificación de estructuras homólogas

La hipótesis fundamental del modelado por homología, se basa en la idea de que la estructura de una proteína se conserva más que su secuencia. Esta hipótesis se ha puesto a prueba experimentalmente tanto en proteínas globulares como en proteínas de membrana. En el caso particular de proteínas de membrana, se ha demostrado que para cualquier par de proteínas homólogas, las regiones insertadas en la membrana presentan una gran similitud estructural, con una desviación estándar promedio entre sus carbonos alfa (C_α) menores a 1.5 Å (RMSD < 1.5 Å), cuando estas comparten un porcentaje de identidad de entre el 20 y 35% [116]. Este antecedente sugiere que se pueden esperar resultados muy favorables si se logra identificar proteínas homólogas al canal Cav3.1 con porcentajes de identidad superiores al 20%.

En la Tabla 6 se muestra el resultado de los alineamientos obtenidos para cada uno de los dominios del canal Cav3.1. Los indicadores relevantes para seleccionar las estructuras que serán

empleadas como plantilla son: el porcentaje de la secuencia que cubre la plantilla (cobertura), el porcentaje de identidad entre secuencias y la resolución con la que fue determinada la estructura.

Tabla 6. Resultados de los alineamientos de cada uno de los dominios del canal Cav3.1

Dominio	Función	Organismo	PDB	Identidad (%)	Cobertura	Resolución (c)
DI (324 aa)	Na _v	<i>Caldalkalibacillus thermarum</i>	4BGN	30	74%	9.0
	Na _v	<i>Arcobacter butzleri</i>	4MS2	26	66%	2.75
	Na _v	<i>Arcobacter butzleri</i>	4MW8	27	66%	3.26
	Na _v	<i>Arcobacter butzleri</i>	3RVY	27	66%	2.70
DII (234 aa)	Na _v	<i>Arcobacter butzleri</i>	4MVZ	26	97%	3.20
	Na _v	<i>Arcobacter butzleri</i>	4MS2	26	97%	2.75
	Na _v	<i>Arcobacter butzleri</i>	3RVY	26	97%	2.70
	Na _v	<i>Alpha Proteobacterium</i>	4DXW	27	98%	3.05
DIII (274 aa)	Na _v	<i>Arcobacter butzleri</i>	4MVQ	24	97%	3.40
	Na _v	<i>Arcobacter butzleri</i>	4MS2	24	97%	2.75
	Na _v	<i>Arcobacter butzleri</i>	3RVY	24	97%	2.70
	Na _v	<i>Alpha Proteobacterium</i>	4DXW	26	96%	3.05
DIV (253 aa)	Na _v	<i>Alpha Proteobacterium</i>	4DXW	25	92%	3.05
	Na _v	<i>Arcobacter butzleri</i>	4MS2	27	98%	2.75
	Na _v	<i>Arcobacter butzleri</i>	3RVY	26	98%	2.70
	Na _v	<i>Caldalkalibacillus thermarum</i>	4BGN	27	92%	9.0

Los códigos 3RVY y 4MXX, donde XX representa cualquiera de las letras que completan el código, identifican a las estructuras del mismo canal de sodio activado por voltaje del microorganismo *Arcobacter butzleri* (Na_vAb). Estos canales son homotetrámeros simétricos y en todos los casos fueron cristalizados en un estado pre-abierto del canal [65], en donde los sensores de voltaje se encuentran en el estado activado pero la compuerta intracelular de activación del canal se encuentra cerrada. Lo anterior se logró mediante la substitución de la isoleucina 217 por una cisteína, manteniendo así los cuatro segmentos S6 unidos por puentes disulfuro. La estructura 4MS2 difiere de la 3RVY, en mutaciones introducidas en el filtro de selectividad. En el canal silvestre Na_vAb, la secuencia de aminoácidos que conforman el filtro de selectividad es ¹⁷⁵TLESWSM¹⁸¹, el arreglo espacial de esta secuencia en el tetrámero le confiere a este canal su

selectividad para transportar corrientes de sodio sobre otros iones. En el canal 4MS2 los aminoácidos E177, S178 y M181 fueron mutados por ácido aspártico (D), con lo que se obtuvo el filtro de selectividad con la secuencia ¹⁷⁵TLDDWSD¹⁸¹, lo que viró la selectividad del canal por Ca²⁺, además de conferirle otras características asociadas a los canales Ca_v de vertebrados [117]. Las estructuras 4MVQ, 4MVZ, etc., son idénticas a la 4MS2 salvo que fueron cristalizadas bajo diferentes concentraciones de calcio o su filtro de selectividad fue modificado. Cada uno de los dominios es mejor representado por un canal de sodio Na_v diferente, pero considerando que la estructura a modelar requiere del ensamble de los cuatro dominios, las estructuras identificadas como 4MS2 y 3RVY fueron los candidatos más adecuados para modelar por homología al canal Cav3.1.

4.4.2. Modelado por homología

Los modelos del canal Cav3.1 se produjeron empleando principalmente la *suite* de modelado Rosetta (*Rosetta Commons*), la cual fue seleccionada debido a su gran flexibilidad, código abierto, integración a diversos lenguajes de programación, buena documentación, continuo desarrollo y éxito en experimentos de modelado a ciegas [118-119]. En particular se emplearon las versiones Rosetta 3.5, y los lanzamientos semanales Rosetta 2014.20.56838 y Rosetta 2014.35.57232. El diagrama de flujo del trabajo realizado para generar los modelos se muestra en la Figura 15. A continuación se describe brevemente cada una de las etapas de trabajo.

1. La secuencia completa del canal Cav3.1 (GenBankTM AF190860) fue subida al servidor NCBI Blast [120], empleando la base de datos del PDB. Debido a la falta de estructuras homólogas en las regiones intracelulares que unen a cada dominio, así como en los extremos amino y carboxilo de la proteína, estas regiones fueron excluidas en los modelos del canal.
2. La secuencia del canal Cav3.1 fue separada en cuatro archivos correspondientes a cada uno de los cuatro dominios del canal, excluyendo las porciones antes mencionadas. Estos archivos fueron creados con las anotaciones del servidor UniProtKB [121], (UniProt ID O43497, isoforma 1). Cada archivo así generado, fue alineado en los servidores NCBI Blast [120] y HHpred [122]. Los resultados se resumen en la Tabla 6.
3. Se alinearon nuevamente las secuencias de cada uno de los dominios del canal Cav3.1 con la secuencias de las plantillas seleccionadas empleando los algoritmos, Clustal Omega [123],

MSAProbs [124], ProbCons [125], TM-Coffee [126] y MAFFT [127]. El alineamiento final, que fue usado en la siguiente etapa, se obtuvo a partir de un consenso de los alineamientos generados por cada uno de los métodos antes mencionados.

4. Se enhebra la secuencia objetivo, es decir, la proteína que se desea modelar, en el esqueleto de la estructura plantilla empleando los *scripts* de Rosetta. Las regiones no alineadas deben construirse *de novo*. Cada dominio, del I al IV, se ensambla en el sentido de las manecillas del reloj. Esto se logra simplemente concatenando los archivos correspondientes en el orden correcto.
5. Las porciones no alineadas por la plantilla se modelan empleando algoritmos “locales” (desarrollados en este trabajo) y servidores (algoritmos de uso general desarrollados por otros grupos de investigación). Para realizar los cálculos locales, primero se generan predicciones de estructura secundaria, empleando el servidor de PSIPRED [128] y de la topología de membrana empleando el servidor OCTOPUS [129]. En el último caso fue necesario corregir de manera visual los aminoácidos predichos a estar inmersos en la membrana usando PyMOL.
6. Los servidores *online* (Meta-servidores) empleados fueron: GPCR I-Tasser, I-Tasser [130], QUARK [131] y Phyre2 [132]. Los algoritmos usados localmente fueron: CCD [133], NGK [134], KIC *with fragments* (método aun no publicado), los cuales son parte de la *suite* de modelado de Rosetta. La función de energía empleada fue *Rosetta Membrane* [135]. Los mejores fragmentos obtenidos por cada método fueron filtrados usando la aplicación *Cluster* de Rosetta.
7. Los fragmentos seleccionados se ensamblan en combinaciones para generar modelos del canal Cav3.1. Para optimizar las estructuras así obtenidas, se efectúan simulaciones de dinámica molecular empleando un modelo implícito de membrana, *Rosetta Membrane* [135], en las aplicaciones *relax* y *fixbb* de Rosetta. Las moléculas de agua, los iones de calcio y algunos de los fosfolípidos 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina que fueron co-cristalizadas con la estructura 4MS2 también se incluyeron durante estas simulaciones. Para parametrizar los fosfolípidos antes mencionados, fue necesario emplear una librería de confórmeros lo cuales fueron generados con el software Confab [136]. Los mejores modelos fueron filtrados con la aplicación *Cluster* de Rosetta. En algunos casos, se empleo el software Foldit [137] para mejorar partes del plegado de la proteína manualmente. Para remover leves malformaciones geométricas y choques estéricos que se pudieran haber generado durante las etapas de modelado, se emplearon los algoritmos de minimización (*step descent*), incluidos en

software Maestro (Schrödinger Release 2014-3: v 9.9, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) y el modulo GROMOS 43B1 incluido en el software SPDBV [138].

8. La validación de los modelos se realizó únicamente a nivel estéreo-químico, empleando los programas PROCHECK [139] y Maestro.
9. Los modelos fueron aceptados si un porcentaje igual o mayor al 85% de aminoácidos se encontraban dentro de las regiones permitidas en el grafico de Ramachandran, y si la energía de dicho modelo se encontraba dentro del rango -2.5 R.U.E por aminoácido. La unidad R.U.E (*Rosetta Unit Energy*) es una medida empleada por Rosetta para reportar la energía de interacción intermolecular calculada entre los atomos que forman a la proteína.

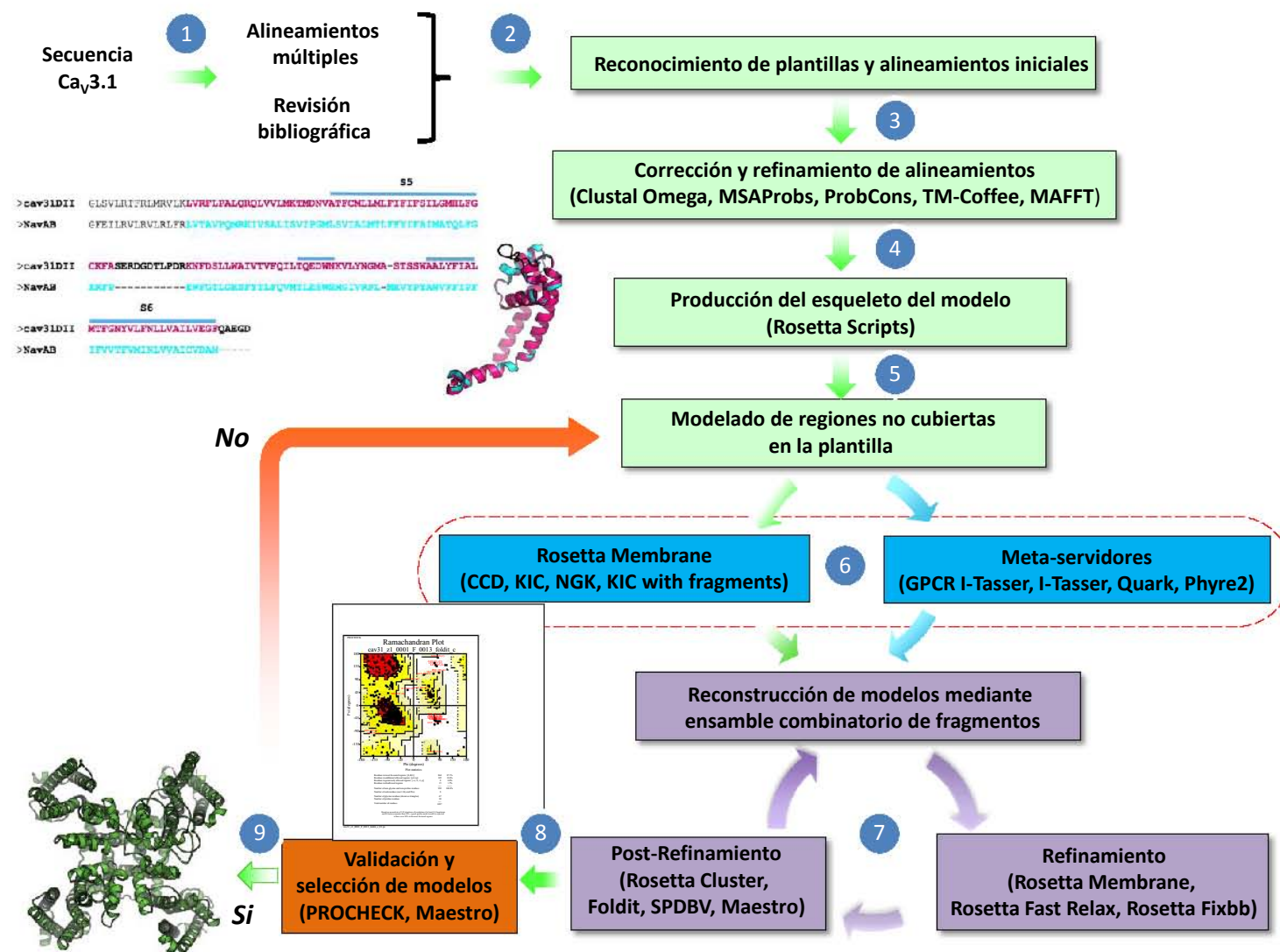


Figura 15. Procedimiento empleado para la producción de los modelos del canal Ca_v3.1. La línea roja punteada indica la etapa en donde se exploró y evaluó el espacio de posibles conformaciones en la secuencia de aminoácidos del canal Ca_v3.1, que no fue alineada en la plantilla. La validación de los modelos consideró únicamente la calidad estereo-química de cada uno de ellos (obtenidos en el ciclo 7). Los modelos rechazados por poseer bajos parámetros geométricos, condujeron a la búsqueda de nuevos alineamientos en las regiones próximas a las porciones no alineadas, con la intención de relajar las posibles colisiones estéricas inducidas por alineamientos restrictivos.

4.4.3. Acoplamiento molecular del TTA-A2 en modelos del canal Ca_v3.1 basados en la estructura de los canales Na_vAb y Ca_vAb: Primera aproximación

Como se menciono anteriormente, con el fin de reforzar los primeros mapas de interacciones y generar nuevos resultados, en paralelo con los experimentos de biología molecular y electrofisiología, se realizaron nuevas pruebas de acoplamiento molecular en los primeros modelos obtenidos en la sección previa (4.4.2). Debido a que se requeriría evaluar mas de un modelo y a los recursos de computo limitados, en lugar de subdividir el espacio de búsqueda en múltiples regiones, como se hizo originalmente (Sección 3.5.1), se optó por emplear como una primera aproximación, o aproximación gruesa, el uso de *docking* ciego (*blind docking*), con la finalidad de establecer selectividad por algún sitio y posteriormente restringir el espacio de búsqueda a esta región particular. Con esta estrategia en mente, se realizaron las pruebas variando el parámetro e en valores de 10, 100, y 1000, dependiendo de la disponibilidad del equipo para realizar estos experimentos. El volumen ocupado por el espacio de búsqueda fue variable ya que cada modelo ocupaba un volumen diferente, pero en promedio fue de 90 x 90 x 100 Å. Entre 5 y 10 modelos fueron evaluados de esta manera, y en cada caso, hasta 5 repeticiones fueron realizadas. El resultado de esta primera aproximación mostró que los modos de unión entre el TTA-A2 y el Ca_v3.1 ocurrían con mayor frecuencia en la cavidad central formada por los cuatro segmentos S6 de cada dominio y en las fenestraciones laterales que conducen a ella, por lo que los siguientes experimentos se llevaron a cabo únicamente en esta región (Figura 16).

Es importante destacar que estos resultados tuvieron una doble importancia, por un lado, permitieron delimitar el espacio de búsqueda para las siguientes pruebas, y por otro, hicieron posible relacionar este trabajo con otro proyecto paralelo del laboratorio. Dicho proyecto se enfoca en el estudio de las propiedades biofísicas de mutaciones en los segmentos S6 de los canales de calcio tipo T, en concreto de los aminoácidos denominados “bisagra” [140]. El objetivo general de dicho proyecto es establecer si el mecanismo de apertura de la compuerta de activación (Figura 3D), en los canales de calcio tipo T, es mediado por aminoácidos en posiciones equivalentes a los aminoácidos bisagra descritos originalmente en el canal de potasio MthK (PDB ID 1LNQ) [140].

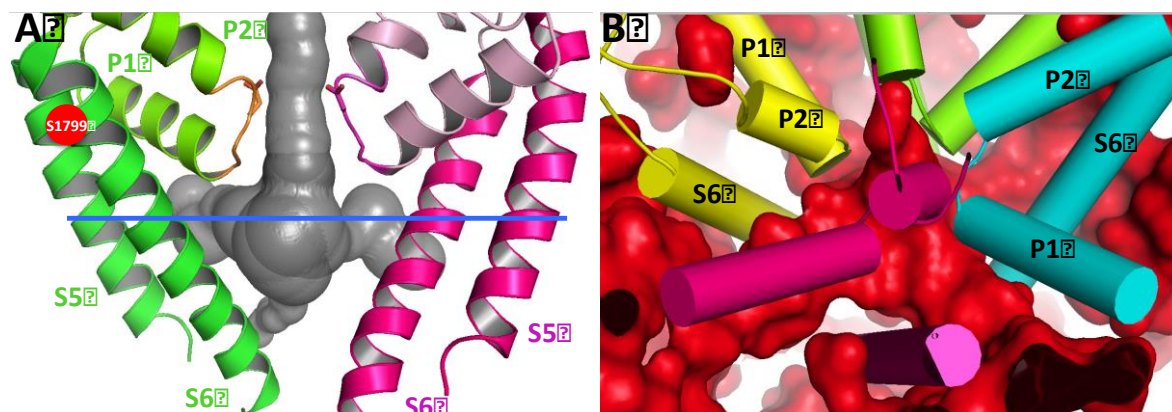


Figura 16. Cavidad central del canal $\text{Ca}_v3.1$ formada por los cuatro segmentos S6 de cada dominio. A) Vista lateral del dominio del poro formado por los segmentos S5 y S6 (representados como listones). La cavidad central y algunas rutas de acceso (superficie gris), fueron calculadas empleando el programa MOLE 2.0 [141]. La ruta de acceso vertical es el poro de conducción. Puesto que el modelo fue obtenido a partir de la estructura de un canal en el estado cerrado, no se observa una salida en la parte inferior. Las rutas de acceso horizontales (fenestraciones o conductos laterales) permiten la entrada de moléculas hidrófobas a través de la membrana. La línea azul muestra la ubicación aproximada de los aminoácidos “bisagra” en los segmentos S6, además se muestra la posición del aminoácido S1799 en la hélice S6 del dominio IV. Por claridad, únicamente se muestran los dominios IV, en verde y II, en rosa. **B)** Vista extracelular del dominio del poro completo. En rojo se muestra la representación de superficie de la cavidad central completa y las fenestraciones laterales formadas por los cuatro dominios del canal $\text{Ca}_v3.1$. Esta representación delinea el volumen no ocupado por la proteína, empleando como sonda, esferas de 0.25 Å de diámetro con el software *hollow* [142]. Por claridad, los segmentos S5 fueron removidos y las hélices alfa restantes se representan como cilindros.

La ubicación de los aminoácidos llamados bisagra, es aproximadamente a la mitad de cada segmento S6. Una línea imaginaria conectando a cualquier par de ellos, forma un eje ecuatorial en la cavidad central del canal $\text{Ca}_v3.1$ (Figura 16A), por lo que alteraciones estructurales en esta región deberían repercutir en la afinidad del TTA-A2 por su sitio de unión, el cual se ubica en la cavidad central, de acuerdo a las simulaciones de *docking* ciego. Particularmente, considerando los resultados e interpretaciones obtenidas con la mutación S1799P (sección 4.3), el candidato más interesante para investigar el efecto del TTA-A2, fue la “bisagra” del segmento S6 del dominio IV, la cual según los alineamientos realizados para aquel proyecto, corresponde al aminoácido Q1805. Afortunadamente, en el laboratorio ya se habían producido y caracterizado previamente seis mutaciones de dicho aminoácido (Q1805) del canal $\text{Ca}_v3.1$ (Resultados no publicados). Por lo tanto, los siguientes experimentos se enfocaron a investigar el efecto del TTA-A2 en las mutantes del canal $\text{Ca}_v3.1$ en la posición Q1805, mismos que se presentan a continuación.

4.5. Perfil de bloqueo del TTA-A2 en los canales mutantes Q1805A, Q1805R y Q1805P

Teniendo en cuenta los parámetros establecidos en las primeras mutaciones investigadas (Sección 4.3), de las seis mutaciones disponibles en la posición Q1805, se estudiaron únicamente los efectos del TTA-A2 en las substituciones de la glutamina (Q) 1805 por alanina (A), prolina (P) y arginina (R).

En la Figura 17 se muestran trazos representativos del efecto del TTA-A2 en cada una de estas mutantes así como el curso temporal de bloqueo de la corriente de Ca^{2+} evocada a -30 mV. En las tres mutaciones estudiadas, el TTA-A2 disminuyó su potencia de bloqueo en más del 66% con respecto al bloqueo observado en el canal $\text{Cav}3.1$ silvestre (Figura 14C). El efecto más drástico se observó en la mutación Q1805R, siendo apenas bloqueada en un $16 \pm 5 \%$ ($n = 9$) por el TTA-A2 (Figura 18). Estos resultados indican que mutaciones de la glutamina por tres aminoácidos con propiedades fisicoquímicas contrastantes fueron capaces de disminuir drásticamente la afinidad del TTA-A2 por su sitio de unión, lo cual sugiere que la glutamina 1805 por sí misma es importante en la estabilización del TTA-A2. Lo anterior se deduce a partir del hecho de que la introducción de una alanina (el aminoácido mas compatible con la estructura de hélice alfa) en la posición Q1805, modifica considerablemente la potencia de bloqueo del TTA-A2 y de manera muy semejante a la mutación por prolina, el cual es un aminoácido incompatible con la estructura estable de una hélice alfa. Por lo tanto, la posible deformación del segmento S6 causada por la introducción de la prolina en la posición Q1805, no induce un mayor efecto en el bloqueo del TTA-A2, que la propia ausencia de este aminoácido.

El resultado anterior es sumamente importante, ya que señala a uno de los aminoácidos que potencialmente están formando el sitio de unión del TTA-A2 en el canal $\text{Cav}3.1$. Sin embargo, no aporta información sobre el mecanismo por el cual la glutamina 1805 es relevante para que el TTA-A2 ejerza su efecto antagonista. Para resolver dicha incognita, es necesario obtener un mapa de interacciones entre el TTA-A2 y su sitio de unión que sea consistente con los resultados experimentales aquí presentados y con los resultados reportados por otros grupos de investigación. En particular es indispensable conocer el papel que la Q1805 juega en el funcionamiento del $\text{Cav}3.1$ a nivel de función y estructura, por lo que los modelos tridimensionales del canal $\text{Cav}3.1$, obtenidos de la etapa de modelado (Sección 4.4.2), serán fundamentales durante el análisis final de los resultados experimentales.

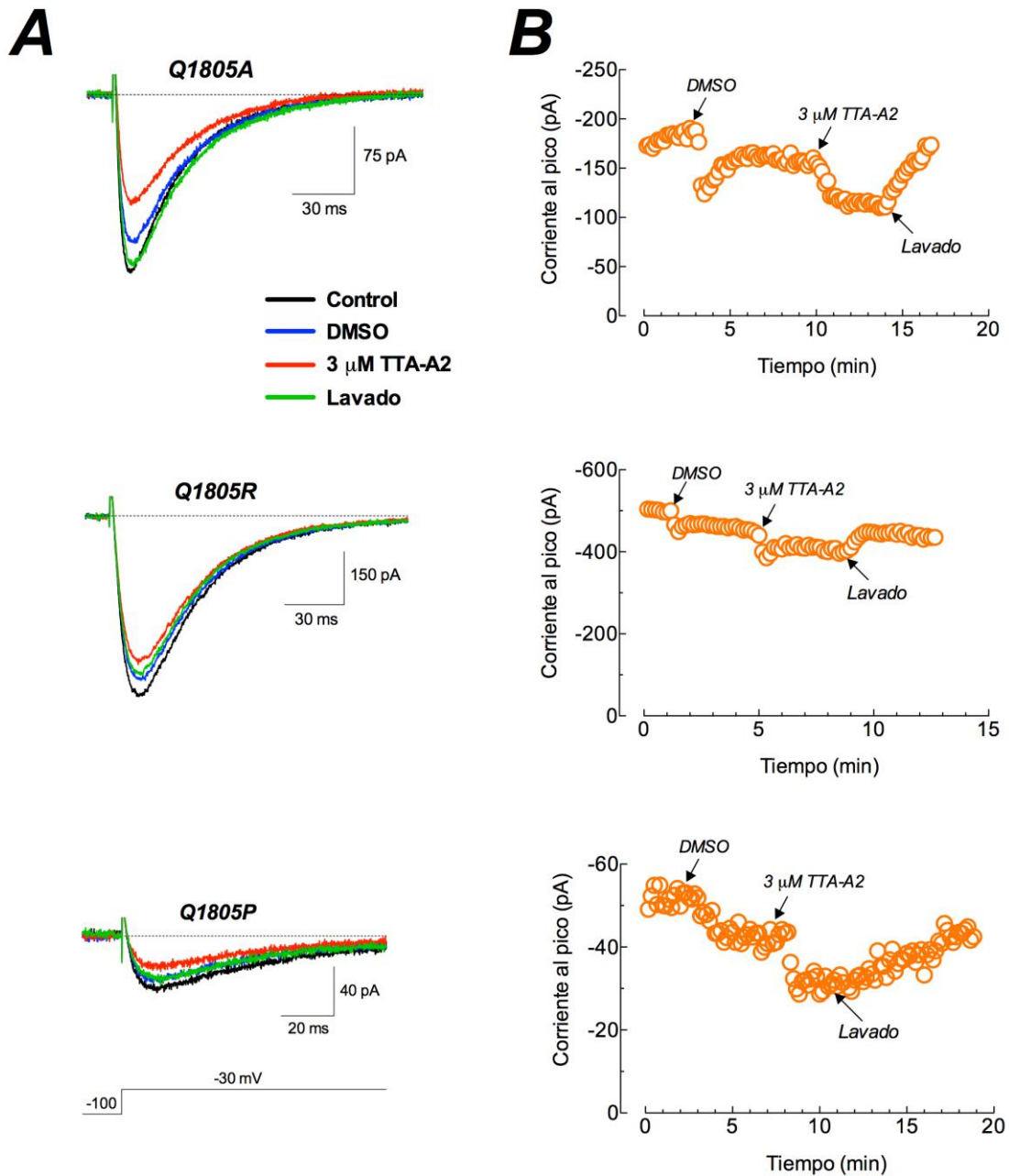


Figura 17. Mutaciones en la posición Q1805 del canal $\text{Ca}_v 3.1$ disminuyen el bloqueo del TTA-A2. A) Trazos representativos de las corrientes de calcio evocadas con pulsos despolarizantes a -30 mV obtenidos de los canales mutantes Q1805A, Q1805R y Q1805P, en condiciones Control (trazos negros), en presencia de DMSO (0.015%; trazos azules), de 3 μ M de TTA-A2 (trazos rojos), y después de retirar el TTA-A2 y el DMSO (Lavado, trazos verdes).. Las corrientes de la mutante Q1805P se generaron con pulsos de 100 ms de duración, mientras que las de Q1805A y Q1805R fueron registradas en respuesta a pulsos de 150 ms. Nótese que conforme la amplitud de las corrientes disminuye, el ruido eléctrico de fondo se hace más notorio, lo cual se observa como un aumento en el grosor de los trazos de corriente. **B)** Curso temporal del bloqueo de las corrientes de calcio de las mismas células mostradas en (A). Las diferentes condiciones experimentales indicadas fueron mantenidas hasta que la amplitud de las corrientes alcanzó un estado estacionario, lo cual sucedió en promedio, después de cuatro minutos en cada caso.

Para avanzar en esta dirección, se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular centrando el espacio de búsqueda en las proximidades del centro geométrico del aminoácido Q1805. Además se filtraron las conformaciones obtenidas en las simulaciones realizadas previamente en la cavidad central, teniendo en cuenta el posible papel que la Q1805 juega en la estabilización del TTA-A2. Los resultados de estas simulaciones serán presentados más adelante en la Sección 4.6.

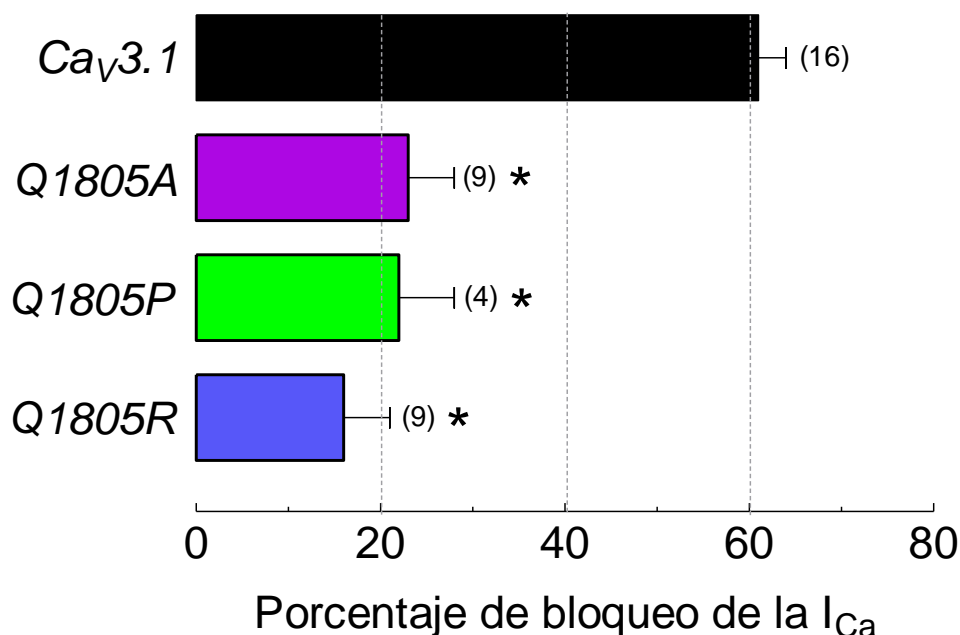


Figura 18. Mutaciones en el aminoácido Q1805 reducen significativamente la potencia de bloqueo del TTA-A2. Porcentaje de bloqueo de la corriente de calcio del canal $Ca_v3.1$ y las mutantes señaladas inducido por la presencia de 3 μ M de TTA-A2 en la solución de registro externa. Los datos son el promedio \pm EE. Entre paréntesis se indica el número de células investigadas para cada mutante. Los asteriscos indican diferencias significativas de las medias con respecto al canal $Ca_v3.1$ silvestre ($P < 0.001$).

Por otra parte, la caracterización experimental de las propiedades biofísicas de las mutaciones en la posición Q1805 del canal $Ca_v3.1$ ya había sido realizada previamente en el laboratorio del Dr. Gómora. Por lo tanto, los datos que presentare a continuación no fueron obtenidos por mi y aún no han sido publicados, pero su análisis en el contexto del presente proyecto es importante para comprender con mayor profundidad el papel de la Q1805 en su interacción con el TTA-A2, así como las posibles alteraciones de las propiedades biofísicas en los canales $Ca_v3.1$ que podrían favorecer dicha interacción.

4.5.1. Propiedades biofísicas de las mutaciones del canal Cav3.1 en la posición Q1805

Las bases de la presente discusión, fueron sentadas en la Sección 4.2. El análisis que se llevara a continuación tiene como objetivo principal comprender el mecanismo de bloqueo del TTA-A2 en base a las propiedades electrofisiológicas de los canales mutantes que no poseen un aminoácido de su sitio de unión.

4.5.1.1. Dependencia al voltaje de la activación e inactivación

En la Figura 19 se muestran las curvas I - V de la densidad de corriente generada para cada una de las mutantes caracterizadas del aminoácido Q1805 del canal Cav3.1, así como las curvas normalizadas correspondientes. Independientemente de que la densidad de corriente de todas las mutantes fue menor a la observada en el canal Cav3.1 silvestre, es importante resaltar que dos de las mutantes en las que se investigó el efecto del TTA-A2, la Q1805A y la Q1805R, presentaron una $V_{1/2}$ de activación muy similar al control (Tabla 7). No obstante, la mutante Q1805A presentó un potencial de inversión (V_{rev}) más negativo (más de 10 mV; Tabla 7) que Q1805R y el canal Cav3.1 silvestre, lo cual sugiere que de alguna manera esta mutación afectó la interacción del ion Ca^{2+} con el filtro de selectividad del canal. Por su parte, la mutación Q1805P modificó mas drásticamente la dependencia al voltaje de activación, desplazando toda la curva I - V hacia la izquierda en aproximadamente 7 mV (Tabla 7). En la Figura 20 se ilustra la ubicación del aminoácido Q1805 en un modelo de la estructura del canal Cav3.1, obtenido como se describió en la Sección 4.4.2. Como ya se ha mencionado, en el laboratorio originalmente Q1805 se propuso como la “bisagra” de la compuerta de activación del dominio IV de los canales tipo T. Sin embargo, los alineamientos realizados en este trabajo, indican que el aminoácido A1804 es el equivalente a la glicina “bisagra” del canal Mthk, mientras que la Q1805 sería un aminoácido adyacente. Interesantemente, la mutación por alanina y prolina, afectan el potencial de inversión de la corriente del canal Cav3.1; pero las mutaciones por arginina, glicina, serina y treonina no modifican dicho parámetro. Esto podría deberse a una posible alteración en la estructura interna de las moléculas de agua presentes en la cavidad central del canal Cav3.1, encargadas de coordinar a los iones que cruzan por el filtro de selectividad, con el fin de crear una vía energéticamente favorable [105].

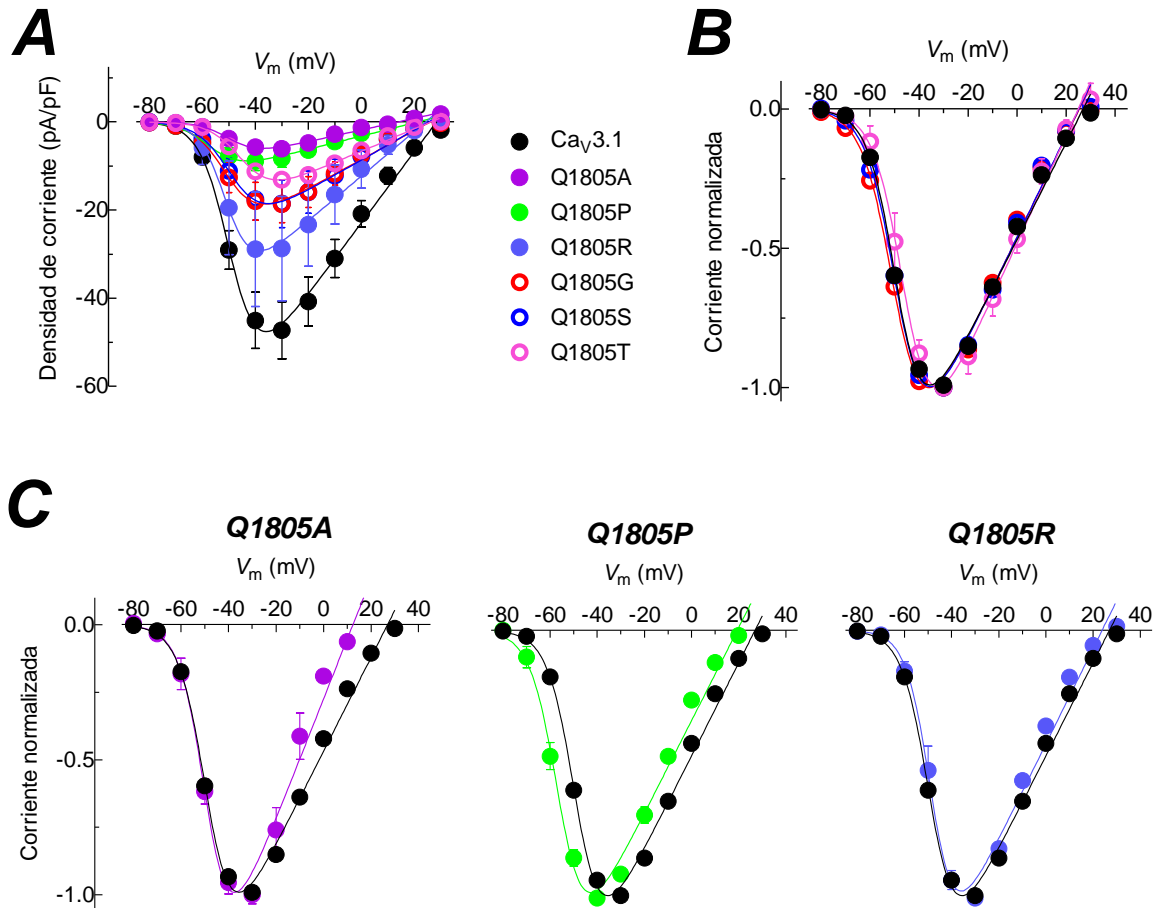


Figura 19. Variaciones en la dependencia al voltaje de activación en mutaciones del canal $\text{Ca}_V 3.1$ en la posición Q1805. A) Curvas I - V de la densidad de corriente promedio \pm EE para las mutantes indicadas. B) Curvas I - V normalizadas para las mutaciones en la posición Q1805 que no fueron retadas con ningún compuesto. C) Curvas I - V normalizadas de cada una de las mutantes sometidas a experimentos de farmacología. Las líneas continuas en B y C son ajustes con la Ecuación 1, cuyos parámetros se presentan en la Tabla 7.

En el canal de potasio $\text{K}_{ir}3.2$ se ha demostrado que una asparagina en una posición equivalente a la Q1805 del canal $\text{Ca}_V 3.1$, influye en la selectividad del canal, ya que su presencia es necesaria para coordinar a los iones de potasio que cruzan por el filtro de selectividad [143-144]. De esta forma mutaciones por aminoácidos capaces de formar puentes de hidrogeno, preservan la estructura interna de las moléculas de agua en la cavidad central, mientras que aminoácidos hidrófobos (como la alanina y la prolina) afectan la coordinación de los iones calcio, lo cual puede repercutir en su selectividad.

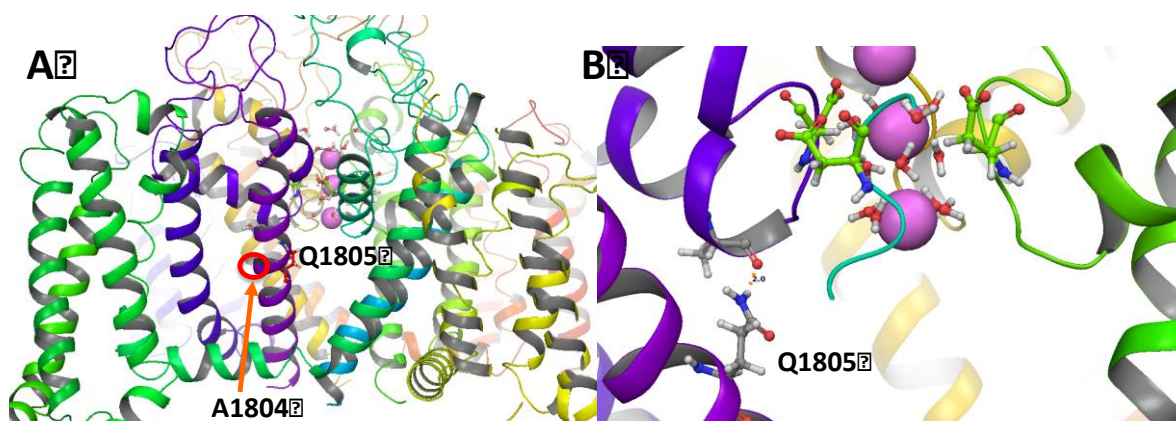


Figura 20. Ubicación de la Q1805 en un modelo estructural del canal $\text{Ca}_v3.1$. A) Modelo de los 24 segmentos transmembranales de canal $\text{Ca}_v3.1$ y las asas que los unen. En morado se muestran los segmentos S5 y S6 del dominio IV. En el segmento S6 se indica la ubicación del aminoácido Q1805 y en un círculo rojo el sitio putativo del aminoácido “bisagra”, el cual corresponde en este caso a la A1804. Nótese que Q1805 forma parte de la pared del conducto formado por la interface del dominio III y IV que conducen a la cavidad central. B) Un acercamiento al aminoácido Q1805 muestra que este puede formar un puente de hidrogeno con el carbonilo del esqueleto de la serina 1765 del segmento P, el cual soporta al filtro de selectividad. Los aminoácidos que forman la firma del filtro de selectividad se colorean en verde. Los iones Ca^{2+} se representan como esferas moradas las cuales estas hidratadas por moléculas de agua.

Una posibilidad que no puede dejarse de lado en la explicación de la hiperpolarización del V_{rev} , consiste en la magnitud de la relación señal/ruido que debido a las pequeñas amplitudes de la corriente generada por los canales mutantes Q1805A y Q1805P (Tabla 7), resulto ser considerablemente grande comparada con cualquiera de las otras mutantes estudiadas. Lo anterior podría inducir un error en la medición de las corrientes en cuestión debido al minúsculo tamaño de éstas (67 ± 27 y 103 ± 22 pA, respectivamente), no obstante, una evidencia en contra de esta posibilidad la constituye la misma mutante Q1805R, cuyas corrientes fueron aproximadamente 3 veces más grandes que aquellas mutantes y su V_{rev} también mostró una tendencia hacia voltajes más negativos, aunque en este caso la diferencia no fue significativa (Tabla 7).

En conclusión, los resultados demuestran contundentemente que la Q1805 no tiene un papel relevante en la dependencia al voltaje de activación del canal $\text{Ca}_v3.1$. También se puede observar en los registros de la Figura 17 que el pico de la corriente de los canales mutantes Q1805 en presencia del TTA-A2 no sufre cambios importantes en el curso temporal de activación e inactivación, lo que permite inferir que la dependencia al voltaje de activación tampoco es afectada, tal como sucede en el canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre [89]. Esto sugiere que el TTA-A2 no está

acoplado energéticamente, o al menos no de forma sustancial, con estructuras involucradas en la dependencia al voltaje de la activación del canal $\text{Ca}_v3.1$.

En la Figura 21 se presentan las respectivas curvas de la inactivación del estado estacionario. La única mutación que presentó una diferencia significativa en el voltaje medio de inactivación ($V_{1/2}$) con respecto al control fue la mutación Q1805T (Tabla 7). Asimismo, tanto ésta como la mutación Q1805A también presentaron diferencias significativas con respecto al control, en cuanto a la población de canales inactivados a -100 mV. Ambas mutaciones provocan que una mayor fracción de canales transite al estado inactivado a partir del estado cerrado a -100 mV (Figura 21, inserto). Esta observación experimental es muy importante, ya que como se ha venido mencionando, el TTA-A2 bloquea con mayor potencia canales inactivados, por lo que, en principio, la mutación Q1805A debería ser bloqueada con una mayor potencia por el TTA-A2. Sin embargo, como ya se mostró en la Figura 18, el efecto antagonista del TTA-A2 en dicha mutante disminuyó en casi 2/3 del observado en el canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre. Por lo tanto, esta evidencia experimental refuerza la idea de que el aminoácido Q1805 es muy importante en la estabilización del TTA-A2.

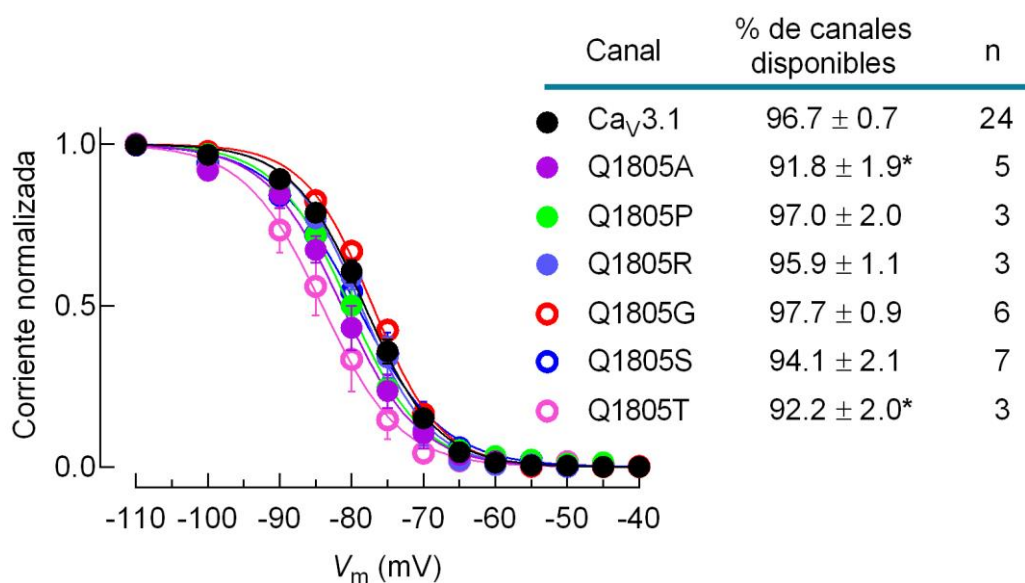


Figura 21. Curvas de la inactivación en el estado estacionario de las mutantes de Q1805. Los datos (media \pm EE) muestran la proporción de canales disponibles para ser activados a cada voltaje explorado del canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre y las mutantes del aminoácido Q1805. Las líneas continuas son el ajuste de los datos experimentales con una función Boltzmann (Ecuación 2), cuyos parámetros se presentan en la Tabla 7. A la derecha se presenta el porcentaje de canales disponibles para ser activados a -100 mV. Las diferencias significativas con respecto a los valores del control ($\text{Ca}_v3.1$) se muestran con un asterisco ($p < 0.05$).

Tabla 7. Parámetros biofísicos de la dependencia al voltaje de la activación y la inactivación de estado estacionario en el canal Ca_v3.1 y sus mutantes del aminoácido Q1805

Canal	pA/pF	n	Activación			Inactivación		
			V _{1/2} (mV)	k (mV)	V _{rev} (mV)	n	V _{1/2} (mV)	k (mV)
Ca _v 3.1	-47.3 ± 6.5	24	-48.6 ± 0.6	5.4 ± 0.1	27.0 ± 0.7	2 4	-78.2 ± 0.7	4.5 ± 0.1
Q1805A	-6.1 ± 2.2	5	-48.5 ± 1.3	5.6 ± 0.2	15.3 ± 1.4*	5	-81.2 ± 1.3	5.1 ± 0.3
Q1805P	-8.8 ± 2.1 ←	10	-55.5 ± 1.1*	5.4 ± 0.3	21.8 ± 1.2*	3	-80.2 ± 0.8	5.2 ± 0.8
Q1805R	-28.9 ± 13.0	5	-48.1 ± 1.5	4.7 ± 0.1	23.8 ± 0.9	3	-78.6 ± 0.8	4.7 ± 0.5
Q1805G	-18.7 ± 4.2	7	-49.3 ± 1.2	6.1 ± 0.3	25.3 ± 1.1	6	-77.1 ± 0.3	4.7 ± 0.1
Q1805S	-20.7 ± 5.5	10	-48.8 ± 0.9	5.8 ± 0.2	24.4 ± 1.1	7	-79.1 ± 1.6	5.4 ± 0.2
Q1805T	-13.1 ± 2.5	4	-45.5 ± 2.1	5.6 ± 0.3	24.7 ± 2.7	3	-84.1 ± 2.1*	5.0 ± 0.2

Valores (promedio ± error estándar) de los parámetros biofísicos indicados para el canal Ca_v3.1 silvestre y mutaciones de este en la posición Q1805. La densidad de corriente (pA/pF) se obtuvo del pico de las curvas *I-V*. La flecha indica el corrimiento del pico de la curva *I-V* de -30 mV en el control a -40 mV en la mutante Q1805P. Los parámetros de activación, V_{1/2} y *k*, así como el V_{rev} son el promedio de los ajustes individuales de la relación *I-V* de cada célula con una función Boltzmann modificada (Ecuación 1). El V_{1/2} y la *k* de la inactivación en estado estacionario provienen del ajuste de los datos experimentales obtenidos al aplicar el protocolo *Hinf10s-100* en cada célula estudiada y ajustados con la ecuación de Boltzmann (Ecuación 2). Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores del control (Ca_v3.1) se resaltan en rojo y se identifican con un asterisco (*p* < 0.05). El número de células para cada condición se muestran en la columna *n*.

4.5.1.2. Cinética de las corrientes: activación, inactivación, desactivación y recuperación de la inactivación

El tiempo que le toma a los canales abrirse (activación), en respuesta a una despolarización a -30 mV, no fue afectado significativamente en las mutantes estudiadas, excepto por el caso de Q1805G (Figura 22A), la cual no fue investigada en presencia del TTA-A2. Por el contrario, el tiempo que le toma a los canales inactivarse durante la misma despolarización a -30 mV, se vio enlentecido en todas las mutaciones realizadas en la posición Q1805, lo cual indica que este aminoácido puede ser importante para el proceso de inactivación del canal Ca_v3.1 (Figura 22B). La constante de tiempo de desactivación (τ_{desact}), es una medida del tiempo promedio que le toma a los canales pasar del estado abierto al estado cerrado. Se ha propuesto que dicha transición involucra el movimiento de la mitad inferior de los segmentos S6, y en sentido opuesto al movimiento que dio lugar a su apertura. En este aspecto únicamente los canales mutantes Q1805P y Q1805T poseen tiempos de desactivación significativamente diferentes, siendo ligeramente más lentos que en el caso del control (Figura 22C, Tabla 8).

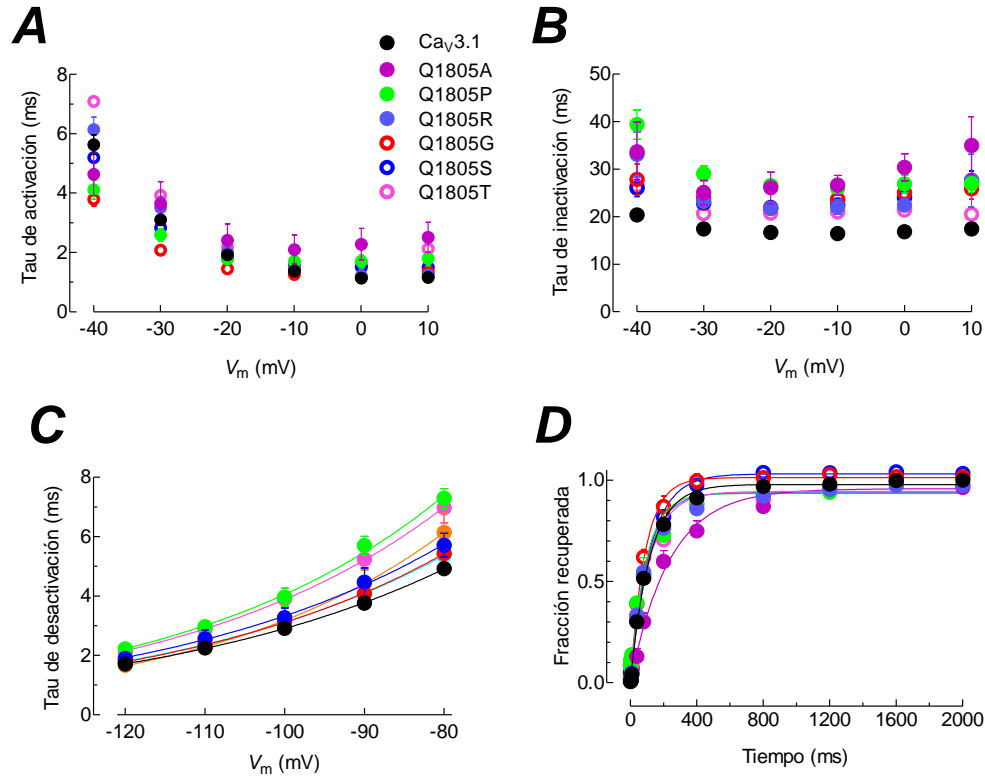


Figura 22. Cinética de las corrientes de los canales $Ca_v3.1$ y mutantes de $Q1805$. Constantes de tiempo (tau) de activación (A), inactivación (B), y de desactivación (C) en función del voltaje; y curso temporal de la recuperación de la inactivación como función del tiempo (D), para las mutantes indicadas. Se grafica el promedio \pm EEM de las constantes de tiempo obtenidas de los ajustes con dos exponenciales de las corrientes a los valores de voltaje indicados en A y B, y del ajuste monoexponencial de las colas de corriente registradas a los voltajes indicados en (C). En D los datos se analizaron tal y como se indica en la Figura 13. Los valores respectivos se resumen en la Tabla 8.

El tiempo de recuperación del estado inactivado en las mutaciones investigadas fue relevante en los casos de $Q1805A$, $Q1805G$ y $Q1805T$ (Figura 22D, Tabla 8). La presencia de la glicina en la posición $Q1805$ aceleró ligeramente la constante de tiempo con la que el canal abandona el estado inactivado; mientras que la sustitución de la glutamina por alanina o treonina enlenteció significativamente dicho proceso. Estas observaciones no permiten generar una explicación sencilla de la importancia de la $Q1805$ en el mecanismo de recuperación de la inactivación, excepto por el hecho de que la aceleración observada con la mutante $Q1805G$ se deba en parte a la flexibilidad que la presencia de la glicina pudiera estar introduciendo a la hélice α del segmento S6 y promoviendo así que el tiempo que les lleva a los canales transitar del estado inactivado al estado en cerrado en reposo sea más rápido que el canal $Ca_v3.1$ silvestre. Independientemente de ello, el caso de la mutante $Q1805A$ es quizás el más interesante desde la perspectiva del efecto del

TTA-A2, debido a que el tiempo de recuperación del estado inactivado fue incrementado en casi el doble con respecto al canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre (Tabla 8). Probablemente esta sea la evidencia más importante que respalda la participación del aminoácido Q1805 en la formación del complejo $\text{Ca}_v3.1$ -TTA-A2, ya que a pesar de que la mutación Q1805A afectó la recuperación del estado inactivado de forma tan significativa, el bloqueo de sus corrientes por TTA-A2 alcanzó solo 1/3 del bloqueo producido en las corrientes del canal silvestre (Figura 18).

Tabla 8. Comparación de las constantes cinéticas de los canales $\text{Ca}_v3.1$ silvestre y mutantes

Canal	n	τ_{act}	τ_{inact}	n	τ_{desact}	n	τ_h
$\text{Ca}_v3.1$	24	3.1 ± 0.2	17.5 ± 0.5	20	2.9 ± 0.1	20	114 ± 4
Q1805A	5	3.7 ± 0.7	$25.1 \pm 2.6^*$	4	3.3 ± 0.3	4	$204 \pm 16^*$
Q1805P	10	2.6 ± 0.2	$29.1 \pm 1.7^*$	5	$4.0 \pm 0.3^*$	4	103 ± 11
Q1805R	5	3.5 ± 0.4	$23.3 \pm 1.4^*$	5	3.2 ± 0.2	4	101 ± 10
Q1805G	7	$2.1 \pm 0.1^*$	$24.0 \pm 2.5^*$	6	3.2 ± 0.3	5	$91 \pm 9^*$
Q1805S	10	2.8 ± 0.2	$22.9 \pm 1.3^*$	6	3.2 ± 0.3	5	122 ± 6
Q1805T	4	3.9 ± 0.5	$20.7 \pm 1.6^*$	4	$3.9 \pm 0.2^*$	4	$141 \pm 18^*$

Los valores, en ms, son el promedio \pm error estándar. Las columnas *n* indica el número de células para cada condición. Las constantes de tiempo (τ) de activación e inactivación se obtuvieron a partir del ajuste con dos exponenciales de los trazos de corriente obtenidos a diferentes voltajes (protocolo *IV*); sólo se presentan los datos obtenidos a -30 mV. Las constantes de tiempo de desactivación (τ_{desact}) provienen del ajuste de las colas de corriente generadas mediante el protocolo *IIV* con una función exponencial; solo se presenta el valor de la tau a -100 mV. La tau de recuperación de la inactivación (τ_h) se obtuvo del ajuste con una función exponencial de los valores de la corriente recuperada en función del tiempo a -100 mV (protocolo *Recovery*). Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con (*), $p < 0.05$.

El análisis global de las propiedades biofísicas de las mutaciones en Q1805 indica que a nivel estructural, este aminoácido está más correlacionado con el mecanismo encargado de determinar las propiedades cinéticas de la inactivación del canal $\text{Ca}_v3.1$, que en aquel que se encarga de transducir los cambios de voltaje en cambios de probabilidad de apertura o inactivación del canal. En lo que respecta a la recuperación de la inactivación, el papel que juega Q1805 no es claro, ya que únicamente la mutante Q1805A presenta un tiempo de recuperación significativamente mayor. El mismo análisis permite anticipar que la Q1805 puede ser substituida por una serina sin afectar mayormente los parámetros electrofisiológicos estudiados del canal $\text{Ca}_v3.1$, lo cual sugiere que es necesario un aminoácido hidrófilo en esta posición que sea capaz de formar puentes de hidrógeno,

tal vez para formar una estructura interna con las moléculas de agua presentes en la cavidad central.

Respecto a su participación para que el TTA-A2 ejerza su efecto antagonista, la mutación Q1805A resultó muy interesante, ya que presentó propiedades biofísicas claramente contrastantes con respecto a las del canal silvestre, principalmente las relacionadas con la inactivación del canal. En términos puramente funcionales, estas modificaciones deberían propiciar un aumento en la potencia de bloqueo del TTA-A2 y no lo opuesto, como es el caso. Lo anterior remarca la importancia que tiene la Q1805 para que el TTA-A2 pueda ejercer su efecto antagonista, ya que en ausencia de este aminoácido, el TTA-A2 deja de bloquear de forma potente al canal $\text{Ca}_v3.1$.

4.6. Determinación del modo de unión del TTA-A2 en el canal $\text{Ca}_v3.1$

Para determinar los modos de unión del TTA-A2 en el $\text{Ca}_v3.1$, espacios de búsqueda con dimensiones menores o iguales a $30 \times 30 \times 30 \text{ \AA}$, se definieron en las proximidades del aminoácido Q1805 en cada modelo seleccionado de la etapa de modelado (Sección 4.4.2). Adicionalmente se permitió que algunos aminoácidos adoptaran diferentes conformaciones durante las simulaciones de *docking*. Aproximadamente 40 modelos fueron empleados para las simulaciones de acoplamiento molecular y hasta 5 repeticiones fueron realizadas por modelo, dando como resultado, un ensamble de modos de unión posibles entre TTA-A2 y el canal $\text{Ca}_v3.1$. Para tratar de determinar el modo de unión más probable, el primer paso fue seleccionar únicamente los modos de unión que presentaron una energía de interacción menor a -8.0 kcal/mol . Posteriormente los resultados se clasificaron en grupos (Tabla 9) y se depuraron en función de los siguientes criterios;

1. La quiralidad del grupo n-isopropilacetamida del TTA-A2, (recuadro punteado de la Figura 23A, compuesto 3), es importante para su efecto antagonista en los canales de calcio tipo T.
2. La substitución del átomo de nitrógeno en cualquier posición diferente a la de la piridina del TTA-A2,, disminuye significativamente su potencia de bloqueo.
3. La substitución del grupo trifluorometil (CF_3) del TTA-A2 (Figura 23C) por un grupo propil o bencil, da lugar a compuestos con potencias de bloqueo equivalentes.

4. La sustitución del grupo ciclopropil en el TTA-A2 (Figura 23.C) por otros grupos similares (Figura 24) no disminuyen su potencia de bloqueo y su sustitución por heterociclos hidrofílicos de mayor volumen (densidad electrónica), incluso la aumentan.
5. La glutamina 1805 en canal $\text{Ca}_v3.1$ se acopla energéticamente con el TTA-A2.

Los criterios anteriores fueron establecidos a partir de evidencias experimentales. Las primeras cuatro reglas provienen de los resultados de estudios SAR (*Structure-Activity Relationship*) realizados durante la síntesis del TTA-A2 y pruebas posteriores [148-149]. La última regla corresponde a los resultados derivados del presente trabajo de tesis. En la Figura 23 se esquematiza el origen experimental de las primeras cuatro reglas, las cuales revisaremos brevemente. Al comparar los datos de los paneles A y B, se observa que el compuesto **3** bloquea casi con el doble de potencia que el compuesto **11**, cuya estructura química es más próxima al TTA-A2 (Figura 23D). La introducción y posterior sustitución del átomo de nitrógeno en cada posición del anillo benceno del compuesto **3** fue realizada con la intención de disminuir su hidrofobicidad global. La correlación en la disminución de la potencia de bloqueo con la disminución de la hidrofobicidad del compuesto, puede deberse a que los aminoácidos que interactúan con la piridina del TTA-A2 son parcialmente hidrófobos, o bien la ruta de acceso para alcanzar el sitio de unión, es principalmente hidrófoba.

Es importante mencionar que los resultados de los experimentos que dieron lugar a los criterios 1 y 2, reflejan las preferencias conformacionales de los compuestos prototipo estudiados, y por tanto indican las conformaciones compatibles e incompatibles con el sitio de unión del TTA-A2 en los canales Ca_v3 . Debido a que el cálculo preciso de las conformaciones energéticamente favorables de una molécula acoplada a un receptor están fuera del alcance de esta tesis, estas evidencias experimentales se limitarán a emplearse únicamente para explorar la posibilidad de que el compuesto este formando puentes de hidrogeno como consecuencia de estas configuraciones atómicas. Por su parte, los criterios 3, 4 y 5 revelan las propiedades moleculares que el sitio de unión del TTA-A2 debe satisfacer. Una sustitución en la posición R2 (Figura 23C), por una cadena de tres hidrocarburos enlazados covalentemente (3.8 Å de separación con respecto al átomo de oxígeno), son suficientes para producir un compuesto con una potencia de bloqueo equivalente al TTA-A2. Además sustituciones por grupos más extendidos no mejoran significativamente la potencia de bloqueo, así como tampoco el arreglo espacial que sus átomos

adoptan (Figura 23C). Por otro lado, substituciones en la posición R1 por otros grupos hidrofóbicos cortos no influyen en la potencia de bloqueo y la presencia de grupos anfífilicos mas grandes, incluso la mejoran (Figura 23F). Lo anterior sugiere que los grupos funcionales en las posiciones R1 y R2 del TTA-A2 no están siendo encapsulados en cavidades hidrófobas compactas que impongan restricciones espaciales y conformacionales. En la Tabla 9 se enlistan los modos de unión representativos que ocurrieron con mayor frecuencia dentro del ensamble reducido y en naranja se resaltan los modos de unión que satisfacen los criterios de selección establecidos.

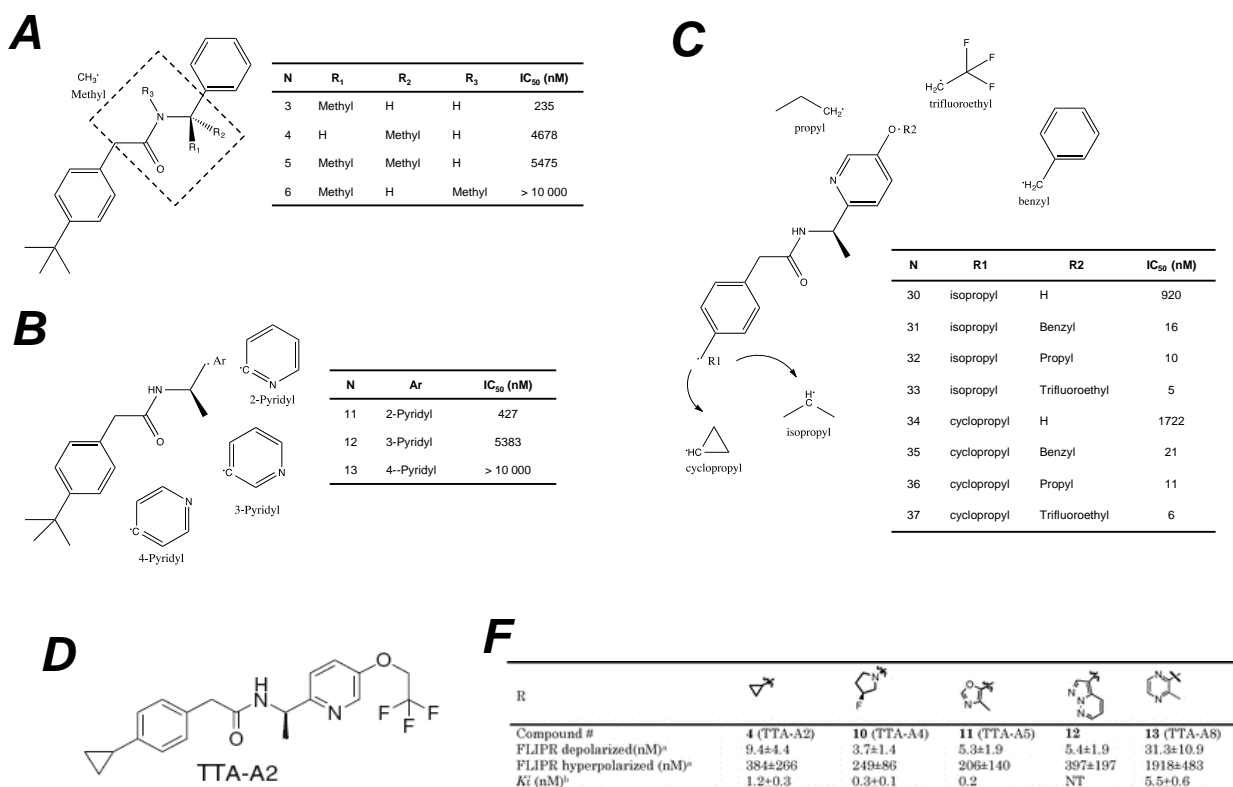


Figura 23. Criterios empleados en la selección del modo de unión del TTA-A2 en el canal Cav3.1. A - C) Valores de IC₅₀ obtenidos a partir de experimentos de FLIPR con el canal Cav3.3 para cada uno de los compuestos listados en la columna N. **A)** Estructura del compuesto prototipo (*lead compound*) que da origen al TTA-A2. Las variables R₁, R₂ y R₃ son substituidas en combinaciones por los grupos funcionales enlistados en la tabla correspondiente. **B)** Substitución del átomo de nitrógeno en todas las posiciones del anillo de benceno, a partir del átomo de carbono indicado. **C)** Substituciones en las posiciones indicadas por grupos funcionales estructuralmente diversos producen compuestos con potencia de bloqueo equivalente al TTA-A2. Tablas editadas de [148]. **D)** Estructura del TTA-A2. **E)** Diferentes substituciones de heterociclos en la posición R1 en **C)**, mejoraron la potencia de bloqueo del TTA-A2, exceptuando al compuesto 13. Estas substituciones incluyeron grupos hidrofílicos y grupos extensos como el caso del compuesto 12. Esto implica que el grupo ciclopropil del TTA-A2 no está siendo encapsulado en una cavidad hidrófoba compacta. Modificada de [149].

Tabla 9. Modos de unión representativos

Id. del modelo	21	21b	21b	24	24	30	32	32	33	33	36	39	39	40
# de residuos flexibles	0	0	5 ^b	2 ^a	2 ^a	2 ^a	2 ^a	7 ^e	2 ^a	5 ^c	2 ^a	13 ^d	2 ^a	8 ^f
# de simulación/ clasificación	1/1	1/1	1/4	5/1	5/2	3/1	2/5	1/4	1/2	1/3	2/1	2/2	2/4	1/5
Energía de interacción (kcal/Mol)	-8.7	-8.9	-9.2	-8.6	-8.6	-9.5	-8.1	-8.2	-8.7	-9.7	-9.2	-9.5	-9.0	-8.7
<i>e</i>	10	10	100	100	100	100	10	1000	100	100	100	1500	100	2000

Tabla de modelos del canal Cav3.1 empleados para las simulaciones de acoplamiento molecular. El Id. es un identificador interno de cada modelo de interacción Cav3.1-TTA-A2. El numero de residuos (aminoácidos) flexibles empleados y el parámetro *e* establecido durante las simulaciones (ver sección 3.5). El “# de simulación” indica en que ciclo de las repeticiones realizadas se obtuvo el modo de unión presentado y la “clasificación” indica su posición dentro del “ranking” basado en la energía calculada por la función de la energía de Vina, la cual es indicada en el renglón de “energía de interacción”.

Algunos modos de unión calculados por AutoDock Vina fueron minimizados localmente empleando el campo de fuerzas OPLS 2005, incluido en software Maestro (Schrödinger Release 2014-3, New York, NY). En total, se detectaron tres modos de unión representativos que son consistentes con las evidencias experimentales. Estos sitios de unión se encuentran superpuestos entre sí en la cavidad central y en parte de la interface formada por los dominios III y IV (Figura 24).

En las Figuras 25, 26 y 27 se muestran las interacciones del TTA-A2 con el canal Cav3.1 para cada uno de los tres modos de unión seleccionados. En el panel **A** de cada figura se ilustra la representación tridimensional de los aminoácidos que se encuentran a 4 Å de distancia de cualquier átomo del TTA-A2. En el panel **B**, se muestra el mapa bidimensional de interacciones correspondiente, y en el panel **C** el alineamiento múltiple de las secuencias de los canales Cav3.1 (CAC1G), Cav3.2 (CAC1H), Cav3.3 (CAC1I) y Cav1.2 (CAC1C) de humano.

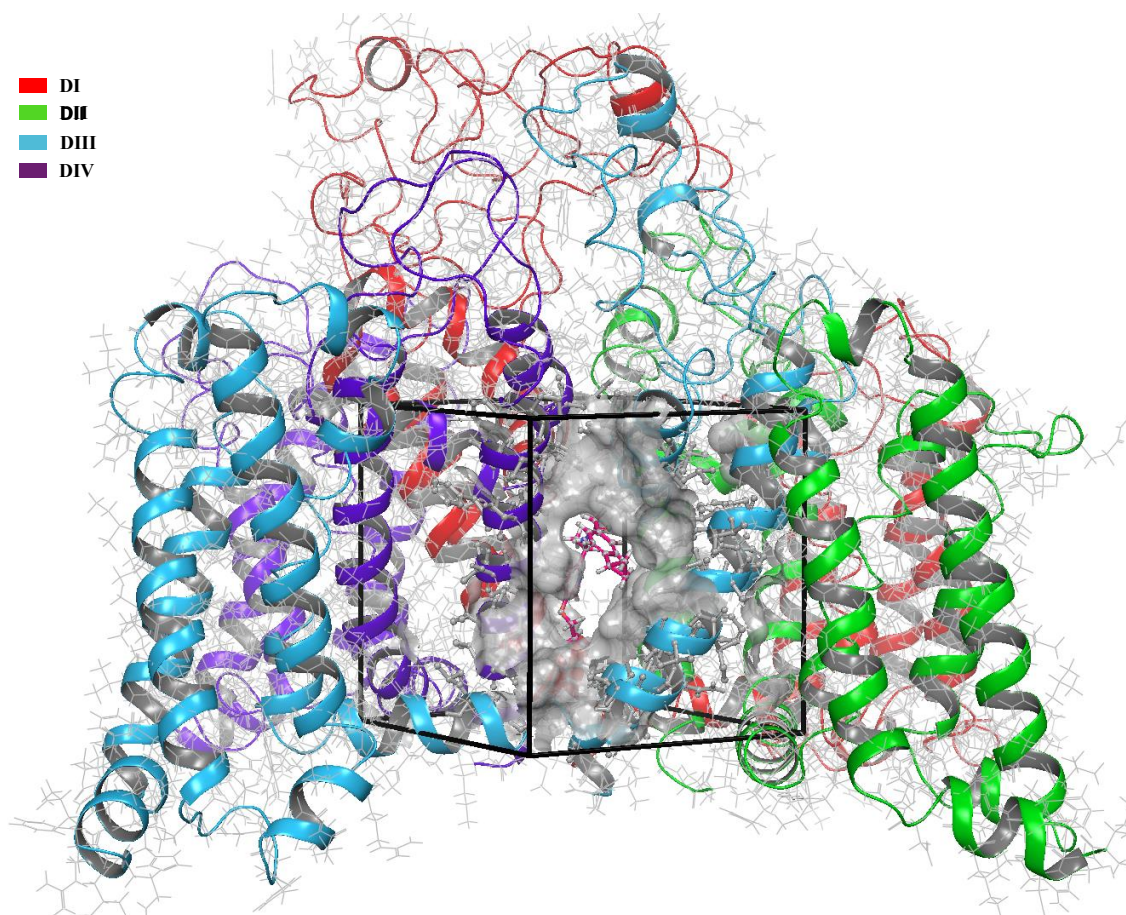


Figura 24. Sitio de unión del TTA-A2 en los canales de calcio tipo T $\text{Ca}_v3.1$. A) Modelo de los 24 segmentos transmembranales de canal $\text{Ca}_v3.1$ y las asas que los unen, donde se muestra que el TTA-A2 se acopla en la cavidad central formada por la interface de los dominios DIII y DIV. El paralelepípedo negro muestra la región en donde ocurren los modos de unión detectados y en gris obscuro se muestra la superficie molecular de los aminoácidos que se acoplan energéticamente con el TTA-A2 en el modo de unión ilustrado (Modo 3, ver Figura 27). La estructura del TTA-A2 se representa en esferas -núcleos de átomos- y cilindros -enlaces covalentes- coloreadas en rosa mexicano. Arriba a la izquierda se indica el patrón de colores de cada uno de los dominios del modelo tridimensional del canal $\text{Ca}_v3.1$.

Al analizar cada uno de los alineamientos (paneles C) se puede concluir que el sitio molecular de unión del TTA-A2 es el mismo para los tres canales Ca_v3 , lo cual no es tan sorprendente, si consideramos que más del 90% de los aminoácidos insertados en la membrana se conservan entre los tres miembros de esta familia (Figura 1 y 3A). La observación anterior se correlaciona bien con las IC_{50} reportadas para TTA-A2 en los canales $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{Ca}_v3.3$ [89]. En todos los modos de unión detectados, el grupo benceno del TTA-A2 realiza interacciones de apilamiento π - π [150], lo cual es común en anillos aromáticos, mientras que el átomo nitrógeno de la piridina y el átomo de oxígeno del grupo acetamida forman puentes de hidrógeno con la glutamina 1805.

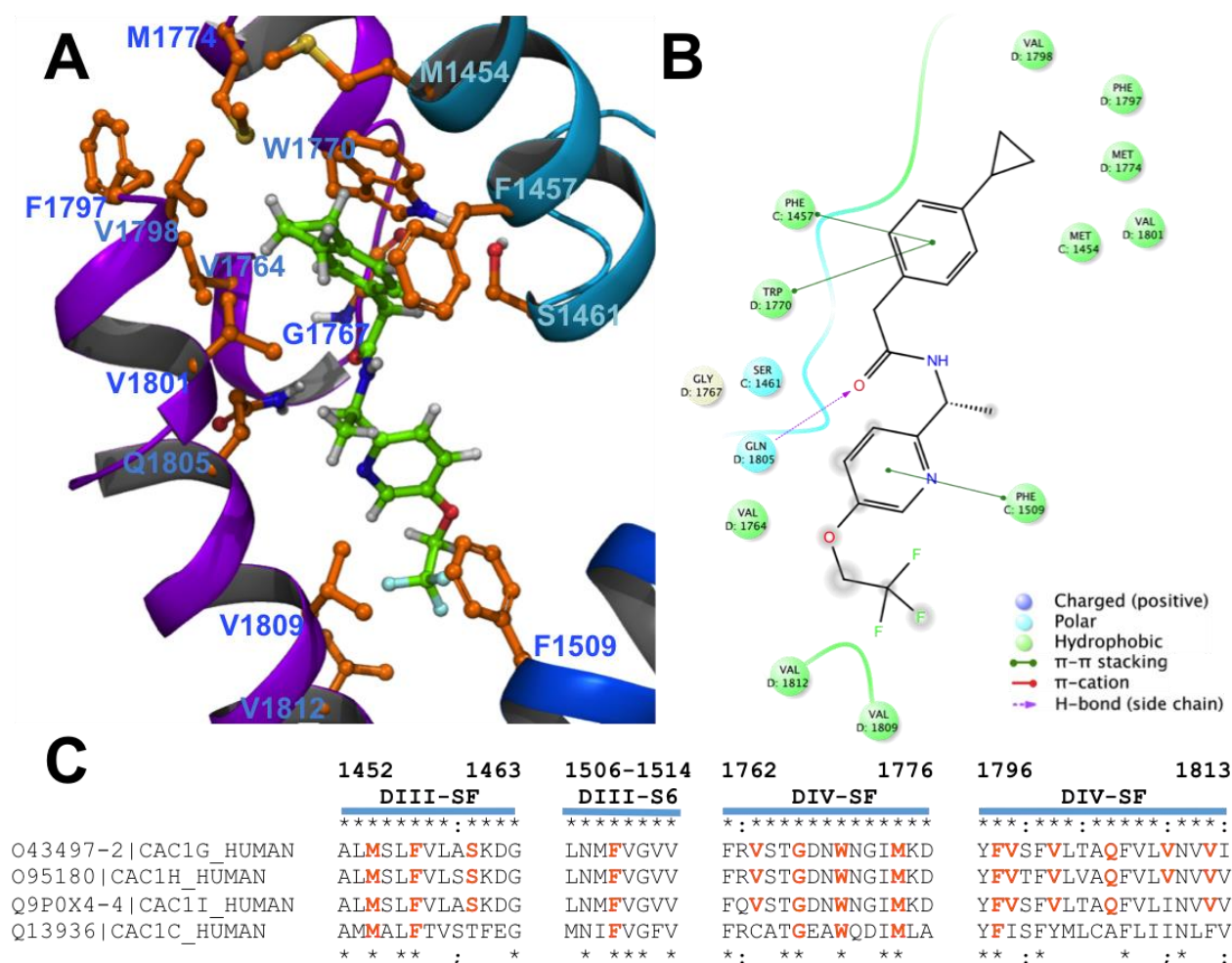


Figura 25. Modo de unión 1 del TTA-A2 en el canal $\text{Ca}_v3.1$. En este modo de unión el grupo benceno del TTA-A2 (estructura representada como esferas y cilindros en verde) se encuentra confinado en una “caja aromática”, formada por los aminoácidos W1770, F1457, y probablemente también F1797, similar a la descrita para el sitio de unión de la nicotina, en el receptor de acetilcolina nAChR [151]. Por otra parte, la glutamina 1805 provee la forma correcta para encapsular al grupo metilo del TTA-A2 en una interacción hidrófoba, permitiendo al mismo tiempo, la formación de un puente de hidrogeno. La piridina del TTA-A2 se acopla energéticamente con el aminoácido F1509 a través de interacciones de apilamiento $\pi - \pi$; mientras que el grupo CF_3 interactúa con los hidrocarburos de los aminoácidos V1809, V1812 y F1509. Otros modos de unión muy similares a este fueron detectados, con la excepción de que F1509 adoptó una conformación similar a la mostrada en los modos de unión 2 y 3 (Figuras 26 y 27); o en otros casos, la posición del grupo CF_3 del TTA-A2 se ubicó en una posición equivalente a la mostrada en el modo de unión 3 (por ejemplo, modelo Id. 33 con una $E = -9.7$ kcal/mol; Tabla 9). Código de colores: Dominio III en magenta y azul rey; Dominio IV en morado. **C)** A la izquierda de cada secuencia de aminoácidos se indica el código de acceso de cada canal en el servidor Uniprot KB. En la parte superior de los alineamientos se marca con (*) los aminoácidos que son comunes a los tres canales Ca_v3 y con (:) cuando solo coinciden dos de ellos. En la parte inferior, se emplea el mismo código de símbolos, pero ahora comparando cualquier miembro de los canales Ca_v3 con el canal $\text{Ca}_v1.2$; adicionalmente se usa el símbolo (;) para representar una sola coincidencia. En naranja se resaltan los aminoácidos señalados en A y B.

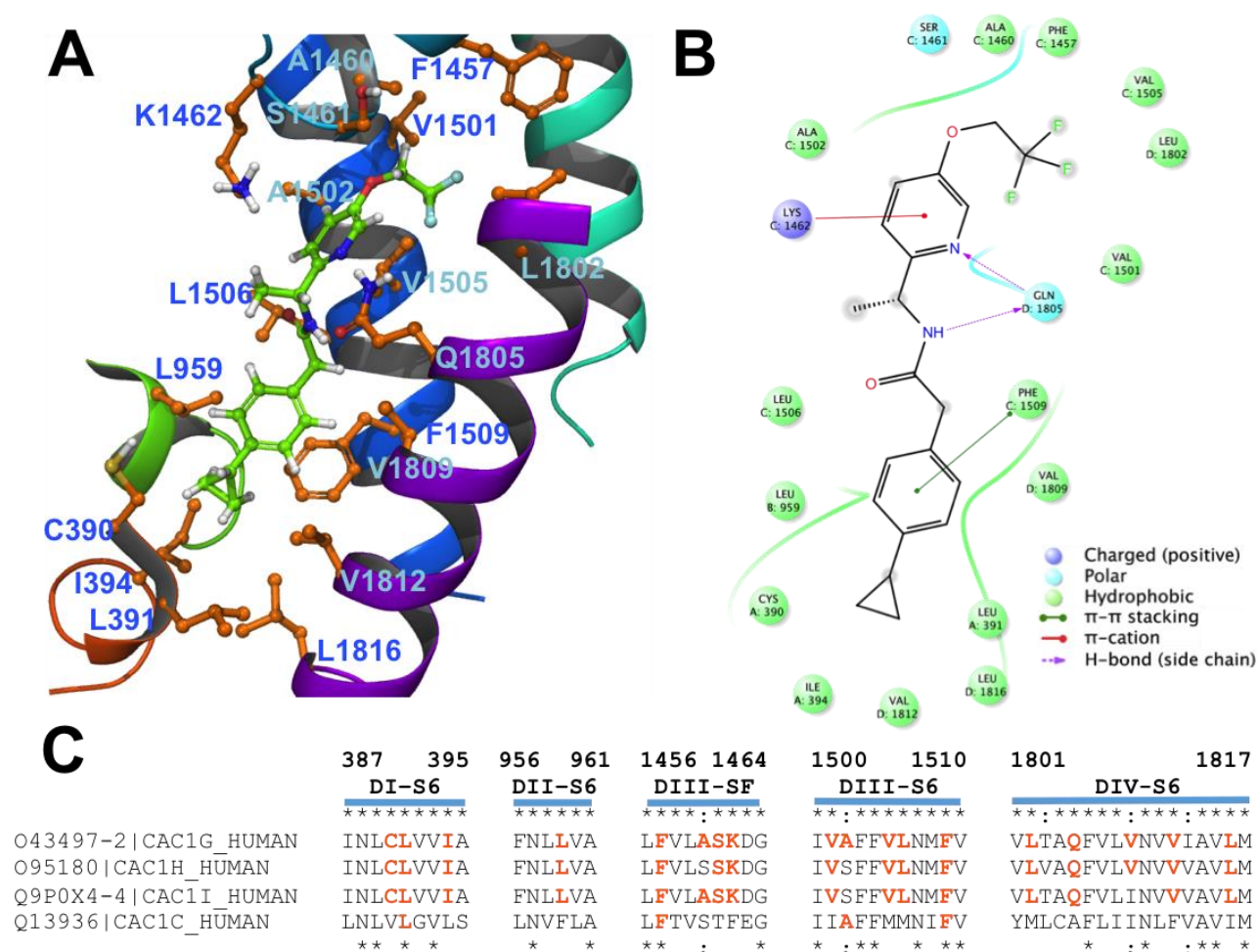


Figura 26. Modo de unión 2 del TTA-A2 en el canal Cay3.1. En este modelo de interacción el TTA-A2 obstruye la compuerta de activación (Figura 3D), encapsulando al grupo ciclopropil en una cavidad hidrofóbica formada por los aminoácidos indicados. Las interacciones que estabilizan principalmente al compuesto en esta posición son la interacción de apilamiento pi-pi con el aminoácido F1509, la interacción catión-pi [152] con el aminoácido K1462 y los puentes de hidrogeno formados con el aminoácido Q1805. En verde se muestra la región del Dominio II que forma parte del modo de unión 2.

Por otra parte, el grupo trifluorometilo (CF_3) es estabilizado por interacciones hidrófobas con los hidrocarburos de las cadenas laterales de los aminoácidos valina, leucina y fenilalanina, y en el modo de unión 3, con el átomo de sulfuro del aminoácido metionina 1508. Este patrón de interacciones es consistente con las mediciones del desplazamiento químico del isótopo ^{19}F en espectros de resonancia magnética nuclear de compuestos que contienen al grupo CF_3 . Estas mediciones mostraron que los átomos de flúor en esta configuración atómica particular, disminuyen su densidad electrónica (*deshielding*), otorgándole así propiedades hidrófobas [153].

La observación anterior se ha corroborado en proteínas resueltas por difracción de rayos X en complejo con ligandos que incluyen al grupo CF_3 [153]. También se ha demostrado que la sustitución del grupo CH_3 por uno CF_3 , aumenta hasta en nueve veces la afinidad de un compuesto por su sitio de unión [153], lo cual es consistente con lo mostrado en la Figura 23C.

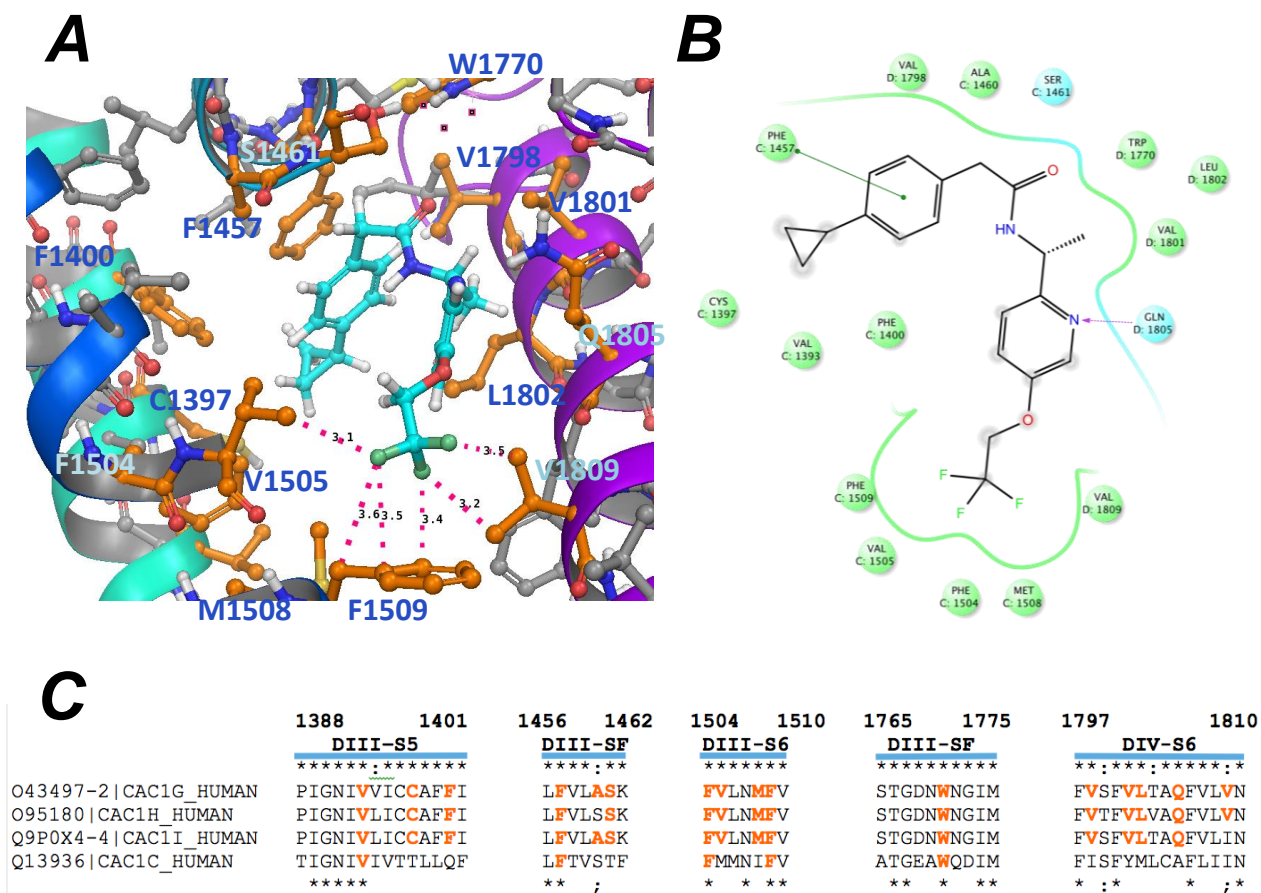


Figura 27. Modo de unión 3 del TTA-A2 en el $\text{Ca}_v3.1$. En el modo de unión 3 el TTA-A2 (azul agua) se acopla en la interface formada por los segmentos S5 y S6 del Dominio III y el segmento S6 del Dominio IV. El grupo benceno se encuentra confinado en “media caja aromática”, formada por los aminoácidos F1400 y F1457. Por otro lado, el grupo trifluorometil se encuentra encapsulado en una cavidad hidrofóbica, formada por aminoácidos como M1508 los cuales han sido relacionados con el mecanismo de inactivación de estos canales [70]. Las líneas punteadas muestran la distancia existente entre los átomos de flúor del TTA-A2 y los hidrocarburos de los aminoácidos indicados, así como también del átomo de sulfuro de la metionina 1508.

La pregunta lógica ahora es: ¿cuál de los tres modos de unión encontrados es el correcto? Para responder esta pregunta será necesario realizar experimentos adicionales a los de la presente disertación. Al comparar los aminoácidos del sitio de unión del canal $\text{Ca}_v3.1$ con los aminoácidos en las posiciones equivalentes del canal $\text{Ca}_v1.2$, el cual es insensible a este compuesto, es posible

determinar cuáles son los aminoácidos más relevantes para formar el sitio de alta afinidad del TTA-A2 en los canales de calcio tipo T. A continuación se enlistan las mutaciones necesarias para diferenciar entre cada modo de unión. Modo de unión 1: V1798Y. Modo de unión 2: K1462A, V1812F. Modo de unión 3: F1400A ó F1400Q, y M1508A. Aminoácidos importantes, comunes a los tres modos de unión: F1509A y V1809G ó V1809N. Cabe mencionar, como se indico en la Figura 24, que dentro del ensamble de modos de unión, se detectaron conformaciones que eran combinaciones de los tres modos de unión seleccionados, aun así, las mutaciones señaladas son suficientes para identificar a cualquiera de estos modos de unión similares que no fueron discutidos.

4.7. Efecto del TTA-Q4 y mibefradil en algunas de las mutaciones introducidas en el canal

Cav3.1

Para investigar si alguna de las mutaciones introducidas en el canal Cav3.1 pudiera formar parte del sitio de unión de algún otro bloqueador de los canales de calcio tipo T, otros compuestos como el TTA-Q4, TTA-P2 (resultados no mostrados) y el Mibefradil, fueron estudiados empleando el procedimiento experimental descrito para el TTA-A2. En la Figura 28 se resumen los resultados del bloqueo observado con el TTA-Q4 (3 μ M) en los canales indicados.

El TTA-Q4 es un bloqueador dependiente de estado, potente y selectivo de los canales de calcio tipo T. Una de las características más interesantes que presenta este compuesto es que es un modulador alostérico, cuya presencia incrementa la potencia de bloqueo del TTA-A2 mediante un mecanismo sinérgico [93]. A través de experimentos de marcaje radioactivo usados para construir curvas de competición, se ha demostrado que el TTA-Q4 actúa en un sitio de unión diferente al TTA-A2 [93]. El perfil de bloqueo observado para el TTA-Q4 (Figura 28), corrobora esta afirmación, ya que el porcentaje de bloqueo de las corrientes de calcio en los canales mutantes probados no es significativamente diferente al del canal Cav3.1 silvestre, aunque el error asociado en algunos casos es muy grande. Cabe mencionar, que estos resultados deben tomarse con precaución, puesto que las células empleadas durante los experimentos con este compuesto fueron previamente usadas en los mismos experimentos aquí reportados para el TTA-A2, es decir, una vez que se retiraba este último compuesto mediante la perfusión de la cámara de registro con la solución externa (durante periodos de 10 a 15 minutos), se agregaba el TTA-Q4 para observar su

efecto sobre la amplitud de las corrientes de calcio. Por razón no es posible garantizar la integridad de las células, así como tampoco el control de todas las variables experimentales. No obstante, estos resultados marcan una pauta y corroboran un resultado esperado, demostrando mediante un experimento a nivel molecular, que el TTA-Q4 actúa en un sitio de unión diferente al TTA-A2. Sin duda será necesario repetir estos experimentos investigando exclusivamente las propiedades de bloqueo del TTA-Q4 en los canales mutantes de la posición Q1805.

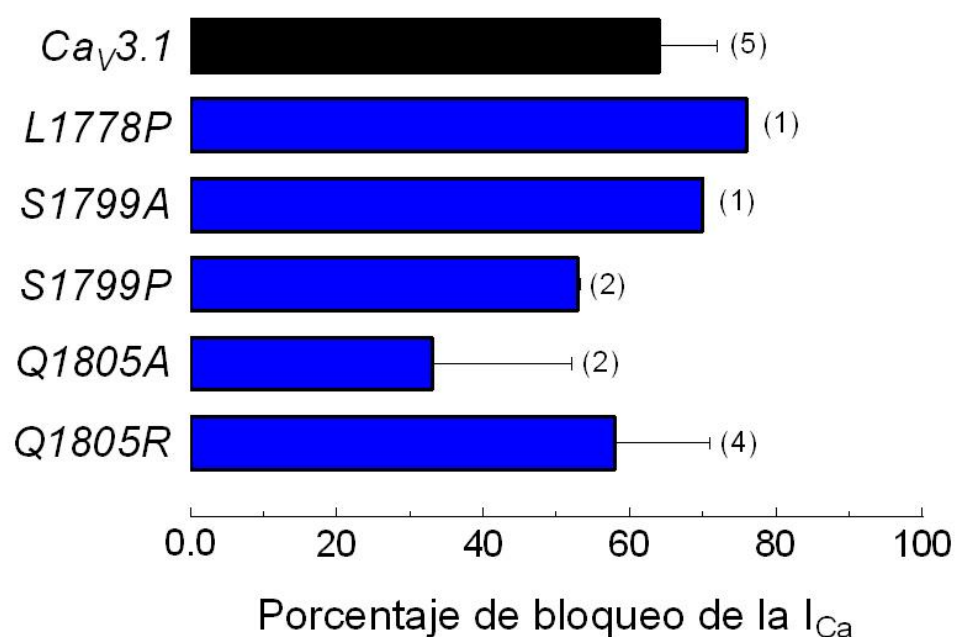


Figura 28. Efecto del TTA-Q4 en la amplitud de corriente de las mutaciones indicadas. Se grafica el porcentaje de bloqueo en cada una de los canales indicados por el efecto de 3 μ M de TTA-Q4. Todas las células reportadas aquí fueron expuestas previamente a la acción del TTA-A2. Los datos son el promedio \pm EE. Entre paréntesis se indica el número de células investigadas para cada mutante. En ninguno de los casos, el cambio en el porcentaje de bloqueo es significativo con respecto al control, ya sea porque el número de observaciones fue solo uno o porque el error estándar fue considerablemente alto.

Otro de los antagonistas de los canales Ca_v3 explorados en este trabajo fue el mibefradil. A diferencia de los experimentos con el TTA-Q4, en la mayoría de los experimentos con el mibefradil se usaron células exclusivamente preparadas para observar el efecto de este bloqueador, tal como fue en el caso del TTA-A2. El mibefradil también es un bloqueador dependiente de estado de los canales de calcio tipo T, aunque no muy selectivo [82, 154-155]. En la Figura 29 se ilustra el perfil de bloqueo del mibefradil en los canales $Ca_v3.1$ silvestre y mutantes.

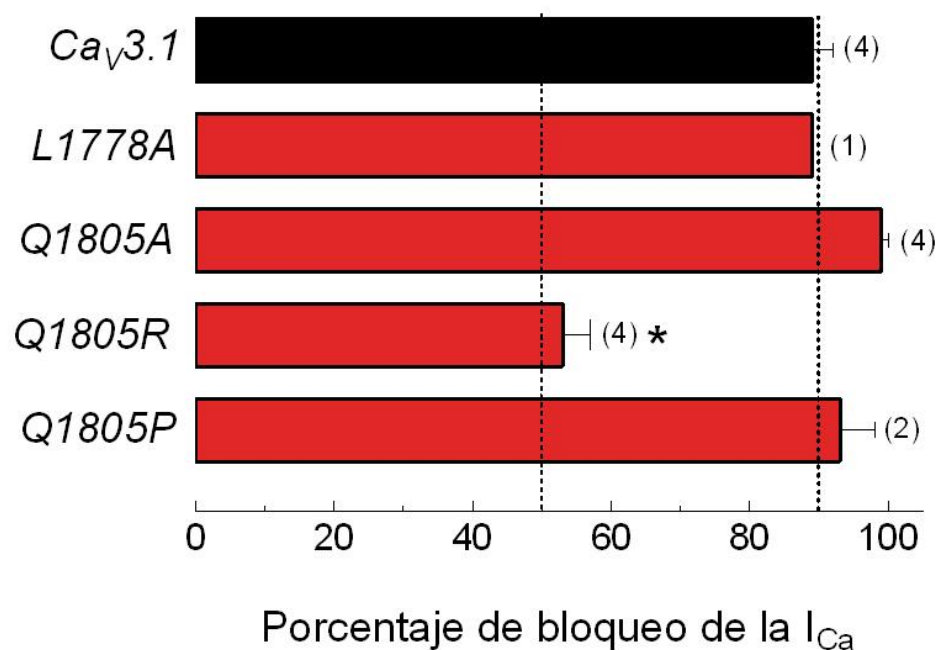


Figura 29. Porcentaje de bloqueo de la I_{Ca} inducido por el Mibefradil en los canales $Ca_V3.1$. Porcentaje de la inhibición de la corriente de calcio del canal $Ca_V3.1$ y las mutantes señaladas inducido por la presencia de 1.5 μM de Mibefradil en la solución de registro externa. Los datos son el promedio \pm EE. Entre paréntesis se indica el número de células investigadas para cada mutante. Las mutantes cuyo porcentaje de inhibición fue estadísticamente diferente con respecto al control ($Ca_V3.1$) se distinguen con un asterisco ($P < 0.05$).

De las mutaciones investigadas, la mutante Q1805R fue la única que mostró un porcentaje de bloqueo significativamente diferente al observado en el canal $Ca_V3.1$ silvestre. En este caso el bloqueo disminuyó de $89 \pm 3\%$ a $53 \pm 4\%$ ($n = 4$ en cada caso; $P < 0.05$), es decir el mibefradil fue menos potente en casi un 40%, en la mutante Q1805R. El hecho de que las mutaciones Q1805A y Q1805P no hayan seguido el mismo comportamiento sugiere que la extensa cadena de hidrocarburos, cargada positivamente, de la arginina está impidiendo de alguna manera que el mibefradil acceda o se acople a su sitio de unión. Este resultado es muy relevante ya que demuestra que aunque el aminoácido Q1805 no se acopla energéticamente con el mibefradil, si está lo suficientemente cerca como para afectar su acción en el canal $Ca_V3.1$.

4.8. Mecanismo de bloqueo del TTA-A2 en los canales Ca_v3 y su relación con el mecanismo de bloqueo de otros antagonistas de los canales de calcio tipo T

Los resultados obtenidos en la estructura del canal $\text{Ca}_v3.1$ (Sección 4.4), las simulaciones de acoplamiento molecular (Sección 4.4.3. y 4.6), así como el perfil de bloqueo del TTA-A2 en las mutaciones Q1805 (Sección 4.5 y 4.7), permiten establecer un modelo del mecanismo utilizado por el TTA-A2 y otros bloqueadores similares para bloquear los canales Ca_v3 , mismo que será descrito a continuación para un caso particular y posteriormente se generalizará para una categoría de compuestos similares.

Como se revisó en la Sección 1.2.3.5, el TTA-A2 modifica las propiedades electrofisiológicas de los canales Ca_v3 , desplazando a la izquierda de las curvas de inactivación en estado estacionario y enlenteciendo la recuperación del estado inactivado. El efecto sobre estas dos propiedades ha sido observado con otros bloqueadores de estos canales. Las bases moleculares que expliquen por qué bloqueadores estructuralmente diversos comparten características similares en su efecto antagonista, se desconocen a la fecha. En este aspecto estudios de competición, similares a los realizados en enzimas, han demostrado que los sitios moleculares de unión de bloqueadores como el mibefradil, TTA-P2, TTA-I1, pimoizida, TTA-Q4, flunarizina, etc., en los canales de calcio tipo T se superponen o interactúan de manera alostérica con el sitio de unión del TTA-A2 [93].

En la Figura 30A se muestra el modelo tridimensional de la estructura del canal $\text{Ca}_v3.1$ en complejo con fragmentos de la molécula 1,2-Dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (DMPC), la cual forma parte de la mayoría de las membranas celulares. Este fragmento fue extraído de la estructura del canal quimérico de sodio Ca_vAb (PDB Id. 4MS2) y fue incluido en las simulaciones de dinámica molecular durante las etapas de refinamiento con el propósito de observar su estabilidad en la estructura del canal $\text{Ca}_v3.1$ (Sección 4.4.2.). Moduladores endógenos de los canales de calcio tipo T, como los lipoaminoácidos (N-acyl glycine) inhiben las corrientes tipo T de forma similar a la exhibida por el TTA-A2. Los lípidos endógenos que bloquean a los canales Ca_v3 también son dependientes de estado y bloquean en el rango sub-micromolar, únicamente a potenciales parcialmente despolarizados de la membrana (~ -75 mV), donde una importante fracción de canales se encuentran inactivados. Se ha demostrado que existe una correlación entre el porcentaje de inhibición en las corrientes tipo T por lipoaminoácidos y lipo-neurotransmisores, con el número de enlaces dobles presentes en su estructura química [81] (Figura 30B).

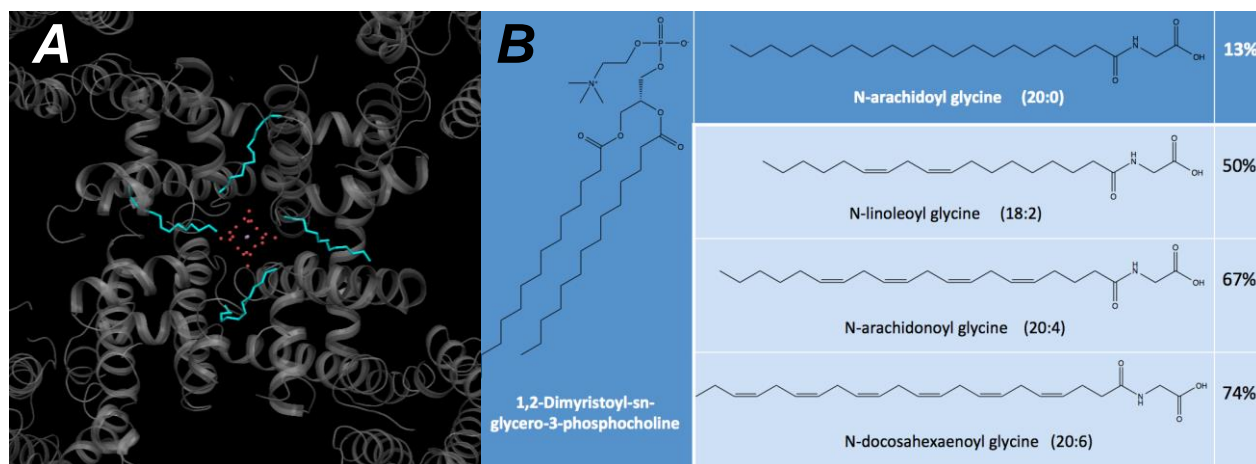


Figura 30. Modelo del mecanismo de bloqueo de los lipoaminoácidos en los canales de calcio tipo T. A) Vista superior del modelo del canal $\text{Ca}_v3.1$ (modelo 39, Tabla 9), representado como listones (gris) en complejo con un fragmento (cian) de 20 hidrocarburos del fosfolípido 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DMPC), representado los enlaces covalentes como cilindros. Las esferas rojas representan moléculas de agua que coordinan al ion Ca^{2+} en el filtro de selectividad. **B)** Tabla de la estructura química de lipoaminoácidos (N-acyl glycine) y el fosfolípido DMPC. Con fondo azul oscuro se resaltan las estructuras que no presentan actividad antagonista en los canales Ca_v3 . En la notación (S:D), S indica el número de enlaces covalentes simples y D el número de enlaces dobles, entre átomos de carbono presentes en cada estructura indicada. En la última columna se muestra el porcentaje de inhibición inducido en las corrientes del canal $\text{Ca}_v3.3$ por concentraciones de $3 \mu\text{M}$ de cada molécula indicada [81].

Al observar la Figura 30A se puede tener una idea clara de lo que puede estar ocurriendo a nivel molecular. En las simulaciones de *docking* (Sección 4.4.3. y 4.6.) se encontró que el TTA-A2 se liga en regiones de la cavidad central y/o en la interface de los dominios III y IV. Por otra parte, los modelos del canal Cav3.1 en complejo con fragmentos del fosfolípido DMPC (20:0), muestran que las largas cadenas de hidrocarburos de los lípidos que constituyen a las membranas pueden llegar muy profundo dentro de la estructura interna de estos canales, incluso hasta alcanzar el interior de la cavidad central. El lipo-aminoácido N-arachidoyl-glycine (20:0 Gly), posee una estructura equivalente a la de la cadena de hidrocarburos de las colas hidrófobas del fosfolípido DMPC (20:0) (Figura 30B). Lo anterior implica que el lípido 20:0 Gly debe penetrar de manera similar por los conductos de estos canales. Al aumentar el número de enlaces dobles en los ácidos grasos, su fluidez en la membrana aumenta y los grados de libertad en las conformaciones que su estructura puede adoptar se restringen. De esta forma, los lípidos bioactivos insaturados (ej. NAGLy 20:4, Figura 30B), penetran más fácilmente por los conductos laterales, que su contrapartes saturadas (ej. 20:0 Gly). Debido a las restricciones conformacionales impuestas en los lipoaminoácidos insaturados, su presencia en la cavidad central o proximidades es más estable, pudiendo incluso establecer contacto con los aminoácidos del sitio de unión del TTA-A2. Por el contrario, la estructura del lípido saturado 20:0 Gly, al poseer un mayor número de grados de libertad, fluctúa debido a las vibraciones térmicas, lo cual impide que su estructura establezca contactos estables con los aminoácidos de la cavidad central. El mismo argumento puede explicar por qué los lípidos insaturados pueden desplazar al [³H]TTA-A1 de su sitio de unión de una manera dependiente de concentración, mientras que los lípidos saturados no son capaces de hacerlo. Aunque el lípido 20:0 Gly no puede desplazar al [³H]TTA-A1, sin importar cuánto se aumente su concentración, bastan 3 μ M de este lípido saturado para inducir una leve inhibición detectable en las corrientes tipo T, y cuyas propiedades son similares a las inducidas por el compuesto sintético más potente, el TTA-A2, o los lípidos endógenos mostrados en la Figura 30B. Para explicar lo que implica la observación anterior, se puede hacer la analogía con lo que ocurre en las enzimas. Brevemente, las enzimas son proteínas que poseen un substrato molecular, este substrato corresponde a una molécula con un sitio de unión específico en la proteína y cuya unión en este sitio, es capaz de promover la función de la enzima. Cuando el substrato se une a su sitio de unión, la enzima cataliza una reacción química, dando como resultado la producción de otra molécula (producto). Un fármaco que tenga como blanco terapéutico a una enzima, competirá por el sitio de unión del substrato impidiendo que este se acople a su sitio de unión, lo cual se ve

reflejado en la disminución del producto catalizado (es decir, inhibe el funcionamiento de la enzima), y esto da lugar a las curvas de competición. En el caso de un canal iónico, un bloqueador dependiente de estado que presente características similares a las inducidas por el TTA-A2, debe tener como sustrato molecular al mecanismo encargado de modular la inactivación de estos canales, ya que su acoplamiento “compite” por inhibir su funcionamiento. Por esta razón, a pesar de que el lípido 20:0 Gly posee una afinidad muy baja por el canal $\text{Ca}_v3.3$, tiene como sustrato molecular a este mecanismo, y por esta razón es capaz de inhibir levemente su funcionamiento pero no es capaz de desplazar (competir) con una molécula que tenga mayor afinidad por el mismo sustrato.

Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que un sustrato (sitio de unión relevante como blanco terapéutico) de muchos bloqueadores dependientes de estado, se encuentra en la cavidad central de los canales Ca_v3 , lo cual es un resultado completamente novedoso que no ha sido reportado en ningún otro trabajo de investigación. Pero las conclusiones pueden ser llevadas aun más lejos. Como se menciona en la Introducción (Sección 1.2.3.3), los cambios conformacionales necesarios para inactivar a los canales de calcio tipo T se desconocen, y a diferencia de otros canales iónicos activados por voltaje como los canales de sodio, la estructura involucrada en la inactivación, parece estar dispersas en muchos sitios diferentes de estas proteínas. Una de estas estructuras, es la denominada FMV, la cual se encuentra en el segmento S6 del dominio III. Todos los modos de unión seleccionados en la Sección 4.6, ubican al TTA-A2 en contacto con el aminoácido F1509 y/o M1508, quienes forman parte de la estructura FMV. Se ha demostrado que estos aminoácidos contribuyen de manera relevante a las propiedades relacionadas con la inactivación de estos canales [70]. Por otra parte, en las simulaciones de acoplamiento molecular se detectó que el aminoácido F1509 suele adoptar una de dos conformaciones posibles, las cuales denominaremos $|\uparrow\rangle$, (Figura 25), y $|\downarrow\rangle$ (Figuras 26 y 27). Los modelos de menor energía obtenidos de la etapa de modelado, presentaron en la mayoría de los casos, la conformación $|\downarrow\rangle$. En ausencia del campo eléctrico los canales $\text{Ca}_v3.1$ tienden a inactivarse, por lo que la conformación adquirida a 0 mV es teóricamente el estado de mínima energía para cualquier proteína modulada por voltaje. Esto nos sugiere que la conformación $|\downarrow\rangle$ es la que adopta este aminoácido cuando el canal se inactiva. Por lo que el mecanismo empleado por bloqueadores como el TTA-A2, es mantener al aminoácido F1509 en el estado $|\downarrow\rangle$ al aminoácido F1509.

En conclusión, el modelo propuesto para el mecanismo molecular de bloqueo de los canales de calcio tipo T, consiste en el acceso de un compuesto a la cavidad central, cuando el canal se inactiva, los aminoácidos de la estructura FMV adoptan una conformación “inactivada” favoreciendo, directa o indirectamente, el acoplamiento de bloqueadores dependientes de estado, con los aminoácidos de esta estructura. Puesto que la conformación inactivada de la estructura FMV es el blanco molecular de estos bloqueadores, su interacción energéticamente favorable, impide que estos aminoácidos regresen a su conformación “no inactivada”. Este modelo no descarta la posibilidad de que estos bloqueadores puedan inducir la inactivación. Por ejemplo el bloqueo tónico del TTA-A2 es de apenas del 5%. Es importante recalcar que el mecanismo de bloqueo establecido, solo es aplicable a compuestos que satisfacen las siguientes condiciones al mismo tiempo.

A. El compuesto debe bloquear de forma dependiente de estado y exhibir las mismas características de bloqueo que el TTA-A2, (sección 1.D).

B. Su sitio de unión debe superponerse con el del TTA-A2, (es decir, debe desplazar al [^3H]TTA-A1 de una forma dependiente de concentración).

A continuación ejemplificaremos los tres escenarios posibles, usando la notación 0 para el incumplimiento de la regla indicada y 1 para indicar su cumplimiento.

(A. 0, B. 1). El TTA-P2 desplaza al [^3H]TTA-A1, pero no es un bloqueador dependiente de estado, por lo que muy probablemente no esté interaccionando con la estructura FMV.

(A. 0, B. 0) La Zonisamida, bloquea a estos canales de forma independiente de estado [156], además de no desplazar al [^3H]TTA-A1, por esta razón, el mecanismo de bloqueo de este fármaco es incompatible con el aquí descrito, seguramente teniendo un mecanismo de bloqueo diferente.

(A 1, B. 0) Por último, existe una posibilidad ambigua, compuestos con propiedades iguales a las del TTA-A2, como la etosuximida, no desplazan al [^3H]TTA-A1, por lo que su substrato molecular puede incluir a otras estructuras que estén involucradas en la inactivación. Pero esto no

descarta la posibilidad de que tengan una interacción muy débil sobre la estructura FMV, como ocurre en el caso del lípido saturado 20:0 Gly. Así que para poder determinar si su acción de bloqueo es o no a través del modelo descrito, es necesario saber si su IC_{50} es comparable a este ácido graso, si es mucho menor entonces se trata de un bloqueador relativamente potente, y muy probablemente no siga el mecanismo de bloqueo descrito en la presente disertación.

5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis permitieron dilucidar experimentalmente un aminoácido que forma parte del sitio de unión del TTA-A2 en los canales de calcio tipo T. Este es el primer reporte en la literatura científica acerca de este tópico. Además, también se describió un modelo probable del mecanismo de bloqueo adoptado por el TTA-A2 y varios bloqueadores dependientes de estado de estos canales, mismo que es soportado por la evidencia experimental aquí documentada. A continuación se desglosan las conclusiones de manera puntual:

1. La Q1805 es parte del sitio de unión del TTA-A2 y el sitio de unión para este compuesto se conserva para los tres miembros de la familia de canales de calcio tipo T.
2. La Q1805 no se relaciona con ningún mecanismo que tenga que ver con la activación del canal $\text{Ca}_v3.1$. Probablemente este aminoácido contribuya en la formación de la estructura interna del entramado de moléculas de agua presentes en la cavidad central, encargado de hidratar a los iones calcio para favorecer su paso a través del poro del canal.
3. El sitio de unión o substrato molecular (relevante como blanco terapéutico) de muchos bloqueadores dependientes de estado, similares al TTA-A2, se encuentra en la cavidad central de los canales Ca_v3 . Los estudios de modelado y *docking* sugieren que la estructura MFV, particularmente los aminoácidos M1508 y F1509, son cruciales para las características de bloqueo al TTA-A2.
4. La cavidad central es el sitio molecular de unión de al menos otros compuestos que no son "como el TTA-A2", por ejemplo, el TTA-P2 y el TTA-I1. El resultado anterior es muy importante ya que muestra la región en donde se ubica otro posible blanco terapéutico para la categoría de bloqueadores dependientes de estado, los cuales pueden ser empleados para el tratamiento de una gama diferente de patologías.
5. Mutaciones en la posición Q1805 no afectan la potencia de bloqueo del TTA-Q4, demostrando que este aminoácido no se acopla energéticamente con este compuesto.

6. El mibefradil, es un bloqueador "como el TTA-A2" y la mutación Q1805R dificulta su acoplamiento con su sitio de unión, demostrando a nivel molecular la superposición del sitio de unión de este compuesto con el del TTA-A2.

El descubrimiento de la estructura MFV como uno de los blancos moleculares de los bloqueadores "como el TTA-A2", permitirá clasificar el tipo de enfermedades que se pueden tratar al inhibir este mecanismo. Cuando sea posible hacer lo mismo para otros compuestos se podrán diseñar terapias racionalmente basadas en el mecanismo de bloqueo empleado por el antagonista más adecuado. Sin duda, esta estrategia experimental y el conjunto de conocimientos surgido a partir de ésta, pueden ser aplicados a otros canales iónicos activados por voltaje.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Hille, B., *Ion channels of excitable membranes*. 3rd ed. 2001, Sunderland, Mass.: Sinauer. xviii, 814 p.
2. Hodgkin, A.L. and A.F. Huxley, *Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo*. J Physiol, 1952. **116**(4): p. 449-72.
3. Hladky, S.B. and D.A. Haydon, *Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. I. Studies of the unit conductance channel*. Biochim Biophys Acta, 1972. **274**(2): p. 294-312.
4. Lipscombe, D.A.T., Cecilia P (2013) *Ion Channels*. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000150.pub3.
5. Berridge, M.J., P. Lipp, and M.D. Bootman, *The versatility and universality of calcium signalling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 11-21.
6. Reuter, H., *Properties of two inward membrane currents in the heart*. Annu Rev Physiol, 1979. **41**: p. 413-24.
7. Tsien, R.W., *Calcium channels in excitable cell membranes*. Annu Rev Physiol, 1983. **45**: p. 341-58.
8. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
9. Catterall, W.A., *Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: a tale of two calcium channels*. Cell, 1991. **64**(5): p. 871-4.
10. Tanabe, T., et al., *Structure and function of voltage-dependent calcium channels from muscle*. Ann N Y Acad Sci, 1993. **707**: p. 81-6.
11. Yang, S.N. and P.O. Berggren, *The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic beta-cell physiology and pathophysiology*. Endocr Rev, 2006. **27**(6): p. 621-76.
12. Catterall, W.A. and A.P. Few, *Calcium channel regulation and presynaptic plasticity*. Neuron, 2008. **59**(6): p. 882-901.
13. Dunlap, K., J.I. Luebke, and T.J. Turner, *Exocytotic Ca²⁺ channels in mammalian central neurons*. Trends Neurosci, 1995. **18**(2): p. 89-98.
14. Tsien, R.W., et al., *Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation*. Trends Neurosci, 1988. **11**(10): p. 431-8.
15. Huguenard, J.R., *Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons*. Annu Rev Physiol, 1996. **58**: p. 329-48.
16. Hagiwara, S. and L. Byerly, *Calcium-Channel*. Annual Review of Neuroscience, 1981. **4**: p. 69-125.
17. Armstrong, C.M. and D.R. Matteson, *Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells*. Science, 1985. **227**(4682): p. 65-7.
18. Carbone, E. and H.D. Lux, *A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones*. Nature, 1984. **310**(5977): p. 501-2.
19. Hagiwara, S. and H. Ohmori, *Studies of calcium channels in rat clonal pituitary cells with patch electrode voltage clamp*. J Physiol, 1982. **331**: p. 231-52.
20. Veselovskii, N.S. and S.A. Fedulova, *[2 types of calcium channels in the somatic membrane of spinal ganglion neurons in the rat]*. Dokl Akad Nauk SSSR, 1983. **268**(3): p. 747-50.
21. Nowycky, M.C., A.P. Fox, and R.W. Tsien, *Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity*. Nature, 1985. **316**(6027): p. 440-3.
22. Olivera, B.M., et al., *Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 823-67.
23. Randall, A. and R.W. Tsien, *Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons*. J Neurosci, 1995. **15**(4): p. 2995-3012.
24. Bourinet, E., et al., *Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels*. Nat Neurosci, 1999. **2**(5): p. 407-15.
25. Catterall, W.A., *Voltage-Gated Calcium Channels*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011. **3**(8).
26. Curtis, B.M. and W.A. Catterall, *Purification of the Calcium-Antagonist Receptor of the Voltage-Sensitive Calcium-Channel from Skeletal-Muscle Transverse Tubules*. Biochemistry, 1984. **23**(10): p. 2113-2118.
27. Takahashi, M., et al., *Subunit Structure of Dihydropyridine-Sensitive Calcium Channels from Skeletal-Muscle*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987. **84**(15): p. 5478-5482.
28. Flockerzi, V., et al., *Purified Dihydropyridine-Binding Site from Skeletal-Muscle T-Tubules Is a Functional Calcium-Channel*. Nature, 1986. **323**(6083): p. 66-68.
29. Hosey, M.M., et al., *Photoaffinity-Labeling and Phosphorylation of a 165 Kilodalton Peptide Associated with Dihydropyridine and Phenylalkylamine-Sensitive Calcium Channels*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1987. **147**(3): p. 1137-1145.
30. Perez-Reyes, E., *Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family*. Cell Mol Life Sci, 1999. **56**(7-8): p. 660-9.
31. Ertel, E.A., et al., *Nomenclature of voltage-gated calcium channels*. Neuron, 2000. **25**(3): p. 533-5.

32. Chandy, K.G. and G.A. Gutman, *Nomenclature for mammalian potassium channel genes*. Trends Pharmacol Sci, 1993. **14**(12): p. 434.
33. Goldin, A.L., et al., *Nomenclature of voltage-gated sodium channels*. Neuron, 2000. **28**(2): p. 365-8.
34. Perez-Reyes, E., et al., *Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel*. Nature, 1998. **391**(6670): p. 896-900.
35. Cribbs, L.L., et al., *Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family*. Circ Res, 1998. **83**(1): p. 103-9.
36. Gomora, J.C., et al., *Cloning and expression of the human T-type channel Ca(v)3.3: insights into prepulse facilitation*. Biophys J, 2002. **83**(1): p. 229-41.
37. Huber, I., et al., *Conserved Ca²⁺-antagonist-binding properties and putative folding structure of a recombinant high-affinity dihydropyridine-binding domain*. Biochem J, 2000. **347 Pt 3**: p. 829-36.
38. Mitterdorfer, J., et al., *Molecular basis of drug interaction with L-type Ca²⁺ channels*. J Bioenerg Biomembr, 1998. **30**(4): p. 319-34.
39. Yang, J., et al., *Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels*. Nature, 1993. **366**(6451): p. 158-61.
40. Tang, S., et al., *Molecular localization of ion selectivity sites within the pore of a human L-type cardiac calcium channel*. J Biol Chem, 1993. **268**(18): p. 13026-9.
41. Parent, L. and M. Gopalakrishnan, *Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca²⁺ channel*. Biophys J, 1995. **69**(5): p. 1801-13.
42. Terlau, H., et al., *Mapping the Site of Block by Tetrodotoxin and Saxitoxin of Sodium Channel- α* . Febs Letters, 1991. **293**(1-2): p. 93-96.
43. Heinemann, S.H., et al., *Calcium-Channel Characteristics Conferred on the Sodium-Channel by Single Mutations*. Nature, 1992. **356**(6368): p. 441-443.
44. Arikath, J. and K.P. Campbell, *Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex*. Curr Opin Neurobiol, 2003. **13**(3): p. 298-307.
45. Gurnett, C.A., M. De Waard, and K.P. Campbell, *Dual function of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 2 delta subunit in current stimulation and subunit interaction*. Neuron, 1996. **16**(2): p. 431-40.
46. Davies, A., et al., *Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(5): p. 220-8.
47. Bauer, C.S., et al., *A new look at calcium channel alpha2delta subunits*. Curr Opin Neurobiol, 2010. **20**(5): p. 563-71.
48. Walker, D. and M. De Waard, *Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function*. Trends Neurosci, 1998. **21**(4): p. 148-54.
49. Kang, M.G. and K.P. Campbell, *Gamma subunit of voltage-activated calcium channels*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 21315-8.
50. Catterall, W.A., *Voltage-gated calcium channels*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(8): p. a003947.
51. Dolphin, A.C., et al., *The effect of alpha2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha1G*. J Physiol, 1999. **519 Pt 1**: p. 35-45.
52. Dubel, S.J., et al., *Plasma membrane expression of T-type calcium channel alpha(1) subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits*. J Biol Chem, 2004. **279**(28): p. 29263-9.
53. Hansen, J.P., et al., *Calcium channel gamma6 subunits are unique modulators of low voltage-activated (Cav3.1) calcium current*. J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(6): p. 1147-58.
54. Randall, A. and C.D. Benham, *Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels*. Molecular and Cellular Neuroscience, 1999. **14**(4-5): p. 255-272.
55. Perez-Reyes, E., *Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels*. Physiol Rev, 2003. **83**(1): p. 117-61.
56. Zamponi, G.W., et al., *Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways*. Brain Res Rev, 2009. **60**(1): p. 84-9.
57. Beenhakker, M.P. and J.R. Huguenard, *Neurons that fire together also conspire together: is normal sleep circuitry hijacked to generate epilepsy?* Neuron, 2009. **62**(5): p. 612-32.
58. Crunelli, V., D.W. Cope, and S.W. Hughes, *Thalamic T-type Ca²⁺ channels and NREM sleep*. Cell Calcium, 2006. **40**(2): p. 175-90.
59. McCormick, D.A. and T. Bal, *Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms*. Annu Rev Neurosci, 1997. **20**: p. 185-215.
60. Steriade, M., D.A. McCormick, and T.J. Sejnowski, *Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain*. Science, 1993. **262**(5134): p. 679-85.
61. Huguenard, J.R., *T-Channel Defects in Patients with Childhood Absence Epilepsy*. Epilepsy Curr, 2004. **4**(1): p. 7-8.
62. Vitko, I., et al., *Functional characterization and neuronal modeling of the effects of childhood absence epilepsy variants of CACNA1H, a T-type calcium channel*. J Neurosci, 2005. **25**(19): p. 4844-55.

63. Bagneris, C., et al., *Prokaryotic NavMs channel as a structural and functional model for eukaryotic sodium channel antagonism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(23): p. 8428-33.
64. Walsh, C.P., et al., *Three-dimensional structure of Cav3.1: comparison with the cardiac L-type voltage-gated calcium channel monomer architecture*. J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 22310-21.
65. Payandeh, J., et al., *The crystal structure of a voltage-gated sodium channel*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 353-8.
66. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflugers Arch, 1981. **391**(2): p. 85-100.
67. Talavera, K. and B. Nilius, *Biophysics and structure-function relationship of T-type Ca²⁺ channels*. Cell Calcium, 2006. **40**(2): p. 97-114.
68. Klockner, U., et al., *Comparison of the Ca²⁺ currents induced by expression of three cloned alpha1 subunits, alpha1G, alpha1H and alpha1I, of low-voltage-activated T-type Ca²⁺ channels*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(12): p. 4171-8.
69. Balke, C.W., et al., *Macroscopic and Unitary Properties of Physiological Ion Flux through T-Type Ca²⁺ Channels in Guinea-Pig Heart-Cells*. Journal of Physiology-London, 1992. **456**: p. 247-265.
70. Marksteiner, R., et al., *Inactivation determinants in segment IIIS6 of Ca(v)3.1*. J Physiol, 2001. **537**(Pt 1): p. 27-34.
71. Park, J.Y., et al., *Multiple structural elements contribute to the slow kinetics of the Cav3.3 T-type channel*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(21): p. 21707-21713.
72. Staes, M., et al., *The amino side of the C-terminus determines fast inactivation of the T-type calcium channel alpha1G*. J Physiol, 2001. **530**(Pt 1): p. 35-45.
73. Hirano, Y., H.A. Fozzard, and C.T. January, *Inactivation properties of T-type calcium current in canine cardiac Purkinje cells*. Biophys J, 1989. **56**(5): p. 1007-16.
74. Raman, I.M. and B.P. Bean, *Resurgent sodium current and action potential formation in dissociated cerebellar Purkinje neurons*. J Neurosci, 1997. **17**(12): p. 4517-26.
75. Kuo, C.C. and S. Yang, *Recovery from inactivation of t-type ca²⁺ channels in rat thalamic neurons*. J Neurosci, 2001. **21**(6): p. 1884-92.
76. Burgess, D.E., et al., *Mechanism of inactivation gating of human T-type (low-voltage activated) calcium channels*. Biophys J, 2002. **82**(4): p. 1894-906.
77. Li, J., et al., *Roles of molecular regions in determining differences between voltage dependence of activation of CaV3.1 and CaV1.2 calcium channels*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 26858-67.
78. Demers-Giroux, P.O., et al., *Cooperative activation of the T-type CaV3.2 channel: interaction between Domains II and III*. J Biol Chem, 2013. **288**(41): p. 29281-93.
79. Heady, T.N., et al., *Molecular pharmacology of T-type Ca²⁺ channels*. Jpn J Pharmacol, 2001. **85**(4): p. 339-50.
80. Lacinova, L., *T-type calcium channel blockers - new and notable*. Gen Physiol Biophys, 2011. **30**(4): p. 403-9.
81. Cazade, M., et al., *Cross-modulation and molecular interaction at the Cav3.3 protein between the endogenous lipids and the T-type calcium channel antagonist TTA-A2*. Mol Pharmacol, 2014. **85**(2): p. 218-25.
82. Ertel, S.I. and J.P. Clozel, *Mibefradil (Ro 40-5967): the first selective T-type Ca²⁺ channel blocker*. Expert Opin Investig Drugs, 1997. **6**(5): p. 569-82.
83. Lee, J.H., et al., *Synthesis and biological evaluation of 1-(isoxazol-5-ylmethylaminoethyl)-4-phenyl tetrahydropyridine and piperidine derivatives as potent T-type calcium channel blockers with antinociceptive effect in a neuropathic pain model*. Eur J Med Chem, 2014. **74**: p. 246-57.
84. Belardetti, F., et al., *A fluorescence-based high-throughput screening assay for the identification of T-type calcium channel blockers*. Assay Drug Dev Technol, 2009. **7**(3): p. 266-80.
85. Chevalier, M., et al., *T-type calcium channels are involved in hypoxic pulmonary hypertension*. Cardiovascular Research, 2014. **103**(4): p. 597-606.
86. Francois, A., et al., *State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca(V)3.2 selectivity and support analgesic effects*. Pain, 2013. **154**(2): p. 283-293.
87. Gangarossa, G., et al., *T-type calcium channel Ca(v)3.2 deficient mice show elevated anxiety, impaired memory and reduced sensitivity to psychostimulants*. Frontiers in Behavioral Neuroscience, 2014. **8**.
88. Kerckhove, N., et al., *Cav3.2 T-type calcium channels and inflammatory pain*. Fundamental & Clinical Pharmacology, 2013. **27**: p. 117-117.
89. Kraus, R.L., et al., *In vitro characterization of T-type calcium channel antagonist TTA-A2 and in vivo effects on arousal in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **335**(2): p. 409-17.
90. Yang, Z.Q., et al., *Discovery of 1,4-substituted piperidines as potent and selective inhibitors of T-type calcium channels*. J Med Chem, 2008. **51**(20): p. 6471-7.
91. Shipe, W.D., et al., *Design, synthesis, and evaluation of a novel 4-aminomethyl-4-fluoropiperidine as a T-type Ca²⁺ channel antagonist*. J Med Chem, 2008. **51**(13): p. 3692-5.
92. Choe, W., et al., *TTA-P2 Is a Potent and Selective Blocker of T-Type Calcium Channels in Rat Sensory Neurons and a Novel Antinociceptive Agent*. Molecular Pharmacology, 2011. **80**(5): p. 900-910.

93. Uebele, V.N., et al., *Positive allosteric interaction of structurally diverse T-type calcium channel antagonists*. Cell Biochem Biophys, 2009. **55**(2): p. 81-93.
94. Uslaner, J.M., et al., *T-Type Calcium Channel Antagonism Decreases Motivation for Nicotine and Blocks Nicotine- and Cue-Induced Reinstatement for a Response Previously Reinforced with Nicotine*. Biological Psychiatry, 2010. **68**(8): p. 712-718.
95. Uebele, V.N., et al., *Antagonism of T-type calcium channels inhibits high-fat diet-induced weight gain in mice*. Journal of Clinical Investigation, 2009. **119**(6): p. 1659-1667.
96. Trott, O. and A.J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. J Comput Chem, 2010. **31**(2): p. 455-61.
97. Cribbs, L.L., et al., *Molecular cloning and functional expression of Ca(v)3.1c, a T-type calcium channel from human brain*. FEBS Lett, 2000. **466**(1): p. 54-8.
98. Sambrook, J., Russell, D., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
99. Horton, R.M., *PCR-mediated recombination and mutagenesis. SOEing together tailor-made genes*. Mol Biotechnol, 1995. **3**(2): p. 93-9.
100. Pedretti, A., L. Villa, and G. Vistoli, *VEGA--an open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming*. J Comput Aided Mol Des, 2004. **18**(3): p. 167-73.
101. Irwin, J.J., et al., *ZINC: a free tool to discover chemistry for biology*. J Chem Inf Model, 2012. **52**(7): p. 1757-68.
102. Morris, G.M., et al., *AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility*. J Comput Chem, 2009. **30**(16): p. 2785-91.
103. Seeliger, D. and B.L. de Groot, *Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina*. J Comput Aided Mol Des, 2010. **24**(5): p. 417-22.
104. Lopez-Charcas, O., M. Rivera, and J.C. Gomora, *Block of human CaV3 channels by the diuretic amiloride*. Mol Pharmacol, 2012. **82**(4): p. 658-67.
105. Zhou, Y., et al., *Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 43-8.
106. Voet, D. and J.G. Voet, *Biochemistry*. 4th ed. 2011, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. xxv, 1428, 53 p.
107. Beiser, A., *Concepts of modern physics*. 6th ed. 2003, Boston: McGraw-Hill. 542 p.
108. Ho, B.K. and R. Brasseur, *The Ramachandran plots of glycine and pre-proline*. BMC Struct Biol, 2005. **5**: p. 14.
109. Serrano, J.R., et al., *Mg²⁺ block unmasks Ca²⁺/Ba²⁺ selectivity of alpha 1G T-type calcium channels*. Biophysical Journal, 2000. **79**(6): p. 3052-3062.
110. Fukushima, Y. and S. Hagiwara, *Currents carried by monovalent cations through calcium channels in mouse neoplastic B lymphocytes*. J Physiol, 1985. **358**: p. 255-84.
111. Serrano, J.R., E. Perez-Reyes, and S.W. Jones, *State-dependent inactivation of the alpha 1G T-type calcium channel*. Journal of General Physiology, 1999. **114**(2): p. 185-201.
112. Cordes, F.S., J.N. Bright, and M.S. Sansom, *Proline-induced distortions of transmembrane helices*. J Mol Biol, 2002. **323**(5): p. 951-60.
113. Yohannan, S., et al., *Proline substitutions are not easily accommodated in a membrane protein*. J Mol Biol, 2004. **341**(1): p. 1-6.
114. Simons, K.T., et al., *Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and Bayesian scoring functions*. J Mol Biol, 1997. **268**(1): p. 209-25.
115. Yuji Sugita, Y.O., *Replica-exchange molecular dynamics method for protein folding*. Chemical Physics Letters, 1999. **314**(1-2): p. 141-151.
116. Olivella, M., et al., *Relation between sequence and structure in membrane proteins*. Bioinformatics, 2013. **29**(13): p. 1589-92.
117. Tang, L., et al., *Structural basis for Ca²⁺ selectivity of a voltage-gated calcium channel*. Nature, 2014. **505**(7481): p. 56-61.
118. Kryshchuk, A., K. Fidelis, and J. Moulton, *CASP10 results compared to those of previous CASP experiments*. Proteins, 2014. **82** Suppl 2: p. 164-74.
119. Chen, K.Y., et al., *High-resolution modeling of transmembrane helical protein structures from distant homologues*. PLoS Comput Biol, 2014. **10**(5): p. e1003636.
120. Altschul, S.F., et al., *Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(17): p. 3389-402.
121. *Activities at the Universal Protein Resource (UniProt)*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Database issue): p. D191-8.
122. Soding, J., A. Biegert, and A.N. Lupas, *The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(Web Server issue): p. W244-8.
123. Sievers, F., et al., *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. Mol Syst Biol, 2011. **7**: p. 539.
124. Liu, Y., B. Schmidt, and D.L. Maskell, *MSAProbs: multiple sequence alignment based on pair hidden Markov models and partition function posterior probabilities*. Bioinformatics, 2010. **26**(16): p. 1958-64.

125. Do, C.B., et al., *ProbCons: Probabilistic consistency-based multiple sequence alignment*. Genome Res, 2005. **15**(2): p. 330-40.
126. Chang, J.M., et al., *Accurate multiple sequence alignment of transmembrane proteins with PSI-Coffee*. BMC Bioinformatics, 2012. **13 Suppl 4**: p. S1.
127. Katoh, K. and D.M. Standley, *MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability*. Mol Biol Evol, 2013. **30**(4): p. 772-80.
128. Buchan, D.W., et al., *Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Web Server issue): p. W349-57.
129. Viklund, H. and A. Elofsson, *OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar*. Bioinformatics, 2008. **24**(15): p. 1662-8.
130. Roy, A., A. Kucukural, and Y. Zhang, *I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction*. Nat Protoc, 2010. **5**(4): p. 725-38.
131. Xu, D. and Y. Zhang, *Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field*. Proteins, 2012. **80**(7): p. 1715-35.
132. Kelley, L.A. and M.J. Sternberg, *Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server*. Nat Protoc, 2009. **4**(3): p. 363-71.
133. Canutescu, A.A. and R.L. Dunbrack, Jr., *Cyclic coordinate descent: A robotics algorithm for protein loop closure*. Protein Sci, 2003. **12**(5): p. 963-72.
134. Stein, A. and T. Kortemme, *Improvements to robotics-inspired conformational sampling in rosetta*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63090.
135. Barth, P., J. Schonbrun, and D. Baker, *Toward high-resolution prediction and design of transmembrane helical protein structures*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(40): p. 15682-7.
136. O'Boyle, N.M., et al., *Confab - Systematic generation of diverse low-energy conformers*. J Cheminform, 2011. **3**: p. 8.
137. Cooper, S., et al., *Predicting protein structures with a multiplayer online game*. Nature, 2010. **466**(7307): p. 756-60.
138. Guex, N. and M.C. Peitsch, *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*. Electrophoresis, 1997. **18**(15): p. 2714-23.
139. Laskowski, R.A., et al., *PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures*. Journal of Applied Crystallography, 1993. **26**(2): p. 283-291.
140. Jiang, Y., et al., *The open pore conformation of potassium channels*. Nature, 2002. **417**(6888): p. 523-6.
141. Sehnal, D., et al., *MOLE 2.0: advanced approach for analysis of biomacromolecular channels*. J Cheminform, 2013. **5**(1): p. 39.
142. Ho, B.K. and F. Gruswitz, *HOLLOW: generating accurate representations of channel and interior surfaces in molecular structures*. BMC Struct Biol, 2008. **8**: p. 49.
143. Bichet, D., et al., *Electrostatic interactions in the channel cavity as an important determinant of potassium channel selectivity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(39): p. 14355-14360.
144. Grabe, M., et al., *K⁺ channel selectivity depends on kinetic as well as thermodynamic factors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(39): p. 14361-14366.
145. Hinsen, K., *The Molecular Modeling Toolkit: A New Approach to Molecular Simulations*. Journal of Computational Chemistry, 2000. **Vol. 21**(No. 2): p. 79-85.
146. Yang, L., et al., *New-generation amber united-atom force field*. J Phys Chem B, 2006. **110**(26): p. 13166-76.
147. Goddard, T.D., C.C. Huang, and T.E. Ferrin, *Software extensions to UCSF chimera for interactive visualization of large molecular assemblies*. Structure, 2005. **13**(3): p. 473-82.
148. Reger, T.S., et al., *Pyridyl amides as potent inhibitors of T-type calcium channels*. Bioorg Med Chem Lett, 2011. **21**(6): p. 1692-6.
149. Yang, Z.Q., et al., *Short-acting T-type calcium channel antagonists significantly modify sleep architecture in rodents*. ACS Med Chem Lett, 2010. **1**(9): p. 504-9.
150. McGaughey, G.B., M. Gagne, and A.K. Rappe, *π -Stacking interactions. Alive and well in proteins*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15458-63.
151. Xiu, X., et al., *Nicotine binding to brain receptors requires a strong cation- π interaction*. Nature, 2009. **458**(7237): p. 534-7.
152. Dougherty, D.A., *Cation- π interactions involving aromatic amino acids*. J Nutr, 2007. **137**(6 Suppl 1): p. 1504S-1508S; discussion 1516S-1517S.
153. Dalvit, C., S.Y. Ko, and A. Vulpetti, *Application of the rule of shielding in the design of novel fluorinated structural motifs and peptidomimetics*. Journal of Fluorine Chemistry, 2013. **152**(0): p. 129-135.
154. Martin, R.L., et al., *Mibefradil block of cloned T-type calcium channels*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000. **295**(1): p. 302-308.
155. Gomora, J.C., et al., *Effect of mibefradil on voltage-dependent gating and kinetics of T-type Ca²⁺ channels in cortisol-secreting cells*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2000. **292**(1): p. 96-103.

156. Matar, N., et al., *Zonisamide block of cloned human T-type voltage-gated calcium channels*. *Epilepsy Res*, 2009. **83**(2-3): p. 224-34.