



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

**CONTRIBUCIÓN DEL CARBOXILO
TERMINAL DE LA SUBUNIDAD α_1 DEL
CANAL $Ca_v2.2$ EN LA REGULACIÓN
POR LAS SUBUNIDADES β DE
CANALES DE CALCIO DE ALTO
UMBRALE.**

Tesis

Que para obtener el Título de

BIÓLOGO

Presenta:

Raul Aguilar Vazquez.



Director: Dr. Juan Manuel Arias Montaño.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México. 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.

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, CB-2009-01-131778), al Dr. Juan Manuel Arias Montaña. Además, se contó con una beca del mismo proyecto durante el periodo de Julio de 2012 a Junio de 2013.

El trabajo experimental se realizó en los Laboratorios de Electrofisiología del Proyecto de Neurociencias, en la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y en el laboratorio 15 del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Avances de este proyecto fueron expuestos en el XL Coloquio Estudiantil de Tercera Etapa en la FESI en 2012, el Congreso organizado en conjunto por la Federación de Asociaciones Latinoamericanas y del Caribe de Neurociencias (FALAN) y la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas (SMCF) en Cancún, Quintana Roo en el año de 2012, además del LVII Congreso Nacional de la SMCF en Oaxaca, Oaxaca en 2014.

Este trabajo se llevó a cabo bajo la asesoría y dirección del

Dr. Juan Manuel Arias Montaña

Proyecto de Neurociencias, UIICSE, FES Iztacala-UNAM.



AGRADECIMIENTOS

A mis sinodales de tesis: la Dra. María Rosa Ávila Costa, el Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero, la Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray y el Dr. Alejandro Sandoval Romero, por la revisión y/o asesoramiento durante la realización del presente trabajo permitiendo lograr su culminación.

Al Dr. Juan Manuel Arias Montaña, por haberme enseñado lo necesario para la realización de este trabajo, pero sobre todo quiero agradecerle por el apoyo personal cuando lo he necesitado y por la oportunidad de trabajar junto a usted y el Dr Jaime, muchas gracias a ambos.

Al Dr. Ubaldo García por permitir realizar los experimentos de electrofisiología en su laboratorio en las instalaciones del CINVESTAV-IPN.

Al Dr. Edward Perez-Reyes del Departamento de Farmacología de la Universidad de Virginia, USA, por la donación de los ADNc de las diversas subunidades utilizadas en el proyecto.

A la Dra. Clara Díaz, a Eric Nahum e Ivan Uriel, por el apoyo durante la culminación de los experimentos de este trabajo

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. 2015.





DEDICATORIAS

Desde antes de llegar a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala conocí a grandes personas a quienes les dedico este trabajo, y si no plasmo sus nombres o no los mencionó, están conmigo moralmente.

A mi madre Guadalupe:

Por tu apoyo incondicional a través de estos años, quien ha sido para mí una persona maravillosa a la cual siempre querré y sobre todo admiraré, por haber hecho de mí un profesionista de la Biología. Te quiero.

A mi abuela Adelina:

Pieza fundamental de mi vida y que a pesar de todo está conmigo. La quiero.

A mis hermanos Daniel y Dante:

Por todo su apoyo en cada etapa difícil y alegre de mi vida ya que cada día me alientan a seguir, para lograr todo lo que quiero. Los quiero

A mis Tías:

Cristina e Irene, que más que tías son mis hermanas, gracias por darme esos lindos y traviosos sobrinos que tengo Mireyita, Marquitos, Fernandita, Yuli y Evelyn. Además de la tía Vicky (q.e.p.d), por su apoyo y cariño muchas gracias. Las quiero.



A la Bióloga Lucila Caballero Salas:

Profesora del Colegio de Estudios Científicos y Tecnológicos (CECyTEM) plantel Cuautitlan Izcalli y primer colega que conozco en mi vida, que me enseñó y encaminó en su momento a querer descubrir las maravillas que esconde la Biología.

A mis amigos y compañeros:

De la FESI, del CECyTEM Izcalli, de los lugares donde trabajé, en general a todos mis compañeros y amigos que he conocido, gracias por todas las charlas y experiencias que vivimos juntos a lo largo de la carrera y en mi vida, por formar parte de ella en esta etapa fundamental.

A mis compañeros en los laboratorios donde se llevó a cabo la experimentación de esta tesis:

Por su ayuda para la elaboración de este trabajo y la tan grata estancia en ellos.

A ti Hilde Allende.

Porque con tu confianza y compañía me diste la fortaleza para culminar este objetivo, además me diste la oportunidad y la felicidad de ser padre de un niño hermoso. Te amo.

Pero en especial quiero dedicarle este trabajo a mi hijo Santiago, que desde que naciste me cambiaste la vida, gracias por luchar por estar con nosotros. TE AMO.



INDICE.

RESUMEN..... 1

INTRODUCCIÓN..... 1

A. Transporte de membrana y canales iónicos. 1

B. El ión Ca^{2+} y los canales de calcio operados por voltaje (Canales Ca_v)..... 3

C. Clasificación de los Canales Ca_v 5

D. Estructura de los canales Ca_v 9

I. Subunidad α_1 10

II. Subunidad β 11

III. Subunidad $\alpha_2\delta$ 14

IV. Subunidad γ 15

E. Interacción entre la subunidad α_1 y la subunidad β 15

F. Justificación..... 22

G. Hipótesis..... 23

OBJETIVOS. 24

Objetivo general. 24

Objetivos particulares..... 24



MATERIALES Y MÉTODOS.	25
A. Construcción del ADNc de los canales CRG12Ba y CRG12Bb.....	25
B. Cotransfección de cultivo de células HEK-293T.	31
C. Registro electrofisiológico de los canales quiméricos.....	32
D. Análisis de Datos.	34
RESULTADOS	37
A. Construcción del ADNc de los canales CRG12Ba y CRG12Bb.....	37
B. Caracterización de las corrientes de Ca ²⁺	43
DISCUSIÓN	51
Expresión de los canales CRG12Ba y CRG12Bb.	52
Activación en los canales Cav	56
Inactivación en los canales Cav.....	59
CONCLUSIONES.	62
PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.	63
LITERATURA CITADA	64
ANEXOS	72

RESUMEN.

Las subunidades β de los canales de calcio operados por voltaje de alto umbral (HVA) son esenciales para que la subunidad α_1 , formadora del poro, sea expresada en la membrana plasmática, además de regular la dependencia al voltaje, la cinética y la probabilidad de apertura de los canales. Aunque actualmente se sabe con detalle cómo interactúan esas subunidades, no se comprende cabalmente en qué forma esa interacción contribuye a la modulación de las propiedades del canal.

En trabajos anteriores se ha mostrado que la sustitución del asa intracelular I-II, sitio de interacción con la subunidad β , del canal $Ca_v3.1$ por la contraparte del canal $Ca_v2.2$, le confiere a esta quimera una regulación parcial por las subunidades β .

En este trabajo aprovechando que las subunidades auxiliares no modifican las características de los canales de bajo umbral (LVA), hemos desarrollado una estrategia quimérica en la cual el asa I-II y el extremo carboxilo (COOH) de un canal LVA ($Ca_v3.1$) han sido reemplazados por las regiones homólogas de un canal HVA ($Ca_v2.2$), esto mediante el uso de técnicas de biología molecular, para evaluar si bajo estas condiciones se transfiere la modulación completa de las subunidades β de un canal HVA a uno LVA, midiendo la expresión de las proteínas quiméricas en las células HEK-293 a través del registro electrofisiológico de las corrientes generadas por su activación.

Esta sustitución del extremo COOH genera corrientes sólo cuando la subunidad β está presente, modificando las propiedades biofísicas del canal cuando se le comparan con la quimera original. Este modelo de estudio de los canales de calcio puede conducir al hallazgo de datos relevantes sobre los mecanismos de su regulación por las subunidades β .




INTRODUCCIÓN.

A. Transporte de membrana y canales iónicos.

Todas las células en los seres vivos se encuentran delimitadas por membranas biológicas que separan su interior del exterior; dichas membranas son estructuras muy fluidas y dinámicas, cuya estructura se conoce como “modelo del mosaico fluido”, término acuñado por S.J. Singer y G.L. Nicholson en 1972 (Murray *et al.* 2010). Además de delimitar a la célula, dichas membranas le dan forma y contribuyen a mantener el equilibrio entre el interior (medio intracelular) y el exterior (medio extracelular) de las células, esto lo hacen al regular la entrada y salida de diversas sustancias, por lo que se dice que la membrana es semipermeable (Kandel *et al.* 2000).

Diversos organelos en el medio intracelular como las mitocondrias, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi también están formados por membranas, la composición química de todas las membranas plasmáticas varía entre las células, dependiendo de la función o de su ubicación. En general, las membranas plasmáticas están formadas por una doble capa de fosfolípidos, en la que se incrustan mediante uniones no covalentes otras moléculas, entre las que se encuentran diversas proteínas, ciertos carbohidratos u otros lípidos como el colesterol o los esfingolípidos (Murray *et al.* 2010).


Los fosfolípidos presentes en las membranas son anfipáticos, es decir presentan en su estructura un extremo hidrofílico (con afinidad al agua) y una región hidrofóbica (que no es afín al agua); debido a esto y al estar dispuestos en una bicapa, las membranas tienen la característica de ser impermeables a moléculas polares como los azúcares y algunos aminoácidos, además que son impermeables a partículas con carga eléctrica como los iones. Por tanto, el transporte de estas sustancias hacia el interior o exterior de las células, e incluso entre diferentes organelos celulares, se lleva a cabo a través de diferentes proteínas que se incrustan en la membrana (Murray *et al.* 2010).



Tradicionalmente se han descrito dos mecanismos de transporte iónico a través de la membrana, por un lado las proteínas con función de acarreadores iónicos, y por otro lado los llamados canales iónicos. Los acarreadores como las bombas de Ca^{2+} , los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o las bombas Na^+/K^+ se caracterizan por transportar iones en contra de gradientes químicos y/o eléctricos (gastando energía), mientras que los canales iónicos se comportan como poros en la membrana, que al ser abiertos permiten un transporte pasivo, lo cual significa que el flujo no implica un gasto de energía, disminuyendo el gradiente químico y/o eléctrico en la célula (Lacinova, 2005).

Los primeros trabajos sobre canales iónicos, fueron llevados a cabo por Alan Hodgkin y Andrew Huxley en sus estudios durante los años 30's sobre la naturaleza del impulso nervioso en el axón gigante del calamar, y culminados en los 1950's mediante la formación del modelo de potencial de acción de Hodgkin-Huxley (Hille, 2001). A partir de entonces y en los últimos años se ha incrementado el conocimiento acerca de los canales iónicos a nivel molecular, lográndose gracias a la invención y/o desarrollo de métodos como el registro de corrientes iónicas mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana o *patch-clamp*, así como el uso de neurotoxinas selectivas; la clonación y secuenciación de los genes que codifican a los canales y la obtención de estructuras cristalinas para su análisis mediante difracción de rayos X, técnicas que permiten obtener información detallada de las propiedades intrínsecas, de la función en las células y de los componentes estructurales de los canales iónicos (Hille 2001; Hille y Catterall 1999; Neher *et al.* 1976).

En la actualidad se sabe que los canales iónicos son proteínas que se encuentran en las membranas plasmáticas de todos los seres vivos, ya sean animales, plantas, hongos, protistas y/o bacterias. Su función principal es la de permitir el flujo de iones a través de la membrana a una velocidad superior a la de cualquier sistema biológico (10^8 iones/s contra 10^3 iones/s de una bomba iónica).




Además, pueden ser selectivos al paso de los iones, y por último las proteínas que los conforman, en respuesta a un estímulo, adoptan diversos estados, como el estado abierto que se caracteriza por tener flujo de iones, además de los estados cerrado e inactivado en los cuales no se presenta flujo de iones (Hille, 2001). Debido a que los canales iónicos llevan a cabo el flujo a favor de un gradiente químico y/o eléctrico, apoyan en el mantenimiento de la concentración iónica entre el interior y el exterior de las células. Sin embargo, estos cambios ocasionados en el gradiente de concentración y específicamente el ocasionado por el movimiento de iones a través de la membrana, crean una diferencia de voltaje o “potencial eléctrico” en la células, que es llamado potencial de membrana (V_m) (Kandel *et al.* 2000; Hille, 2001).

Los cambios en el V_m pueden iniciar o detener diversos procesos fisiológicos en las células. Por ejemplo, la excitación neuronal y muscular, la secreción de hormonas, el aprendizaje y la memoria, la proliferación celular, la transducción sensorial, el control de las sales y el balance hídrico, estos últimos se relacionan con el control de la presión sanguínea (Kandel *et al.* 2000). Los canales iónicos se clasifican de acuerdo a la respuesta específica ante los estímulos externos que definen sus mecanismos de activación. Sabiendo esto se han identificado a los canales operados por ligando que son aquellos canales que para su apertura es necesaria la interacción de una molécula o “ligando” específico, que se une directamente al canal o a una proteína que se asocia al canal; existen a su vez los canales operados por voltaje que son aquellos en los que su apertura se observa en respuesta a cambios en el V_m ; y existen los canales operados por deformación mecánica del citoesqueleto, o por estímulos sensoriales (Hille, 2001).

B. El ión Ca^{2+} y los canales de calcio operados por voltaje (Canales Ca_v).

Cada uno de los tipos de canales mencionados cumple funciones específicas en las células en donde se expresan, desde la generación y propagación de señales eléctricas, hasta el intercambio de metabolitos entre células adyacentes.



Sin embargo, el tema central de esta tesis se enfoca en el conocimiento de los canales iónicos operados por voltaje, estos canales son a su vez nombrados por el ión al que son selectivos, de ahí que existan los canales operados por voltaje para el Na^+ , K^+ y Ca^{2+} (Hille, 2001). Específicamente me enfoqué en el estudio de los canales que permiten el paso de iones de Ca^{2+} , nombrados como canales de calcio operados por voltaje (canales Ca_v).

Antes de hablar de estos canales, es importante mencionar que el Ca^{2+} es de los principales reguladores del funcionamiento en las células, su entrada al citoplasma es considerada como una señal intracelular o de segundo mensajero que inicia funciones vitales como la secreción de hormonas y neurotransmisores, la contracción muscular, el metabolismo, la expresión de genes, la proliferación, la fertilización e incluso se relaciona con la apoptosis, esto dependiendo de la concentración presente (Randall y Tsien, 1997).

Una de las principales formas en que se regula la entrada de Ca^{2+} a las células excitables es mediante la modulación de los canales Ca_v . De acuerdo a su ubicación y al subtipo de canal Ca_v (ver más adelante la clasificación de los canales Ca_v) desempeña diversas funciones, por ejemplo, en las membranas de células de túbulos transversos los canales $\text{Ca}_v1.1$ interactúan con los receptores a rianodina 1 (RyR1) sensibles a calcio del retículo endoplásmico iniciando contracciones rápidas de los músculos (Tanabe *et al.* 1987; Catterall 1991). Sin embargo, el mismo canal $\text{Ca}_v1.1$ provoca una pequeña conductancia de Ca^{2+} que incrementa su concentración en el citoplasma de células del músculo esquelético, regulando la fuerza de la contracción en respuesta a la alta frecuencia de impulsos nerviosos (Catterall 1991). Otro ejemplo se presenta en las células endocrinas, donde los canales $\text{Ca}_v1.3$ regulan la entrada de Ca^{2+} que inicia la secreción de hormonas (Yang y Berggren 2006), mientras que en células nerviosas los canales Ca_v2 inician la transmisión sináptica (Tsien *et al.* 1988; Dunlap *et al.* 1995; Catterall y Few 2008).

Además en diversos tipos celulares, la entrada de Ca^{2+} al citosol vía canales Ca_v regula la actividad enzimática, la expresión genética y otros procesos bioquímicos (Flavell y Greenberg 2008), siendo evidente que la entrada de Ca^{2+} a la célula a través de estos canales funciona tanto como un proceso de señalización eléctrica, así como un segundo mensajero (Tabla 1).

C. Clasificación de los Canales Ca_v .

Los canales Ca_v fueron identificados por primera vez en 1953 (Fatt y Katz 1953), tiempo después se descubrió que hay diferentes subtipos de canales en las células excitables, y por consiguiente los canales Ca_v han sido clasificados y nombrados de acuerdo a varios criterios (Tabla 1). La primera clasificación se basó sobre propiedades farmacológicas y electrofisiológicas básicas de los canales, bajo la observación hecha de que algunos canales Ca_v necesitan una pequeña despolarización para ser activados, mientras que otros requieren una despolarización relativamente mayor para activarse (Hagiwara *et al.* 1975; Llinás y Yarom 1981), dividiéndose en canales de bajo umbral (LVA del inglés Low Voltage Activated) y de alto umbral (HVA del inglés High Voltage Activated).

Los canales LVA se activan a un voltaje de membrana cercano a -70 mV. Sin embargo, debido a su valor relativamente menor de conductancia unitaria y a su rápida inactivación, fueron llamados canales de Ca^{2+} tipo T (del inglés “tiny” o minúsculo, y “transient” o transitorio). Por su parte, los canales HVA tienen un valor mayor en la conductancia unitaria y una cinética más lenta en su inactivación, por lo que se denominan canales de Ca^{2+} tipo L (del inglés “large” o grande, y “long lasting” o duradero). Además, los canales Ca_v tipo L poseen un sello farmacológico al ser sensibles a las 1,4-Dihidropiridinas,(1,4-DHPs), una clase de drogas que los inhiben como la nifedipina y el nisoldipina o los activan como el Bay K 8644 (Hagiwara *et al.* 1975; Llinás y Yarom 1981).

Posteriormente en los 80's experimentos en células neuronales revelaron canales insensibles a las 1,4-DHPs con conductancias de canal unitario ubicadas entre el correspondiente al de los canales tipo L y los del tipo T, siendo llamados canales de Ca_v tipo N (neuronal y/o neither que significa ninguno); subsecuentemente se clasificaron en dos subtipos según la sensibilidad a toxinas peptídicas aisladas de caracoles marinos del género *Conus* (ω -Conotoxina GVIA), adquiriendo el nombre de canales de Ca^{2+} tipo N, y del veneno de algunas arañas (ω -Agatoxina IVA), denominándose canales de Ca^{2+} tipo P/Q (La P por ser descritas en células de Purkinje, y la Q porque es la letra que continua en el abecedario; Llinás 1989).

Tabla 1. Nomenclatura y función principal de los canales Ca_v (modificado de Catterall, 2011).

Corriente	Nombre inicial	Nombre actual	Sensibilidad farmacológica	Principal función biológica
L	α_1S	$Ca_v1.1$	DHPs	Acople excitación-contracción en músculo esquelético, regulación de la transcripción
	α_1C	$Ca_v1.2$	DHPs	Acople excitación-contracción en músculo cardíaco, secreción endocrina, tránsito de calcio neuronal en los cuerpos celulares y dendritas, regulación de la actividad enzimática, regulación de la transcripción
	α_1D	$Ca_v1.3$	DHPs	Secreción endocrina, marcapasos cardíaco, tránsito de calcio neuronal en cuerpos celulares y dendritas.
	α_1F	$Ca_v1.4$	DHPs	Transducción visual
P/Q	α_1A	$Ca_v2.1$	ω -Agatoxina IVA	Liberación de neurotransmisores, tránsito de Calcio dendrítico.
N	α_1B	$Ca_v2.2$	ω -CTx-GVIA	Liberación de neurotransmisores, tránsito de Calcio dendrítico.
R	α_1E	$Ca_v2.3$	SNX-482	Marcapasos y descargas repetidas
T	α_1G	$Ca_v3.1$	TTA-P2	Marcapasos y descargas repetidas
	α_1H	$Ca_v3.2$		
	α_1I	$Ca_v3.3$		

Por último se caracterizaron canales resistentes a estas toxinas, pero con sensibilidad a la toxina SNX-482, recibiendo el nombre de canales Ca_v tipo R (del inglés "resistant" o "residual"; Nowycky *et al.* 1985, Fox *et al.* 1987).

Otra forma de clasificación de los canales Ca_v se desarrolló basándose en la clonación del ADNc que codifica las proteínas de cada canal, revelando que los canales Ca_v del tipo HVA están formados por múltiples subunidades protéicas descritas posteriormente (Curtis y Catterall 1984), mientras que los canales Ca_v del tipo LVA solo están formados por la subunidad α_1 (Catterall 2011), responsable de las principales propiedades farmacológicas y electrofisiológicas que forman la base de la primer clasificación descrita. Sin embargo, con el apoyo de técnicas de biología molecular se han identificados subtipos entre los canales Ca_v tipo L y tipo T.

La primera subunidad α_1 fue purificada de músculo esquelético y nombrada α_{1S} (Curtis y Catterall, 1984, Tanabe *et al.* 1987), posteriormente se clonaron a partir de músculo cardíaco la subunidad α_{1Ca} , (Mikami *et al.* 1989) y de músculo liso la subunidad α_{1Cb} (Biel *et al.* 1990), además dos subunidades llamadas α_{1D} (Seino *et al.* 1992; Williams *et al.* 1992a) y α_{1F} , (Bech-Hansen *et al.* 1998) que completan a los canales Ca_v con corrientes tipo L. En cambio los canales Ca_v neuronales se identificaron con la subunidad α_{1A} o tipo P/Q (Mori *et al.* 1991; Starr *et al.* 1991), la subunidad α_{1B} correspondiente a los canales tipo N (Williams *et al.* 1992b; Dubel *et al.* 1992) y la subunidad α_{1E} que posee las propiedades de los canales tipo R (Niidome *et al.* 1992; Soong *et al.* 1992). A la fecha se han identificado tres miembros de la subfamilia de canales tipo T, la subunidad α_{1G} (Perez-Reyes *et al.* 1998), la subunidad α_{1H} , (Cribbs *et al.* 1998), y la subunidad α_{1I} (Lee *et al.* 1999).

Una vez obtenido el ADNc que codifica las diversas subunidades α_1 , se analizó la secuencia de aminoácidos en las regiones mayormente conservadas (segmentos transmembranales y el asa del poro), revelando una relación evolutiva entre los diversos canales, hablándonos de eventos evolutivos tempranos que separan a las subunidades α_1 en los canales HVA y los canales LVA al poseer solo 30% de similitud entre ellos. Después, otro evento divide los canales HVA en dos subfamilias (canales tipo L y canales N) con alrededor de 50% de homología entre ellos, mientras que los miembros de ambas subfamilias parten de al menos un 80% de homología entre sus secuencias.

A su vez todas las subunidades α_1 conocidas tienen variantes de *splicing* o empalme alternativo durante su traducción, pero usualmente entre ellos poseen al menos 95% de homología en sus secuencias (Catterall 2011, Figura 1). Como el número de canales Ca_v ha aumentado, se desarrolló un sistema de nomenclatura, bajo el esquema $\text{Ca}_v\text{X.Y}$ (Ertel *et al.* 2000), donde Ca_v se refiere a los canales de Ca^{2+} operados por voltaje, "X" es un número designado a la subfamilia del canal, de los cuales el 1 corresponde a canales tipo L, mientras que el 2 a los tipo Neuronal y el 3 a los tipo T de la clasificación inicial, por su lado la "Y" es un número que designa a los miembros individuales (Figura 1).

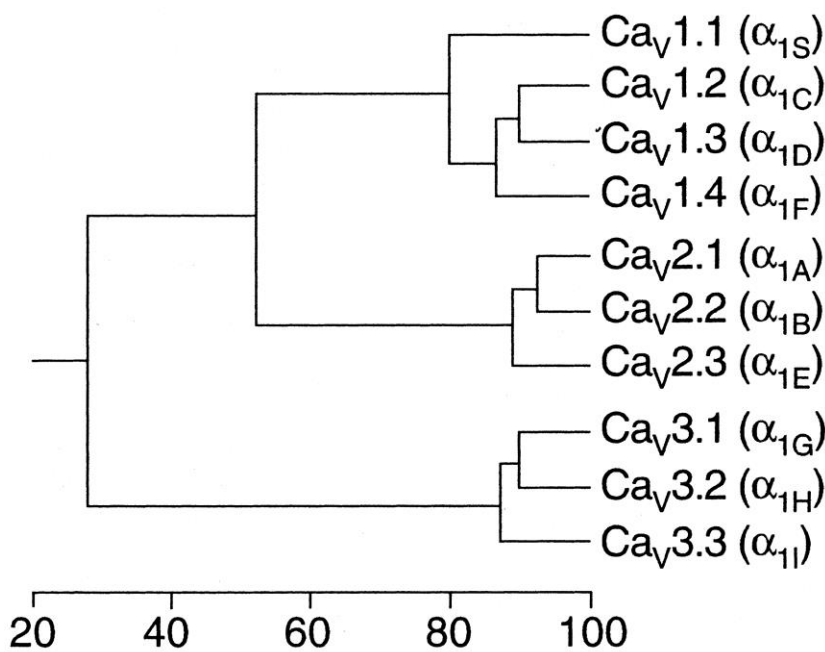


Figura 1. Representación filogenética de las secuencias de aminoácidos de los canales Ca_v . Se compararon los segmentos transmembranales y las asas del poro. Se definen tres familias con identidad en sus secuencias mayores del 80% (Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 ; modificado de Catterall 2011).

D. Estructura de los canales Ca_v .

Los canales HVA son complejos multiproteicos que consisten de un péptido principal llamado subunidad α_1 , y diversas subunidades accesorias (β , $\alpha_2\delta$ y γ , ver Curtis y Catterall, 1984) que tienen funciones reguladoras, existiendo para cada una de ellas diversas isoformas y variantes de empalme alternativo. El análisis de las propiedades bioquímicas como la glicosilación e hidrofobicidad de las diversas subunidades, condujo a desarrollar el siguiente modelo estructural.

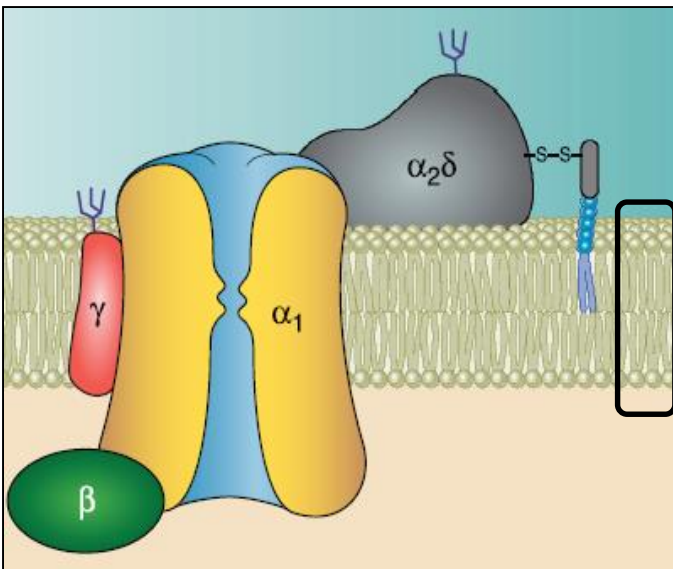


Figura 2. Representación esquemática de la composición de las subunidades que conforman los canales Ca_v de alto umbral (HVA), formado por la subunidad principal α_1 , y las subunidades accesorias β , $\alpha_2\delta$ y γ . Se observa la disposición de los fosfolípidos en la bicapa de la membrana plasmática en el rectángulo, la región hidrofílica con esferas grises y la región hidrófoba con bastones grises (modificado de Buraei *et al.* 2010).

La subunidad α_1 es una proteína transmembranal que se asocia con el dímero de 190 kDa $\alpha_2\delta$, y también se une con la subunidad β , una proteína intracelular fosforilada de cerca de 55 kDa y con una subunidad transmembranal γ de 33 kDa (Figura 2). Es importante aclarar que este modelo usa las subunidades que se han involucrado a todos los canales Ca_v , sin embargo los canales no poseen necesariamente todas las subunidades accesorias para ser funcionales. Estas subunidades β , $\alpha_2\delta$ además de la subunidad γ tienen propiedades auxiliares con funciones de modulación y/o expresión explicando porque no todos los complejos proteínicos de los canales Ca_v las poseen (Catterall 2011; Figura 2).

I. Subunidad α_1

Esta subunidad es una proteína de entre 1870 y 2420 aminoácidos con un peso que va de los 212 a los 273 kDa, con una secuencia de aminoácidos y una estructura membranar predicha como la caracterizada para la subunidad α_1 de los canales de sodio operados por voltaje (Na_v ; Tanabe *et al.* 1987); en los canales Ca_v esta es la subunidad principal. Su importancia radica en que poseen el poro conductor del Ca^{2+} y el filtro de selectividad formado por los segmentos transmembranales S5, S6 y el asa del poro por donde el Ca^{2+} permea a través de la membrana. Los análisis de hidrofobicidad predicen la topología transmembranar, en donde la secuencia de aminoácidos está organizada en 4 dominios homólogos (dominio I a IV); cada dominio presenta una disposición membranar similar a la descrita para las subunidades de los canales Na_v (Choe, 2002 ver Figura 1 y 3), esto es 6 segmentos transmembranales (S1 a S6) y un asa del poro (P).

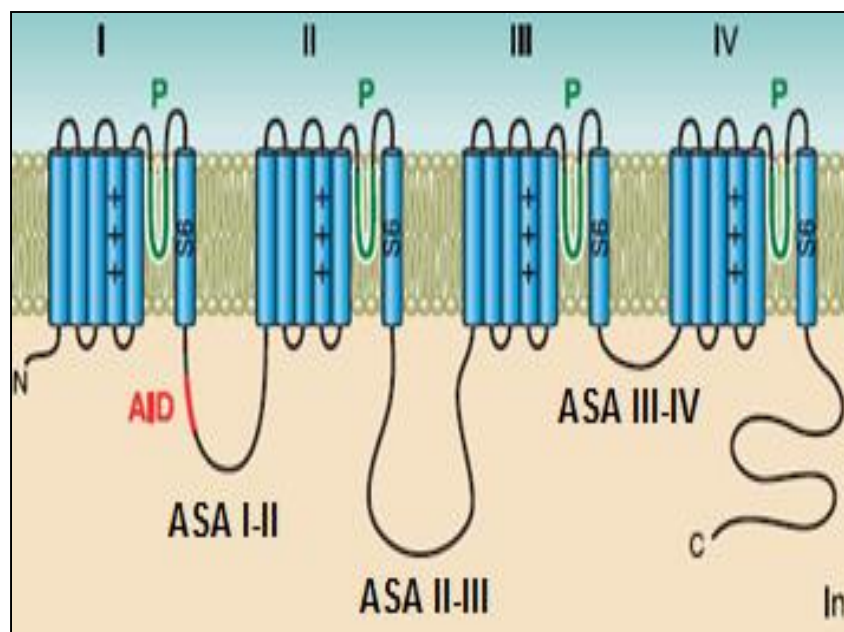


Figura 3. Representación esquemática de la topología de la subunidad α_1 . Consiste de cuatro dominios (I al IV), cada uno de ellos formado por seis α -hélices que atraviesan la membrana (S1 a S6, representado por los cilindros azules). El segmento S4 (cilindro con marcas +++) contiene varios residuos con carga positiva al que se le atribuye la función de un sensor de cambios en el V_m (modificado de Buraei *et al.* 2010).

Cada segmento transmembranal contiene aproximadamente 20 aminoácidos. En el caso de los segmentos S4, éstos contienen de 5 a 6 argininas y/o lisinas (aminoácidos con carga positiva), que se piensa forman la región que percibe los cambios en el V_m iniciando los cambios conformacionales que conducen a la apertura o al cierre del canal (Chanda y Bezanilla 2008; Arikath *et al.* 2003). Además, en la secuencia de la subunidad α_1 se han identificado sitios de interacción con sus subunidades accesorias como el dominio de interacción de la subunidad α_1 (AID, ver figura 3), sitios de unión de diversos activadores o bloqueadores, incluyendo sitios de unión a proteínas G, así como sitios propensos a la fosforilación (Catterall 2011; Lacinova 2005).

A diferencia de los miembros de la familia de Canales HVA, los canales LVA no parecen requerir de subunidades accesorias para definir sus propiedades biofísicas o para regular su transporte hacia la membrana, ya que en experimentos de expresión heteróloga de canales LVA en ovocitos de *Xenopus sp.* o líneas celulares de mamífero (ovario de hamster chino, HEK 293T), concluyen que solo la subunidad α_1 de los canales tipo T es suficiente para crear corrientes similares a las nativas. Sin embargo, hay evidencia de que la interacción entre la subunidad α_1 (LVA) y la subunidad β es posible (Bae *et al.* 2010).

En los canales Ca_v tipo HVA las propiedades biofísicas de cada tipo existente es resultado de la combinación de la subunidad α_1 con las subunidades auxiliares asociadas a ella, en mayor medida por la subunidad β (Catterall 2011; Arias *et al.* 2005; Lacinová 2005).

II. Subunidad β

Esta subunidad es una proteína intracelular, de la cual se han descrito cuatro isoformas (β_1 a β_4), que poseen variantes de empalme alternativo. Sus efectos de regulación han sido establecidos al coexpresarse en sistemas heterólogos, donde se observa que modifican las propiedades de apertura y cierre (o *gating*) de la subunidad α_1 de los canales HVA.

Las propiedades en la modulación dependen de las combinaciones entre las diversas subunidades α_1 y β coexpresadas (Buraei *et al.* 2010; Lacinová 2005). Entre las propiedades de regulación donde las subunidades β tienen efecto están: la aceleración de la cinética de activación, siendo menos evidente en canales neuronales (Ca_v2); afecta además la activación dependiente del voltaje hiperpolarizándola entre -5 y -25 mV. A su vez las subunidades β afectan la cinética de inactivación (acelerándola o enlenteciéndola) y también en la inactivación dependiente del voltaje, en general hiperpolarizándose, pero en el caso de la subunidad β_{2a} es despolarizante (Buraei *et al.* 2010).

Las subunidades β además regulan la expresión en la membrana celular de canales HVA, sirviendo como proteína chaperona, incrementando dramáticamente la expresión en la superficie de la membrana de los canales de las subfamilias Ca_v1 y Ca_v2 . Esto se ha observado en sistemas de expresión heterólogos, coexpresando las cuatro isoformas de las subunidades β en presencia de las subunidades α_1 de canales tipo HVA. Dicho incremento en la expresión fue detectado por marcaje con epitopes, por biotilación de las proteínas en la superficie celular o incrementos en las corrientes de Ca^{2+} (Buraei *et al.* 2010).

Un punto importante a mencionar es que en ovocitos de *Xenopus sp.*, un sistema de expresión extensamente utilizado, se identificó una subunidad β endógena con una homología del 98% con la subunidad β_3 . Esta subunidad es expresada a niveles suficientes para transportar un pequeño número de subunidades α_1 a la membrana plasmática detectadas en pequeñas corrientes de Ca^{2+} , en ausencia de subunidades β exógenas (Tareilus *et al.* 1997). Esto ha sido observado *in vivo*, por ejemplo, en ratones modificados genéticamente que no expresan las subunidades β_1 y β_2 (knockout), tienen corrientes de Ca^{2+} reducidas en músculo y corazón (Buraei *et al.* 2010, Lacinová 2005). Para entender cómo las subunidades β llevan a cabo sus efectos en la regulación, es necesario conocer su estructura. Basado en el análisis de sus secuencias de aminoácidos, estudios funcionales, bioquímicos y de modelaje molecular, se sabe que tienen una estructura proteica modular formada por 5 regiones (Figura 4).

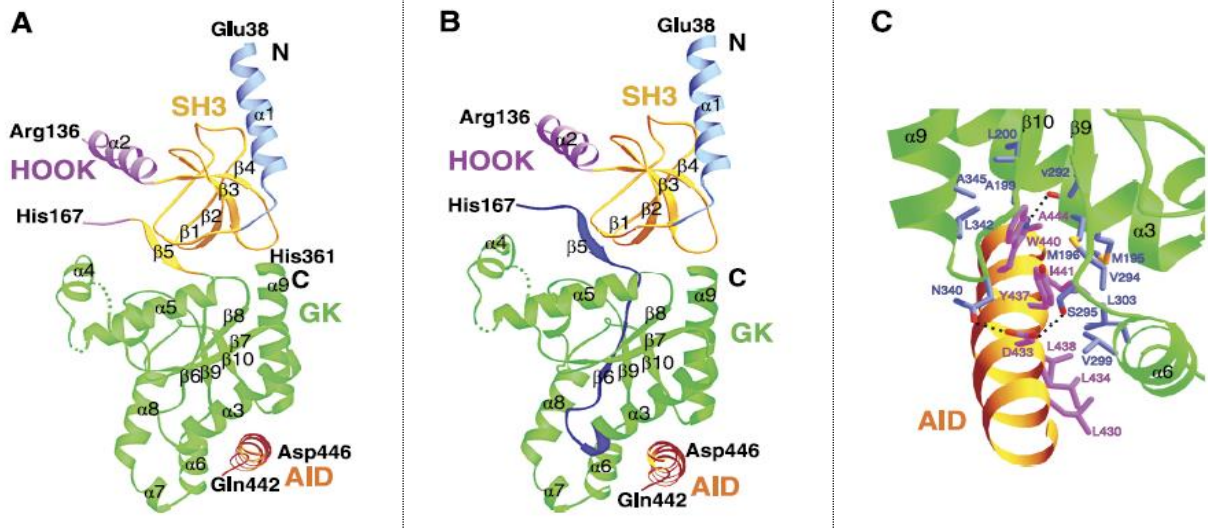


Figura 4. Estructura cristalina de las subunidades β . *A:* estructura cristalina del núcleo de la subunidad β_3 en complejo con el AID, la cual revela las siguientes regiones: el NH₂ terminal (azul claro, residuos 38-59), un dominio SH3 (amarillo, 60-120 y 170-175), una región HOOK (morado, 121-169) y el dominio GK (verde, 176-360), los residuos 137-166 no se resolvieron y no fueron incluidos. Los residuos 226-244 (formando la 4^a hélice α del dominio GK) no se resolvió en esta molécula pero fue resuelta en otra de la misma unidad asimétrica. Los residuos 422-446 del canal Cav1.2 contienen el AID coloreado en naranja. *B:* misma estructura que en *A* pero mostrando el BID (residuos de la subunidad β_3 K163-T193) destacado en azul oscuro. El BID se extiende a través del SH3-HOOK-GK por lo que no se involucra directamente a la unión al AID. *C:* acercamiento de la interfase entre la subunidad β_3 y el AID, se muestran algunos residuos involucrados (modificado de Buraei *et al.*2010).

La primera, tercera y quinta región en la subunidad β son variables, mientras que la segunda y cuarta son secuencias altamente conservadas y en las que se identificaron regiones similares al sitio homólogo Src 3 (SH3) y al dominio de guanilato cinasa (GK), respectivamente. El dominio SH3 es un módulo de interacción de proteínas, mientras que el dominio GK, originalmente descrito en la enzima guanilato cinasa de la levadura de pan, está de igual forma involucrado en interacciones proteína-proteína. Las regiones intermedias (2^{da}, 3^{era} y 4^{ta}) constituyen el llamado núcleo de la subunidades β , con el que se reconstituyen algunas de las funciones principales de la subunidad β , incluso la estructura cristalina muestra que el núcleo de las subunidades β contiene el dominio SH3 y el dominio GK conectados por la llamada región HOOK característico de un grupo de proteínas guanilato cinasas asociadas a la membrana (proteínas MAGUK; Buraei *et al.*2010).

Las proteínas MAGUK además de poseer el las regiones unidas SH3-HOOK-GK, también contienen uno o más dominios PDZ en el extremo amino terminal, los cuales sirven como sitios de interacción proteína-proteína y se asocian con propiedades de oligomerización. No es sorprendente que las funciones de las subunidades β son marcadamente diferentes al de las proteínas MAGUK (Buraei *et al.* 2010). Se observa que esta subunidad se une a la subunidad α_1 , con alta afinidad, al asa que conecta los primeros dos dominios de la subunidad α_1 (asa I-II), discutiéndose esto más adelante.

Debido al interés de esta tesis por entender la interacción que inicia procesos de regulación en la subunidad α_1 por sus subunidades accesorias, y específicamente aquella dada entre la subunidad α_1 y la subunidad β , a continuación menciono solo una breve descripción de la subunidades $\alpha_2\delta$ y γ .

III. Subunidad $\alpha_2\delta$

Se han descrito 4 isoformas de las subunidades $\alpha_2\delta$ ($\alpha_2\delta_1$ - $\alpha_2\delta_4$) codificadas cada una por genes independientes que poseen variantes de empalme alternativo. Cada proteína es codificada por un solo ARNm que por procesos postraduccionales son cortadas en los péptidos α_2 y δ , que son anclados a la membrana y unidas mediante un enlace disulfuro. El péptido δ se pensaba que poseía un segmento transmembranal pero recientemente se ha descubierto que dicho péptido se adhiere a la membrana a través de un enlace glicosilfosfatidilinositol, anclando al péptido extracelular α_2 (Buraei *et al.* 2010).

La subunidad $\alpha_2\delta$ puede modificar las propiedades biofísicas de las subunidad α_1 , pero su principal papel es la de incrementar la corriente de Ca^{2+} fomentando el tráfico de la subunidad α_1 a la membrana plasmática o favoreciendo la retención de la subunidad α_1 en la membrana. Recientemente se ha reportado que la subunidad $\alpha_2\delta$ funciona como receptor para la trombospondina regulando la sinaptogénesis excitatoria, independientemente de su función reguladora de los canales Cav (Buraei *et al.* 2010; Eroglu *et al.* 2009).

IV. Subunidad γ

Es una proteína integral de membrana, existiendo 8 genes diferentes, que producen proteínas con 4 segmentos transmembranales y con extremos amino y carboxilo intracelulares, de esos 8 genes solo se considera a $\gamma 1$ como un integrante de los canales Ca_v musculares, ningún otro canal posee de forma integral a esta subunidad. Esta subunidad altera las corrientes de Ca^{2+} y su cinética de inactivación, efectos que dependen de las subunidades α_1 y β involucradas (Buraei *et al.* 2010). El efecto en los canales Ca_v más común, es una reducción de la corriente, causada principalmente por un cambio hiperpolarizante de la dependencia al voltaje de activación. Sin embargo, también se han identificado funciones de tráfico, localización y regulación de las propiedades biofísicas de los receptores AMPA, entre otros (Buraei *et al.* 2010; Chen *et al.* 2007).

E. Interacción entre la subunidad α_1 y la subunidad β .

Con la purificación de las subunidades proteicas que constituyen a los canales Ca_v se demostró la asociación de la subunidad α_1 de canales HVA con las subunidades β (Borsotto *et al.* 1985). A partir de entonces se han realizado estudios relacionados con la interacción entre ambas subunidades, por ejemplo, al expresar diversas subunidades α_1 , en presencia o ausencia de alguna de las subunidades β y/o de las subunidades $\alpha_2\delta$, se demuestra que hay baja e incluso nula expresión de la actividad de los canales cuando no se coexpresa la subunidad β .

Se ha demostrado que la interacción entre la subunidad α_1 y la subunidad β es necesaria para que los canales HVA sean funcionales (Catterall, 2011; Arias *et al.* 2005). El equipo de Snutch revisó bibliotecas de epítopes de al menos 20,000 fragmentos de diversos canales $\text{Ca}_v1.1$, e identificaron una región en el asa que conecta los dominios I y II, como la región en donde se unen la subunidad α_1 y la subunidad β (Pragnell, 1994).

Esa región conocida como “dominio de interacción de la subunidad α_1 ” ó AID (del inglés α_1 interaction-domain), fue identificada posteriormente en las subunidades α_1 de todos los canales HVA, sin embargo no se encuentra en la secuencias de las subunidades α_1 de los canales LVA (Catterall, 2011). Dicho AID comprende una región de 18 aminoácidos, con una secuencia consenso **QQxExxLxGYxxWlxxxE** (De Waard *et al.* 1996). El papel del AID en la interacción se determinó al realizar mutaciones simples en alguno de sus residuos, incluyendo los residuos mayormente conservados Y10, W13 e I14, observándose una disminución drástica de la interacción entre ambas subunidades (Buraei *et al.* 2010).

Por otra parte, inicialmente se identificó en la subunidad β un segmento de 31 aminoácidos referido como el “dominio de interacción de la subunidad β ” (BID, ver Figura 4B), al que se le atribuyó el sitio principal de unión con el AID, esto porque se observó que el BID es capaz de aumentar ligeramente las corrientes en algunos canales Ca_v , y así modular su apertura y/o cierre. Además de que mutaciones en el BID debilitan o incluso eliminan la interacción entre ambas subunidades (De Waard *et al.* 1994 y 1996).

Sorpresivamente, con el estudio de las estructuras cristalinas de diferentes núcleos de algunas subunidades β , se revela que el AID jamás se une al BID, ya que dicha estructura se encuentra plegada hacia el interior de la subunidad β , y nunca entra en contacto directo con el AID de la subunidad α_1 (Chen *et al.* 2004). En cambio, se identificó que el AID se une a un surco hidrofóbico localizado en el dominio GK denominado “bolsa de unión al AID” (ABP del inglés AID-binding pocket, ver Figura 4C). De tal forma, la interacción entre las subunidades α_1 y β es relativamente conocida, pero la forma en que regula los efectos que le son atribuidas, aún no lo está (Buraei *et al.* 2010; Chen *et al.* 2004). Como se mencionó, la subunidad α_1 de los canales HVA posee las estructuras funcionales del canal, como el poro y el filtro de selectividad, el sensor de voltaje y los sitios de unión para drogas o toxinas específicas para cada canal.

No obstante, a diferencia de los canales LVA, la sola expresión de esta subunidad tiene como resultado la nula o escasa generación de corrientes de Ca^{2+} , que puede ser consecuencia de fenómenos y/o estructuras relacionados con el plegamiento y/o la expresión de los canales, que resultan en la modificación de sus propiedades biofísicas (Buraei *et al* 2010). A partir de esto se observó que es necesaria la coexpresión de la subunidad $\alpha_{2\delta}$ y/o la subunidad β para aumentar la cantidad de subunidades α_1 expresadas en la membrana plasmática (Arikkath *et al.* 2003).

El mecanismo mayormente aceptado para explicar este efecto de las subunidades β es que oculta, mediante su unión a la subunidad α_1 , una señal de retención en el retículo endoplásmico (SRRE) en el asa I-II de la subunidad α_1 , favoreciendo su expresión en la membrana de la célula (Bichet *et al.* 2000; Cornet *et al.* 2002). No obstante, diversas investigaciones, donde generan proteínas quiméricas LVA-HVA, en la que sustituyen el asa I-II de un canal LVA, no regulado por las subunidades β , por el correspondiente de un canal HVA, observan que se transfiere cierta capacidad de regulación por las subunidades β . Sin embargo, no existe un incremento significativo en la densidad de corrientes, contradiciendo la idea de la existencia de una SRRE, o si existe debe necesitar elementos adicionales ausentes en el asa I-II (Arias *et al.* 2005).

De hecho recientemente esta idea ha sido enriquecida basado en los datos obtenidos después de transferir asas intracelulares de la subunidad α_1 de $\text{Ca}_v1.2$ a un canal de tipo T ($\text{Ca}_v3.1$), que sugieren que el asa I-II de $\text{Ca}_v1.2$ tiene una señal de exportación a 9 aminoácidos debajo del AID, que en el momento de la unión de ambas subunidades favorece la exportación de los canales a la membrana (Fang y Colecraft, 2011). De cualquier forma, una proteína quimérica entre los canales LVA ($\text{Ca}_v3.1$) y HVA ($\text{Ca}_v2.2$) creada por Arias y colaboradores en 2005 en la que logran transferir aspectos de la modulación por las subunidades β , como el desplazamiento de la dependencia al voltaje (cerca de -7 mV) en su curva de activación y un enlentecimiento de su cinética de inactivación, resultando en una mayor corriente residual al final del pulso de prueba.

Sin embargo, esta quimera, denominada G12B, no presentó modulación en la inactivación desde el estado cerrado, esto puede atribuirse a la ausencia de elementos adicionales no presentes en la quimera.

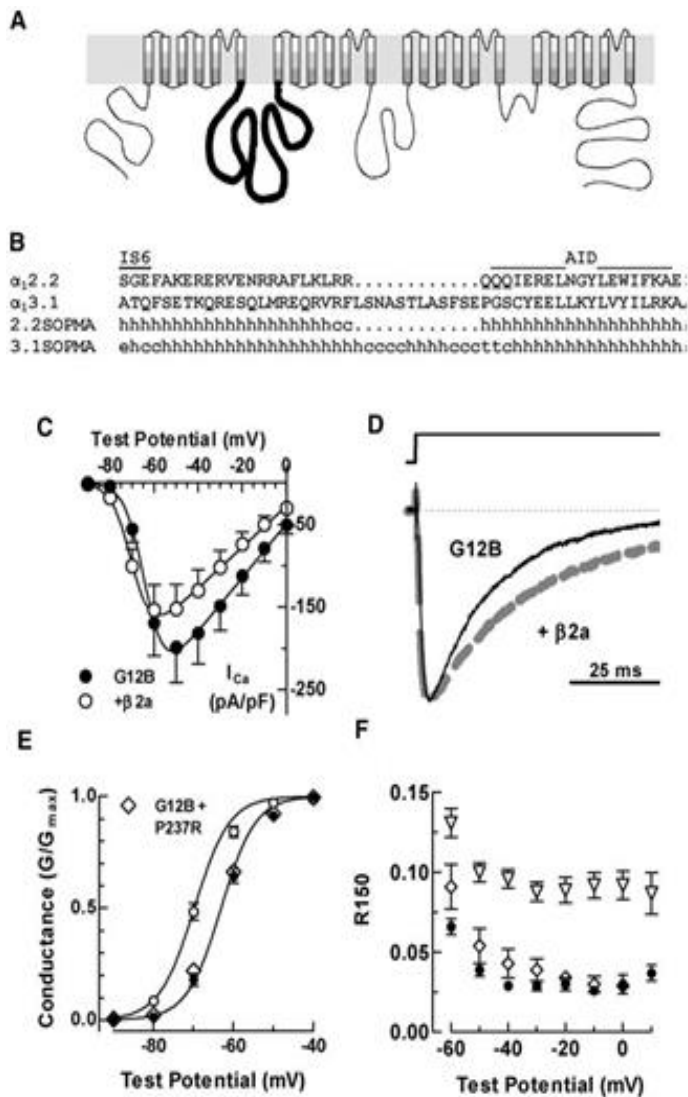




Figura 5. Transferencia parcial de la regulación por subunidades β en el canal quimérico G12B. **A.** Diagrama esquemático ilustrando los 4 dominios de Cav3.1 (en tonos de grises y líneas delgadas) y el asa I-II de Cav2.2 (línea gruesa). **B.** Secuencia de aminoácidos entre el final del segmento IS6 y el asa I-II (hasta el AID); la estructura secundaria predicha es representada por “h” α -hélices, “e” hojas β , “c” espirales al azar y “t” de giros (del inglés turn). **C.** Relación corriente/voltaje (I/V) de G12B en ausencia (●) o presencia (○) de β 2a; los datos representan promedios \pm EEM de 12 -13 células. **D.** Trazos de corriente normalizados obtenidos durante pulsos despolarizantes a -40 mV desde un potencial de mantenimiento de -100 mV. **E.** Gráficos de conductancia normalizada **F.** Gráfico de la corriente residual normalizada a 150 ms (R_{150}) que incluye los datos obtenidos desde células transfectadas con G12B (◇) contra el control Cav3.1 (▽; modificado de Arias *et al.* 2005).



Por otro lado estudios del papel del asa I-II y del segmento IS6 demostraron que este segmento juega un papel importante en las transiciones de los estados del canal. Uno de los mecanismos postulados de como la subunidad β regula la activación y cinética de los canales es alterando la movilidad del IS6, teniendo efectos por un acople a través de un enlace rígido del segmento IS6 al asa I-II a la altura donde se localiza el AID (Arias *et al.* 2005). La predicción de la estructura secundaria del AID describe una alta probabilidad que se forme una α -hélice, confirmado por estudios de dicroísmo circular de péptidos sintéticos del segmento IS6-AID, aunque esto sucede siempre en presencia de la subunidad β (ver figura 5B).

Se piensa que bajo la condición en la que el AID no esté en contacto con alguna subunidad β , el AID tiene una estructura desordenada, y cuando interactúa con la subunidad β se forma una estructura α -hélice que se extiende a través del segmento IS6, creándose un “eslabón IS6-AID”. Así, la subunidad β modula la apertura y/o cierre de los canales Cav al restringir el movimiento del segmento IS6 mediante una estructura rígida del eslabón IS6-AID (Arias *et al.* 2005). Como se mencionó, en la quimera G12B no se presentaron propiedades en la modulación relacionadas a las subunidades β , como modificar la inactivación desde el estado cerrado, que puede atribuirse a la ausencia de elementos no presentes en la quimera.

Entonces puede pensarse que la unión ABP-AID no sea la única presente entre ambas subunidades, existiendo una posible asociación con otras regiones en ambas subunidades teniendo una menor afinidad entre ellos, pero sin dejar de ser importantes y/o relevantes en la función del canal (Buraei *et al.* 2010; Chen *et al.* 2004). Adicional a la interacción AID-ABP, existen investigaciones que demuestran la asociación entre la subunidad α_1 y la subunidad β en otras regiones, que comprenden el COOH terminal de la subunidad β y los extremos NH2 y COOH de las subunidades α_1 (Hidalgo *et al.* 2007).



Los canales Cav al encontrarse en la membrana plasmática de las células de todos los seres vivos, juegan roles importantes en sus procesos fisiológicos, como ya se mencionó. Un mayor entendimiento de la interacción entre las subunidades α_1 y la subunidad β en los canales Ca_v se vuelve de suma importancia al ser proteínas involucradas en la fisiología de las células y/o tejidos que constituyen. Este conocimiento explicaría defectos en la función de los canales llamados canalopatías (Crozier *et al.* 1989).

Las canalopatías son originadas por diversos mecanismos, genéticos y fisiológicos, en primera instancia pueden ser ocasionadas por mutaciones en la región promotora de los genes que codifican a los canales iónicos causando una nula, baja o sobreexpresión de las proteínas involucradas. Una segunda causa son mutaciones en la región codificante de los genes para los canales, que puede ganar o perder la función del canal teniendo consecuencias incluso mortales. Por ejemplo, mutaciones que producen el aumento de la actividad de canal de Na^+ epitelial son responsables del síndrome de Liddle (Hansson *et al.* 1995), mientras que las mutaciones que causan reducción de la actividad del mismo canal están involucradas en el pseudohipoaldosteronismo tipo 1 (PHAT1; Chang *et al.* 1996).

En tercer lugar están enfermedades resultado de defectos en la regulación de la actividad de los canales a través de ligandos o moduladores (hormonas o neurotransmisores), para los cuales los genes codificantes han sido mutados o silenciados, como lo observado en el caso de algunas formas de diabetes mellitus (Terauchi *et al.* 1995). En cuarto lugar están las enfermedades auto inmunes que atacan directamente a los canales iónicos. Se ha reportado que las alteraciones en la actividad en los canales Cav se atribuyen a defectos en su biosíntesis y el tráfico hacia la membrana plasmática (Figura 6). La existencia de subunidades α_1 truncadas del canal Ca_v revela que existen mutaciones que pueden alterar el tráfico hacia la membrana celular (Wan *et al.* 2005).

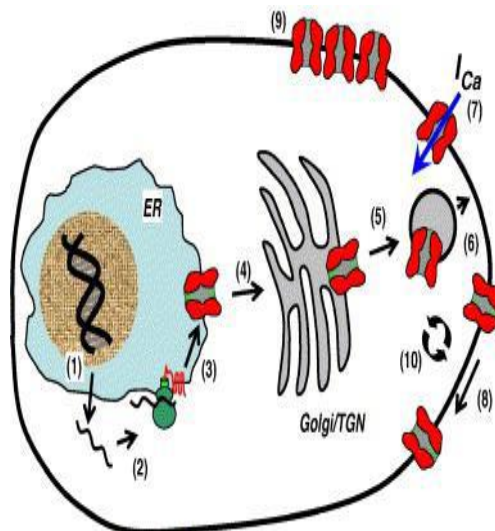


Figura 6. Las mutaciones que crean canalopatías afectan vías celulares involucradas en la síntesis de las proteínas y/o el tráfico a la membrana plasmática. La función alterada del canal Cav puede surgir de la síntesis alterada en las proteínas a nivel de la transcripción génica, tales como mutaciones durante (1) el empalme alternativo; (2) su traducción; (3) plegamiento y ensamble en el retículo endoplásmico (ER); (4) a nivel de la exportación del ER al aparato de Golgi para su maduración; y (5) en la vesiculación de la red transgolgi (TGN). En la membrana plasmática, además de defectos electrofisiológicos intrínsecos generados (7), los canales iónicos pueden sufrir de (8) compartimentación inapropiada; (9) agrupación incorrecta; o (10) anomalías en su reciclaje y degradación (modificado de Bidaud et al. 2006).

Se han identificado diversas canalopatías asociadas a los genes que codifican a los canales Cav , estas enfermedades y/o síndromes son agrupadas dentro de las llamadas canalopatías del calcio, estos desordenes generan alteraciones electrofisiológicas como causa principal de las enfermedades, sin embargo existe evidencia que indica que diferentes aspectos durante la expresión, el procesamiento o la función pueden ser afectados (Bidaud *et al.* 2006). La primer canalopatía de calcio descrita en humanos y por mencionar alguna, la parálisis periódica hipocelámica tipo 1 (hypoPP1), relacionada a mutaciones en el gen *CACNA1S* que codifica al canal $Cav1.1$ que es expresado en músculo esquelético; para esta canalopatía se encontraron sustituciones de aminoácidos ubicados en el segmento S4 de los dominios II y IV, mostrando la función de los miotubos.

Debido a que los canales Ca_v se ubican en prácticamente todas las células excitables (células neuronales, glandulares y/o musculares ver tabla 1), el tratamiento de éstas y otras canalopatías pueden incluir la administración de fármacos que restablezcan la función de los canales Ca_v , como las dihidropiridinas, que son empleadas para el tratamiento de la hipertensión y diversos tipos de epilepsias. Sin embargo, estas drogas poseen efectos secundarios debido a que no son específicas para los canales a los que se quisiera restablecer su función adecuada. Debido a esto, el hacer investigaciones para conocer la estructura de las proteínas involucradas permitirá establecer la relación que existe entre la función de un canal Ca_v y su estructura, con la finalidad de diseñar fármacos o terapias más específicos.

F. Justificación.

La manipulación de ADN recombinante y el uso de técnicas de expresión han sido usados extensamente para caracterizar los residuos de aminoácidos y dominios que tienen una influencia específica en las funciones de los canales iónicos.

Los estudios de estructura-función utilizando manipulación de ADN recombinante han sido llevados a cabo para investigar aspectos de la función de los canales, incluyendo la apertura y cierre del canal, sitios de unión a ligandos, la inactivación y desactivación de los canales, dependencia al voltaje, selectividad iónica, ensamble de proteínas, modulación del canal por vías o subunidades accesorias, tráfico en la membrana y sitios de unión de toxina y/o drogas.

El conocimiento de la estructura y la función de los canales Ca_v se vuelve de suma importancia si se toma en cuenta la diversidad de tejidos en los que se expresan y los procesos fisiológicos donde participan.

G. Hipótesis.

Dado que las características biofísicas en los canales Ca_v tipo HVA dependen de la interacción de la subunidad α_1 con la subunidad β y debido a que la simple unión entre las regiones AID en la subunidad α_1 y el ABP de la subunidad β , no es la única que le confiere las propiedades biofísicas atribuidas a las subunidades β , posiblemente éstas, sean el resultado de la unión con otras regiones en los segmentos S6 (IS6, IIS6, IIIS6 y/o IVS6), los extremos carboxilo y/o amino, además de las asas intracelulares II-III y III-IV (Choe, 2002; Arias *et al.*, 2005).

Entonces pensamos que, se podría transferir toda o parte de la regulación característica por la subunidad β a un canal Ca_v quimérico LVA/HVA (Canal G12B generado por Arias *et al.* 2005) al intercambiar el extremo carboxilo de la subunidad α_1 de un canal HVA ($Ca_v2.2$) a dicho canal quimérico.

OBJETIVOS.

Tomando como base el canal quimérico desarrollado por el equipo de Perez-Reyes (Arias *et al.* 2005) denominado G12B, en donde el asa I-II del canal $Ca_v2.2$ le confiere al canal $Ca_v3.1$ la capacidad de ser parcialmente regulado por la subunidad β se proponen los siguientes objetivos.

Objetivo general.

Establecer la contribución del extremo carboxilo terminal (COOH) de la subunidad α_1 del canal $Ca_v2.2$ en la regulación de las propiedades biofísicas conferidas por las subunidades β generando un canal de calcio operado por voltaje quimérico, en el cual al canal de bajo umbral $Ca_v3.1$ se le sustituyó simultáneamente el asa I-II y el extremo carboxilo terminal provenientes del canal HVA $Ca_v2.2$.

Objetivos particulares.

1. Sustituir en el ADNc del canal quimérico G12B la secuencia del extremo carboxilo por el correspondiente del canal $Ca_v2.2$;
2. Expresar en una línea celular los canales quiméricos generados, en presencia o ausencia de las subunidades β_{2a} y β_3 .
3. Determinar mediante técnicas de electrofisiología si existe efecto en la regulación de los nuevos canales quiméricos por las diferentes subunidades $Ca_v\beta$.

MATERIALES Y MÉTODOS.

A. Construcción del ADNc de los canales CRG12Ba y CRG12Bb.

Consideraciones iniciales

1. Los plásmidos que contienen los ADNc de las diferentes subunidades α_1 ($Ca_v2.2$ en el plásmido pcDNA6V5/His-A1B y el canal G12B en el plásmido HE3-RG12Ba) y de las subunidades β_{2a} y β_3 (plásmidos HE3-B2a y HE3-B3), fueron donados por el Dr. Edward Perez-Reyes del Departamento de Farmacología de la Universidad de Virginia, USA.
2. Las secuencias de los insertos en los plásmidos fueron tomadas de las bases de datos GeneBank: $Ca_v2.2$ con código AF055477 y $Ca_v3.1$ con código de AF027984; en el caso de la quimera G12B fue enviada junto con el plásmido HE3-RG12Ba.
3. Raybaud y col. en 2007 observaron que los canales HVA poseen una secuencia de 5 aminoácidos (VAVIM) en el extremo IVS6 altamente conservada al que describen confiere estabilidad en el estado cerrado, por lo que se decide generar dos canales quiméricos, un canal conservando estos aminoácidos y el otro no, con la finalidad de otorgar a un canal la estabilidad observada por Raybaud.
4. El conocimiento de las estructuras involucradas en la regulación de los canales HVA por las subunidades auxiliares, es explorado mediante la generación de canales quiméricos utilizando el esqueleto de un canal LVA ($Ca_v3.1$), en el cual anteriormente se le sustituyó el asa I-II de un canal HVA ($Ca_v2.2$) por Arias y col. en 2005 y posteriormente el extremo carboxilo, aprovechando la característica intrínseca de los canales LVA de no ser regulados por las subunidades β de los canales HVA.

5. La nomenclatura utilizada para nombrar los canales quiméricos generados fue utilizando como base el canal G12B y a su izquierda se colocó la letra “R” (debido a que el ADNc de los canales Cav2.2 y Cav3.1 provino de rata (*Rattus norvegicus*) y de la letra “C” haciendo referencia a que se substituyó el extremo carboxilo), denominándose al primer canal **CRG12Ba** el cual posee la secuencia de nucleótidos que codifican a los aminoácidos -VAVIM- y el segundo canal **CRG12Bb** en la que no se incluye la secuencia -VAVIM- (Figura 7; Raybaud *et al.* 2007).

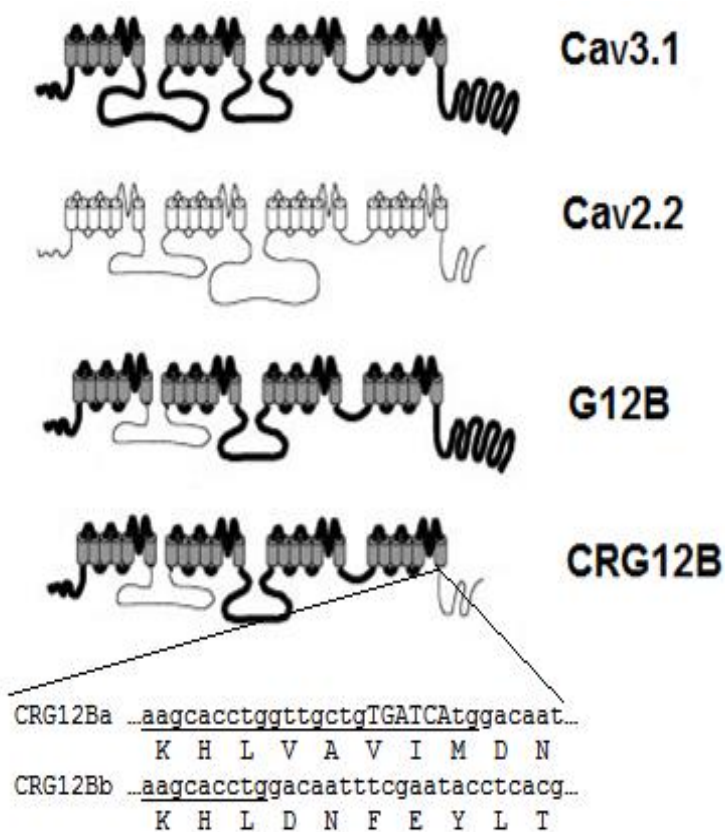


Figura 7. Diagrama esquemático de los canales nativos y/o quiméricos empleados. Las subunidades α_1 están desplegadas y se muestran con cilindros los segmentos transmembranales; los cilindros grises y líneas gruesas indican regiones de Cav3.1, mientras que los cilindros blancos y las líneas delgadas indican las porciones de Cav2.2. Se muestra en detalle la secuencia de nucleótidos con aminoácidos entre el final del IVS6 (subrayado) y el inicio del COOH (sin subrayar) para diferenciar a las quimeras CRG12Ba y CRG12Bb. En la secuencia de nucleótidos de CRG12Ba se muestra en mayúsculas el sitio de corte para la enzima de restricción BclI (TGATCA).

Construcción del ADNc de los canales quiméricos.

Se utilizó la técnica de extensión del empalme por reacción en cadena de la polimerasa (OE-PCR, Keckman y Pease 2007) como principal forma de construcción del ADNc de las proteínas quiméricas. Se analizó *in silico* la secuencia de nucleótidos de las subunidades α_1 involucradas en el proyecto apoyado de la base de datos UNIPROTKB/Swiss Prot, y se ubicó las secuencias que corresponden a las regiones de los extremos carboxilo de las subunidades α_1 del canal quimérico G12B (idéntico al canal Cav3.1) y del canal nativo Cav2.2.

La ubicación de los oligonucleótidos en la secuencia de los canales así como su diseño se hizo localizando o agregando sitios de corte de enzimas de restricción, con el objetivo de ser usados para análisis de restricción, la formación del marco de lectura y/o su inserción en el Vector pcDNA3-HE4 (Figura 8).

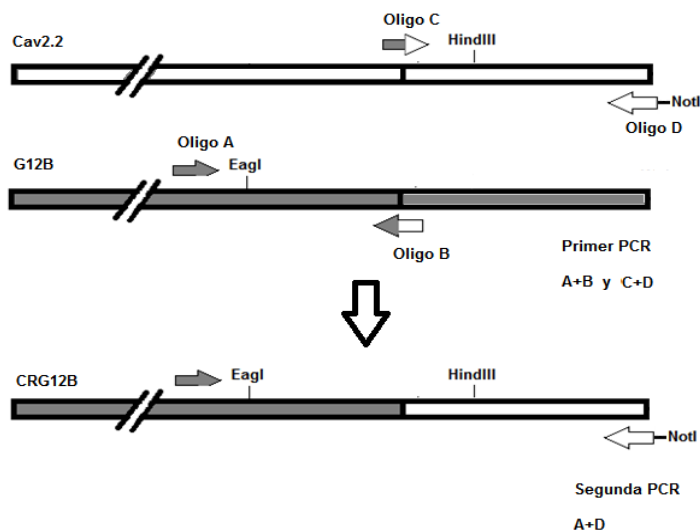


Figura 8. La técnica de extensión del empalme por PCR genera productos quiméricos mediante el uso de varias amplificaciones. Los oligonucleótidos “B” y “C” generan secuencias que se empalman por lo que después de una primer PCR usando los oligonucleótidos A y B generan el segmento G12B (gris) y los oligonucleótidos C y D generan el segmento Cav2.2 (blanco), la tercera amplificación genera un producto híbrido o segmento quimérico CRG12B (a y b).

Para las amplificaciones por PCR se empleó por su alta fidelidad, la polimerasa de ADN *Pfu* (Fermentas, Vilna, Lituania), amplificándose inicialmente dos fragmentos, el primero usando como molde el plásmido con el ADNc del canal G12B (plásmido HE3-RG12Ba) y el segundo fragmento usando el plásmido con el ADNc del canal Ca_v2.2 (plásmido pcDNA6V5/His-A1B).

Los fragmentos amplificados por PCR se limpiaron y purificaron por electroforesis en geles de agarosa (0.8% a 1.2%) y en cromatografía en columna de sílica por centrifugación del estuche Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up (Promega, WI, USA), para posteriormente incluirse en una tercer PCR usando los oligonucleótidos que flanquean los extremos, permitiéndose la extensión del empalme entre los fragmentos quiméricos. Sin embargo, en el caso de la quimera CRG12Ba no se detectó extensión del amplificado, a pesar de favorecerlo con un gradiente en la temperatura de hibridación o con el uso de DMSO (dimetilsulfóxido) durante la PCR (Keckman y Pease 2007), problema no observado en la construcción del canal quimérico CRG12Bb al obtenerse el fragmento amplificado correspondiente.

La creación del fragmento quimérico del canal CRG12Ba, se llevó a cabo al detectar que en la secuencia que codifica a los aminoácidos VAVIM se encuentra el sitio de corte para la enzima de restricción BclI (ver Figura 7), por lo que cada fragmento amplificado extraído en la primer PCR, fue ligado por separado al vector pJET1.2 Blunt del estuche CloneJET PCR Cloning (Thermo Scientific) generando los plásmidos pJET-A1GF1/GBR3 y pJET-GBF1/A1BR1, amplificados por transformación de *Escherichia coli* Dam⁻/Dcm⁻ (cepa ER2925; New England Biolabs, MA, USA). Los plásmidos pJET-A1GF1/GBR3 y pJET-GBF1/A1BR1 se cortaron con las enzimas de restricción BclI (T[^]GATCA) y ClaI (AT[^]CGAT), obteniéndose, previo limpieza y purificación por electroforesis en geles de agarosa (1.0%) y cromatografía en columna de sílica por centrifugación, los fragmentos de ~2.0 kpb (del plásmido pJET-A1GF1/GBR3) y ~4.9 kpb (del plásmido pJET-GBF1/A1BR1) que fueron ligados entre sí para generar el plásmido que contiene el fragmento quimérico completo **pJET-CRG12Ba**.

En el caso de la construcción del fragmento quimérico para el canal CRG12Bb, después de la PCR de empalme, el producto amplificado se limpió y purificó por electroforesis en geles de agarosa (1.0%) y cromatografía en columna de sílica por centrifugación, ligándose al vector pJET1.2 Blunt denominándose ahora **pJET-CRG12Bb** que se amplificó por transformación de *E. coli* DH5 α (New England Biolabs, MA, USA; Sambrook y Russell 2001).

La secuencia de nucleótidos de los insertos introducidos en los plásmidos pJET-CRG12Ba y pJET-CRG12Bb fue confirmada por análisis de restricción y por secuenciación en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FESI para descartar errores o artefactos introducidos durante las diversas amplificaciones. En el caso del canal CRG12Ba no tuvimos errores, en cambio en el canal CRG12Bb se detectó una sustitución de un nucleótido que produce un codón de paro previo al correcto, corregido por sustitución de esa región del plásmido pJET-CRG12Ba (corte y ligación con BspEI) antes de la creación del marco de lectura completo.

En un inicio el ADNc del canal quimérico G12B estuvo insertado en el vector pcDNA3-HE3 en el plásmido HE3-RG12Ba. En conjunto a este trabajo en el laboratorio de electrofisiología de la UIICSE-FESI se creó a partir de pcDNA3-HE3 el vector pcDNA3-HE4 (o solo HE4), por lo que además de la inserción del ADNc de los canales quiméricos CRG12Ba y CRG12Bb, se introdujo el ADNc del canal quimérico G12B al vector HE4.

Durante la transferencia del ADNc del canal G12B al plásmido HE4 se contó con una construcción intermedia llamada ParHE4-RG12B, generada cortando y ligando los plásmidos HE4 y HE3-RG12Ba entre los sitios de las enzimas EcoRI y NotI. Para completar el marco de lectura y generar el plásmido completo HE4-RG12Ba, se agregó la secuencia terminal de HE3-RG12Ba cortado con EagI y NotI. Aprovechando esta construcción parcial (plásmido ParHE4-RG12B), se cortaron los plásmidos de los diferentes fragmentos quiméricos del canal quimérico CRG12Ba (plásmido pJET-CRG12Ba) y del canal CRG12Bb (plásmidos pJET-CRG12Bb) con las enzimas adecuadas (Figura 9).

El ADNc de los canales fue ligado al vector de clonación pcDNA3-HE4 (llamados HE4-G12B, HE4-CRG12Ba, HE4-CRG12Bb), mientras que la secuencia de las subunidades β (β_{2a} y β_3) se ligaron al vector pIRES2-EGFP creando los plásmidos pIRES2-EGFP- β_{2a} y pIRES2-EGFP- β_3 .

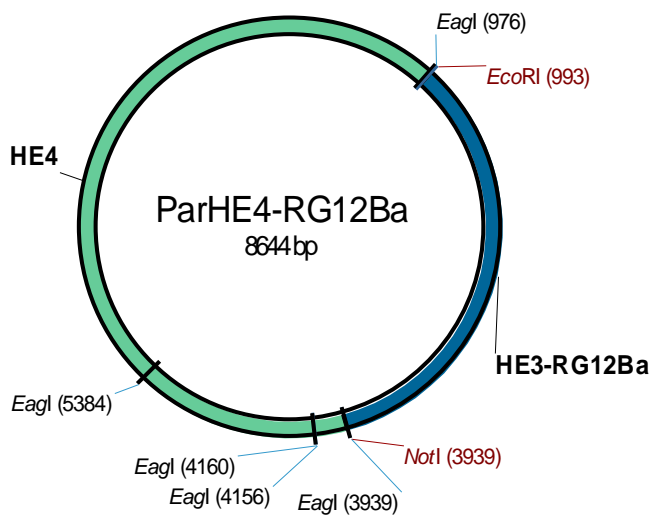


Figura 9. Representación del plásmido ParHE4-RG12B utilizado para la creación del ADNc de los canales CRG12Ba y CRG12Bb, en el cual el plásmido HE4 cortado con las enzimas de restricción EcoRI y NotI, se le insertó la secuencia de ADNc que correspondiente del canal G12B cortado con las mismas enzimas.

Todos los plásmidos fueron amplificados, extraídos y purificados mediante la técnica de miniprep (Sambrook y Russell 2001). Todos los amplificados y/o productos de cortes por enzimas de restricción se purificaron por electroforesis en geles de agarosa (de 0.8 % a 1.2 %) y cromatografía en columna de sílica por centrifugación usando el estuche Wizard[®]SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, WI, USA). Mientras que los plásmidos completos HE4-G12B, HE4-CRG12Ba, HE4-CRG12Bb, pIRES-EGFP- β_{2a} y pIRES-EGFP- β_3 fueron purificados y concentrados usando el estuche GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific).

Es importante mencionar que pcDNA3-HE3 (o HE3) es un vector de expresión modificado a partir del vector comercial pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), al que se le adicionó antes del sitio múltiple de clonación (SMC) parte de la secuencia 3' no traducida (UTR) de la proteína β -globina de *X. laevis*, mientras que el vector pcDNA3-HE4 (o HE4) posee las secuencias 3' UTR y 5' UTR flanqueando el SMC con la finalidad de favorecer la traducción de los transcritos que contienen ambos vectores.

En tanto que el vector pIRES2-EGFP contiene el sitio interno de entrada al ribosoma (del inglés IRES) del virus de encefalomiocarditis (ECMV) entre el SMC y la región que codifica la proteína verde fluorescente (del inglés Green Fluorescent Protein o GFP), permitiendo que el gen de interés clonado y la GFP sean traducidos desde un ARNm único, posibilitando la selección de las células positivas después de la cotransfección.

B. Cotransfección de cultivo de células HEK-293T.

La línea celular HEK-293T (derivadas de riñón de embrión humano; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), se caracteriza por la nula expresión de canales Ca_v , ni Na_v (CITA) Estas células fueron crecidas en monocapa sobre cajas de Petri de 100mm bajo condiciones estándar de incubación (atmósfera de humedad saturada, con 95 % de O_2 y 5 % de CO_2 a 37°C).

Se utilizó el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con suero fetal bovino al 10 %, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina (DMEM completo). Al alcanzar entre 80 % y 90 % de confluencia, se tripsinizó retirando el medio y lavándose con 5 mL de Verseno (solución amortiguadora de fosfatos libre de calcio adicionada con EDTA al 0.25 %) retirado inmediatamente, después se agregaban 5 mL de Verseno fresco dejándose en contacto de 3 a 5 min hasta que la monocapa se desprendía del fondo de la caja, transcurrido este tiempo se adicionaron 2 mL de solución de tripsina (0.05 %) por no más de 5 min, inactivándose al agregar 5 mL de DMEM completo, al finalizar se realizó una disociación mecánica.

Las células se resembraron bajo tres condiciones: la primera para mantener un banco de células, sembrándose en una caja de Petri de 100 mm, en una dilución 1:20 en 10 mL de DMEM completo; la segunda condición, utilizada para la cotransfección de células, sembrando en cajas de 35 mm de diámetro, a una dilución 1:1 en un volumen de 2.5 mL; y la tercera para colocar células en las cámaras de registro electrofisiológico, el medio DMEM completo se cambiaba cada 2 o 3 días.

La transfección transitoria de las células HEK293T se realizó utilizando polietilenimina (PEI) con los ADNc de los canales G12B, CRG12Ba y CRG12Bb en presencia o ausencia de las subunidades β 2a y β 3. Cuando se incluyeron las subunidades β , la cotransfección fue en concentraciones equimolares (1:1), mientras que la cotransfección en ausencia de la subunidad β , fue en presencia del vector pIRES-EGFP (1:0.5) sin inserto, usándose de 1 a 3 μ g totales de ADNc (Seidman *et al.* 1997).

C. Registro electrofisiológico de los canales quiméricos.

El registro de las corrientes macroscópicas inducidas por la actividad de los canales quiméricos G12B, CRG12Ba y CRG12Bb, en presencia o ausencia de las subunidades β , se realizó mediante la técnica de fijación del voltaje en microáreas de membrana o *patch clamp*, en su configuración de célula completa o whole cell (Hamill *et al.* 1981).

Los registros se obtuvieron usando un amplificador Axopatch 200A, conectado a una interfase Digidata 1400, que convierte las señales analógicas de las células en señales digitales que se almacenan en un CPU usando el programa WinWCP V4.7.3 (University of Strathclyde; ver Figura 10). En cámaras de registro (cubreobjetos, adaptados con un contenedor para la solución externa), se colocaron células disociadas por tratamiento con tripsina. Para favorecer la adhesión de las células HEK293T, se agregó una base de poli-L-Lisina (100 μ g/mL).

Cada cámara se montó en la platina de un microscopio óptico invertido en el sistema de registro (Figura 10), se conectó a un sistema de perfusión para solución externa (en mM: 5 CaCl₂, 166 TEA-Cl, 10 HEPES, pH 7.4 ajustado con TEA-OH) a un flujo de 1.0 mL/min. Las células se analizaron hasta por 1.5 h después de colocarse en el sistema. Las pipetas de registro se fabricaron a partir de capilares de borosilicato, usando un estirador vertical, cada pipeta tuvo una resistencia de entre 3 y 5 M Ω y se llenó con solución interna (en mM: 125 CsCl, 10 EGTA, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 4 Mg-ATP, 0.3 Na₃GTP y 10 HEPES, pH ajustado a 7.2 con CsOH).

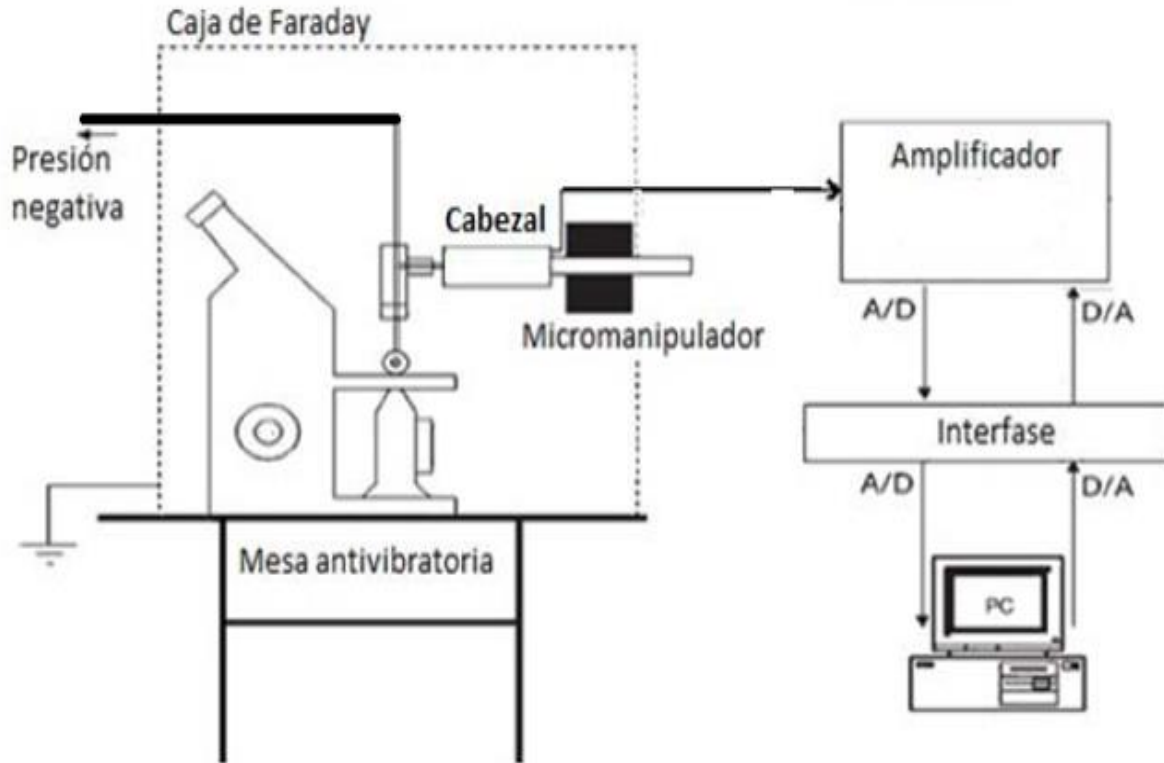


Figura 10. Representación esquemática del sistema de registro electrofisiológico. El cabezal controla el valor de voltaje impuesto por el electrodo de plata y cuantifica al mismo tiempo la corriente iónica que fluye a través de la membrana celular. Los pulsos (V_0) y el potencial de mantenimiento, son generados por el amplificador. El amplificador nos permite reducir manualmente las espigas de corriente capacitiva asociados a la capacitancia de la célula y/o el electrodo. La señal de corriente iónica fue digitalizada mediante un convertidor analógico a digital (A/D) en la interfase, que es almacenada en el disco duro de una computadora para su análisis posterior (modificado de Arias-Olguin 2009).

La técnica consistió en colocar la punta de una pipeta sobre la membrana de una célula positiva a la GFP y formar un sello cuya resistencia $\geq 10^9 \Omega$ (gigasello), fue favorecida por presión negativa (succión); después el potencial de mantenimiento se llevó a -100 mV, seguido de una segunda succión que rompió la membrana de la célula, estableciendo un continuo entre el contenido de la célula y la punta de la pipeta característico de la configuración en célula completa.

En este proceso el programa WinWCP V4.7.3 registró el aumento de la capacitancia, en un inicio debido a la formación del gigasello asociado a la punta de la pipeta, y después de romper el sello como consecuencia de la membrana plasmática. Dichos capacitivos se cancelaron a través del amplificador y después de esto se aplicó el protocolo de voltaje diseñado para registrar las corrientes de Ca^{2+} . La resistencia de acceso se compensó al menos al 70 % entre los protocolos (predicción y corrección, retraso 10 μs). Las propiedades biofísicas de los canales se evaluaron mediante un protocolo de estimulación estándar, generado a través del programa WinWCP V4.7.3, y que consistió en tener el potencial de mantenimiento a -100 mV y aplicar una serie de pulsos de voltaje despolarizantes de 200 ms de duración llevando el V_m a valores de -90 mV a +80 mV, con incrementos de 10 mV entre cada pulso.

D. Análisis de Datos.

A los registros de las corrientes de Ca^{2+} obtenidos se les restó la corriente de fuga (corriente que se pierde a través del gigasello entre la punta del electrodo y la membrana celular) usando el programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc, Whashington, USA); después de esto se transfirieron los datos de cada registro a los programas Clampfit 9.2 (Axon Instruments), Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) y/o Excel (Microsoft Office) para su análisis y/o elaboración de los gráficos descritos posteriormente.

Con los datos extraídos de los registros se realizó una gráfica de relación corriente-voltaje (curva I-V), se calculó la dependencia al voltaje de los canales (voltajes medios de activación e inactivación en el estado estacionario, pendientes de las curvas de activación e inactivación), así como las cinéticas de activación (τ_{act}) e inactivación (τ_{inact}).

El potencial de inversión se obtuvo del ajuste a la relación corriente-voltaje (I-V) con la ecuación modificada de Boltzmann (Ecuación 1).

$$I(V, Ca_i, Ca_o) = \frac{P_{Ca} Z_{Ca}^2 V (Ca_i - Ca_o) \exp(-Z_{Ca} F V)}{RT} \frac{1}{1 - \exp(-Z_{Ca} F V / RT)} \frac{1}{1 + \exp[(V_{1/2} - V)/k]}$$

Ecuación 1. Ecuación modificada de Boltzmann. Donde P_{Ca} es la permeabilidad para el ión calcio (cm/s), Z es su valencia, F la constante de Faraday, R es la constante de los gases, T es la temperatura (K), V es el potencial de prueba (V), Ca_i y Ca_o son las concentraciones de Ca^{2+} interna y externa respectivamente y k es la pendiente.

Para analizar la dependencia al voltaje de la activación de la I_{Ca} se calculó la conductancia mediante la ecuación de conductancia tomando en cuenta la fuerza impulsora (Ecuación 2)

$$G = I_{Ca}/(V_m - V_{inv})$$

Ecuación 2. Cálculo de Conductancia. Donde G es la conductancia, I_{Ca} es la corriente obtenida al pico, V_m es el potencial de membrana, V_{inv} es el potencial de inversión.

Los valores obtenidos fueron normalizados, graficados y ajustados con la ecuación de Boltzmann obteniéndose las curvas conductancia-voltaje (G-V) ver Ecuación 3.

$$G = G_{max}/(1 + \exp((V_{1/2} - V_m)/k))$$

Ecuación 3. De Boltzmann. Donde G es la conductancia, G_{max} es la conductancia máxima, V_m es el potencial de membrana, $V_{1/2}$ es el voltaje al cual se activa el 50% de la conductancia máxima y k es la pendiente de la relación.

Los datos de inactivación en el estado estacionario de los canales quiméricos se ajustaron con una función de Boltzmann con la siguiente ecuación (4):

$$I_{Ca} = I_{max}/(1 + \exp((V_{1/2} - V_m)/k))$$

Ecuación 4. Función de Boltzmann. Donde I_{Ca} es la corriente de Ca^{2+} , I_{max} es la corriente máxima, V_m es el potencial de membrana, $V_{1/2}$ es el voltaje al cual se activa el 50% de la conductancia máxima y k es la pendiente de la relación.

La cinética de activación e inactivación de las corrientes registradas fue analizada por separado usando una función exponencial (Ecuación 5), la constante de tiempo obtenida se usó para calcular una constante de tiempo ponderada, comparándose entre las diferentes condiciones experimentales.

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} + C$$

Ecuación 5. Función exponencial utilizada para el cálculo de la τ de activación e inactivación.

Todos los resultados se expresaron con el promedio \pm el error estándar (SEM) de los valores obtenidos en las células registradas.

La comparación entre las medias se hizo usando una prueba t de Student para muestras no pareadas, siendo significativas cuando el valor de P fue menor a 0.05.

RESULTADOS

A. Construcción del ADNc de los canales CRG12Ba y CRG12Bb.

Para la construcción del ADNc del canal CRG12Ba se utilizó como molde en una primera PCR, el canal quimérico G12B (clonado en el plásmido HE3-RG12Ba; Arias *et al.* 2005), en combinación con los oligonucleótidos A1GF1 (en sentido) y el GBR3 (en antisentido), obteniéndose un amplicón de 2054 pb.

A la par de esta reacción, usando como molde el ADNc del canal Cav2.2 (clonado en el plásmido pcDNA6V5/His-A1B) y los oligonucleótidos GBF1 (sentido) y el A1BR1 (antisentido, al cual se le agregó el sitio de corte de la enzima de restricción NotI en el extremo 5') se amplificó un fragmento adicional de 1930 pb.

Después se intentó la reacción de amplificación final donde ambos fragmentos de ADN amplificadas por la PCR o amplicones se empalmarían y extenderían, y de la cual se esperaba un fragmento de 3947 pb, no fue posible crearlo, a pesar de diversos intentos en el que se alteró la temperatura y/o se añadió DMSO para favorecer la hibridación de los amplicones (figura 11).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en el proyecto.

Canal quimérico	Molde	Nombre	Ubicación (a partir del codón de inicio) / secuencia
CRG12Ba	HE3-RG12Ba (Canal G12B)	A1GF1	2860pb, GAACGTGAGGCCAAGAGTTC
		GBR3	4877pb, GATCACAGCAACCAGGTGCTTCATCAGCACAG
	pcDNA6V5/His-A1B (Canal CaV2.2)	GBF1	4884pb, GATGAAGCACCTGGTTGCTGTGATCATGGA
		A1BR1	6776pb, GCGGCCGCTCAGCACCAGTGATCCTGGTCTG
CRG12Bb	HE3-RG12Ba (Canal G12B)	A1GF1	2860pb, GAACGTGAGGCCAAGAGTTC
		GBR2	4861pb, TTCGAAATTGTCCAGGTGCTTCATCAGCACAG
	pcDNA6V5/His-A1B (Canal CaV2.2)	GBF2	4871pb, TGAAGCACCTGGACAATTTCAATACCTCA
		A1BR2	6761pb, GCGGCCGCTCAGCACCAGTGATCCTGGTCTG

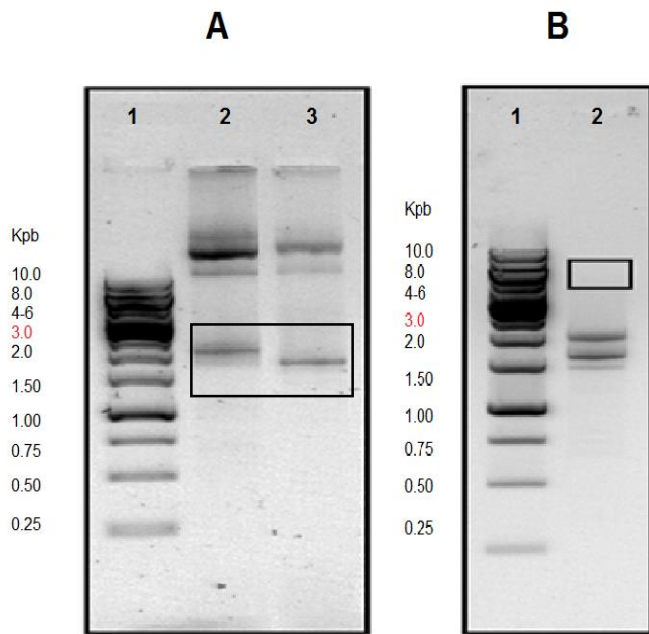


Figura 11. Electroforesis en geles de agarosa (0.8%) tenidos con bromuro de etidio, donde se muestran los productos de PCR utilizados. A) Amplificados (encerrados en el recuadro) de la primer y segunda PCR (1) Marcadores de peso molecular (MPM) para ADN de 1 Kpb, (2) Amplificado de 2054 pb usando como molde HE3-RG12Ba con los oligonucleótidos A1GF1 y GBR3, (3) Amplificado de 1930 pb, usando como molde pcDNA6V5/His-A1B con los oligonucleótidos GBF1 y A1BR1. B) Tercer reacción para hacer el empalme. (1) MPM de 1 Kpb (2) Producto no amplificado usando los oligonucleótidos A1GF1 y A1BR1, no se observa empalme esperado (recuadro), se observan los productos del gel en el panel A.

Para solucionar esto, cada amplificación se ligó al vector pJET1.2 Blunt, ya que al analizar sus secuencias de nucleótidos se detectó el sitio de corte para la enzima BclI (TGATCA). Se amplificó por transformación de *E.coli* Dam⁻/Dcm⁻ (cepa ER2925; New England Biolabs, MA, USA) los plásmidos pJET-A1GF1/GBR3 y pJET-GBF1/A1BR1 se cortaron con las enzimas BclI y ClaI, obteniéndose los fragmentos de 2095 pb y 4826 pb respectivamente, que después de su limpieza y purificación se ligaron entre sí creando el plásmido con el fragmento quimérico pJET-CRG12Ba (6971 pb; ver Figura 12 y 14).

El inserto en los plásmidos pJET-A1GF1/GBR3, pJET-GBF1/A1BR1 se secuenciaron y no se encontró ninguna mutación debida a las amplificaciones, por lo que se continuó con la construcción del ADNc con el marco de lectura del canal quimérico CRG12Ba descrita posteriormente.

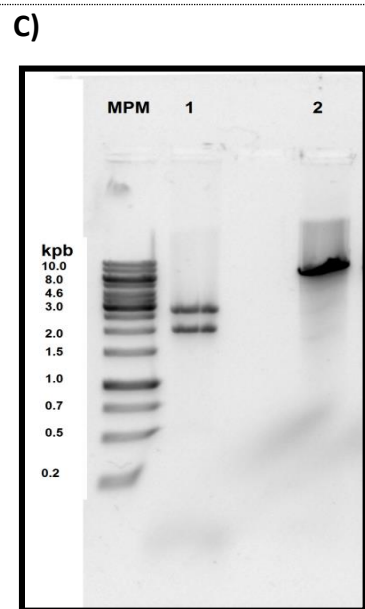
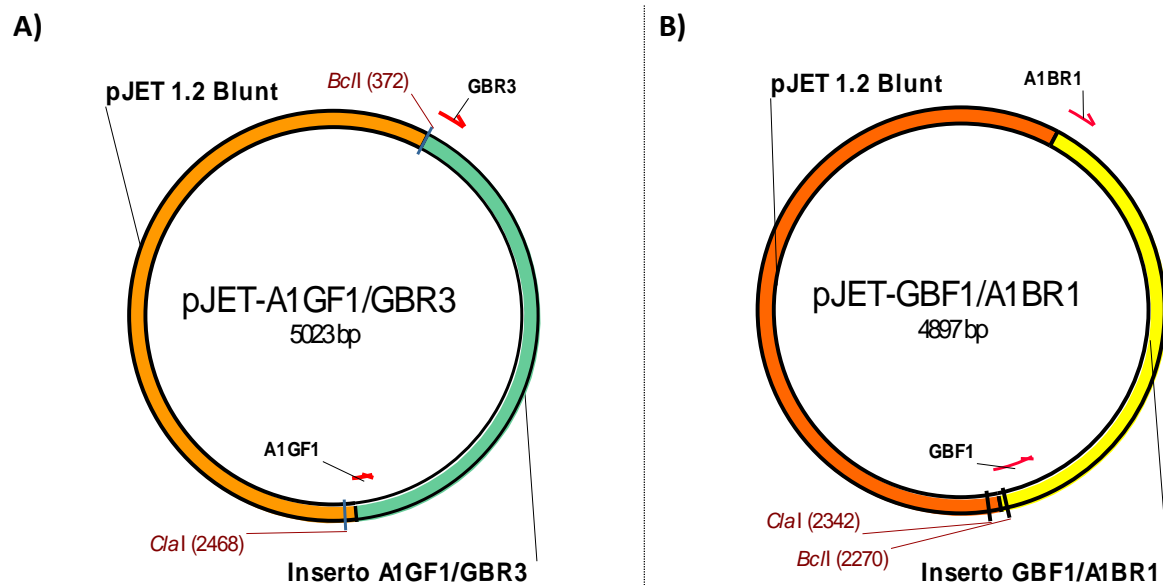
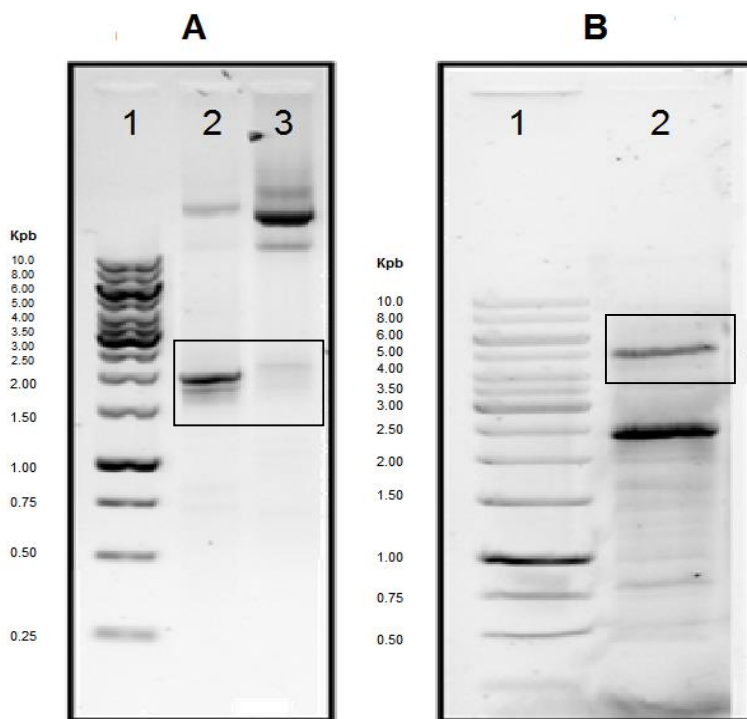


Figura 12. Obtención del fragmento quimérico del canal CRG12Ba. A) Representación esquemática del plásmido pJET-A1GF1/GBR3; se observa la ubicación de los sitios de corte de las enzimas BclI y ClaI, que al cortar liberan fragmentos de 2928 pb y 2095 pb. B) Representación esquemática del plásmido pJET-GBF1/A1BR1, al cortarlo con los sitios de corte de las enzimas BclI y ClaI, se generan fragmentos de 4826 pb visible y de 71 pb no detectable en una electroforesis. C) Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % tenido con bromuro de etidio: MPM, marcadores de peso molecular de 1 kpb; 1. bandas correspondientes al corte de pJET-A1GF1/GBR3; 2. banda correspondiente al corte de pJET-GBF1/A1BR1, ambos cortados con las enzimas de restricción BclI y ClaI. Todos los plásmidos tienen resaltado la ubicación de los sitios BclI y ClaI, utilizados para la creación de pJET-CRG12Ba.

Durante la construcción del segundo canal quimérico CRG12Bb, en la primer PCR, se utilizó como molde el plásmido HE3-RG12B, junto con los oligonucleótidos A1GF1 (en sentido) y GBR2 (en antisentido), del que se obtiene un fragmento de 2049 pb.

Mientras tanto usando como molde el plásmido pcDNA6V5/His-A1B (canal $Ca_v2.2$), con los oligonucleótidos en GBF2 (en sentido) y de nuevo el oligonucleótido en A1BR1 (en antisentido), se generó un amplificado de 1915 pb. A diferencia de la primera quimera CRG12Ba, después de hacer la amplificación por PCR para obtener la extensión del empalme, se obtuvo el segmento quimérico para el canal CRG12Bb de 3932 pb (Figura 13).



Previa limpieza y purificación, el fragmento del canal fue ligado al vector pJET1.2 blunt, denominándose pJET-CRG12Bb, al que después de la secuenciación de nucleótidos se le detectó la sustitución de un nucleótido que genera el sitio de corte para la enzima de restricción SpeI, además que detendría la traducción de la proteína al introducir un codón de paro 2 aminoácidos antes del correcto.

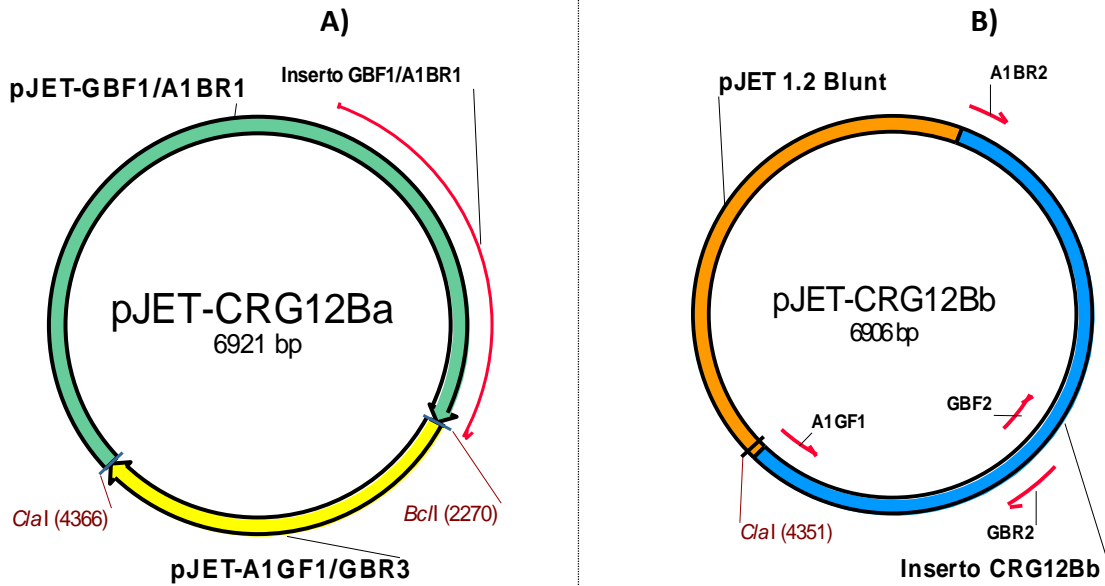


Figura 14. Representación esquemática de los plásmidos con los fragmentos quiméricos de los canales CRG12Ba y CRG12Bb. A) pJET-CRG12Ba; se observa la ubicación de los sitios de corte de las enzimas BclI y ClaI, utilizados para su creación; B) pJET-CRG12Bb, a diferencia del plásmido en A, no posee el sitio de corte de BclI.

En el laboratorio de electrofisiología, se hizo la transferencia del ADNc del canal G12B en el plásmido HE3-RG12Ba al plásmido HE4, contando con una construcción intermedia denominada ParHE4-RG12B (ver Figura 9), generada al cortar los plásmidos HE4 y HE3-RG12Ba con las enzimas de restricción EcoRI y NotI, ligándose únicamente los fragmentos de 5698pb y 2951pb, extraídos y purificados respectivamente de cada plásmido, y así completar el marco de lectura y generar el plásmido con el ADNc del canal G12B completo llamado HE4-RG12Ba, agregando la secuencia terminal de ADNc de HE3-RG12Ba entre el sitio de corte de la enzima NotI.

Aprovechando esta construcción parcial (plásmido ParHE4-RG12B), se cortaron de los plásmidos pJET-CRG12Ba o pJET-CRG12Bb la misma región entre los sitios de restricción EagI y NotI, corrigiendo la sustitución de nucleótidos al cortar del ADNc esa región e intercambiándola por la correspondiente del canal quimérico CRG12Ba que no tiene errores, esto sin alterar la región del empalme, confirmándose una vez más por análisis de restricción (Figura 15).

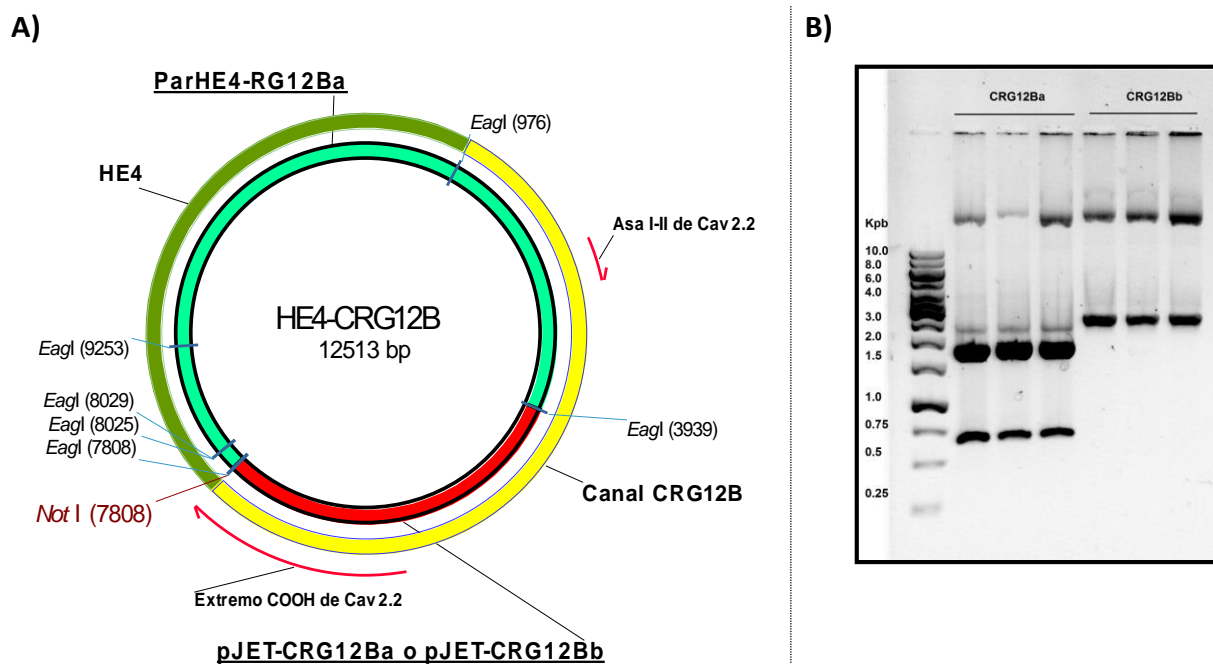


Figura 15. Generación del ADNc de los canales quiméricos CRG12Ba y CRG12Bb. A) Representación del plásmido que muestra la construcción del marco de lectura de los canales quiméricos a partir del plásmido ParHE4-RG12B (círculo interior en color verde), que inicialmente fue cortado con la enzima NotI al que se le introdujo la región correspondiente por separado de los plásmidos pJET-CRG12Ba o pJET-CRG12Bb entre los sitios de las enzimas EagI (3939 pb) y NotI (7808 pb), círculo interior en color rojo). El ADNc de los canales CRG12Ba y CRG12Bb se encuentra entre el sitio EagI (sitio 976) y NotI (sitio 7808; círculo exterior en amarillo). B) Electroforesis en gel de agarosa (0.8 %) teñida con bromuro de etidio de un fragmento de ADNc cortado por triplicado con la enzima BclI que demuestra la construcción y diferencia del marco de lectura de los canales CRG12Ba y CRG12Bb, debido a que uno posee el motivo VAVIM y el sitio de restricción BclI con lo que aparece una banda extra en el gel correspondiente al canal CRG12Ba).

B. Caracterización de las corrientes de Ca^{2+} .

Debido a que Arias y colaboradores (2005) reportaron la expresión y un primer análisis del canal G12B, su expresión en las células HEK 293T se usó como control positivo de la técnica de transfección del ADNc de los canales quiméricos creados, por lo que en cada experimento realizado se registraron al menos 2 células positivas a la GFP con el ADNc del canal RG12Ba sin la presencia de subunidades β , y solo si existían corrientes de Ca^{2+} se procedió a realizar los registros en las células transfectadas con el ADNc de los canales quiméricos CRG12Ba y/o CRG12Bb. Esto con el propósito de descartar que los efectos en la expresión de estos canales sean debido a problemas en la técnica de transfección.

Inicialmente se hizo el análisis cualitativo y cuantitativo del canal G12B, por lo que en la Figura 16 se muestra un registro representativo de la corriente de Ca^{2+} generada en una célula HEK-293T transfectada con el ADNc de la subunidad α_1 del canal G12B (plásmido HE4-RG12Ba), confirmando la expresión del canal G12B en la membrana de las células HEK-293T usadas como sistema de expresión.

A partir de estos registros se generó la gráfica llamada relación I-V, la cual indica una equivalencia que existe entre el voltaje aplicado (en mV) y la corriente obtenida (al valor máximo obtenido en cada registro medido en pA); a partir de esta gráfica se obtuvieron datos como el potencial de activación media ($V_{1/2}$), el potencial al que se alcanza el valor máximo de corriente ($I_{\text{máx}}$) y el potencial de membrana al cual se invierte la dirección de la corriente (potencial de inversión o V_{inv}), además se generó la gráfica llamada relación G-V, posterior al cálculo de la conductancia (en pS) para cada valor de voltaje explorado y así determinar la dependencia al voltaje de activación de acuerdo a las ecuaciones del apartado de Métodos.

Al graficar la corriente y la conductancia en dependencia al voltaje (gráficas de relación I-V y G-V de la Figura 16 respectivamente) después de ser normalizados y/o ajustados con la ecuación correspondiente (ver Métodos), se observa que el canal tiene en general el mismo comportamiento que el reportado previamente (Arias *et al.* 2005).

Además se comparan en la Tabla 3 una serie de características electrofisiológicas de los canales expresados en ese estudio y en el presente trabajo, lo cual confirma aún más la similitud de las propiedades biofísicas de los canales expresados en diferentes condiciones.

Al extraer la información de las curvas ajustadas se observa que la corriente generada por el canal G12B, empieza a detectarse a un potencial cercano a -70 mV, alcanzando su pico máximo a un potencial de -50 mV, mientras que, a voltajes más positivos la amplitud de la corriente disminuye y tiene un potencial de inversión (V_{inv}) cercano a +40 mV, además como se puede observar el curso temporal de la activación e inactivación se acelera conforme el valor de V_m aumenta (Figura 16D), generando un entrecruzado de los trazos de corrientes, típico de las corrientes tipo T correspondiendo a lo reportado por Arias y colaboradores en 2005.

Después de demostrar la expresión del canal G12B al transfectar con su ADNc las células HEK 293T se procedió a realizar en primer instancia el registro de las células positivas a GFP con el ADNc del canal CRG12Ba solo o en presencia de alguna subunidad auxiliar (β_{2a} o β_3) utilizando el mismo protocolo de pulsos despolarizantes, observándose que dicha construcción no fue capaz de generar corrientes entrantes de Ca^{2+} .

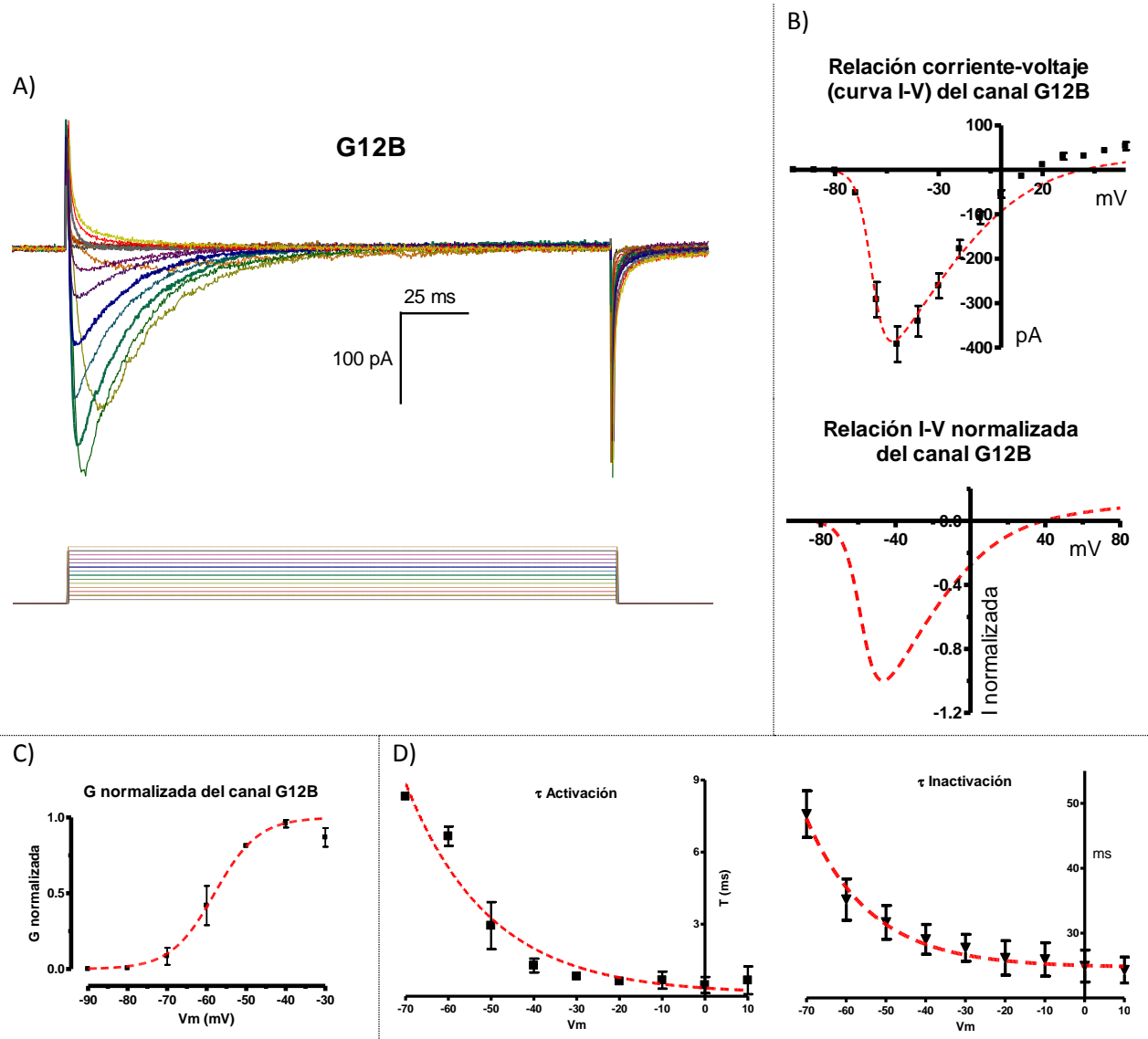


Figura 16. Propiedades electrofisiológicas del canal G12B, expresado en las células HEK 293T utilizado como control positivo y registrado en la modalidad de célula completa del “patch clamp”. A) Registro representativo de una célula HEK 293T transfectada por PEI; las corrientes se activaron por una serie de estímulos despolarizantes de -90 mV a $+80$ mV con incrementos de 10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV. B) Relación corriente-voltaje (I-V); la gráfica superior se elaboró con los datos directamente tomados de los registros, mientras que la gráfica inferior muestra el ajuste de datos utilizando la ecuación 1 descrita en el apartado de Materiales y Métodos. C) Curva de activación; la conductancia (G) se obtuvo para cada V_m utilizando la ecuación 2. D) Constantes de tiempo de activación (izquierda) e inactivación (derecha), para su cálculo se utilizó la ecuación 5.

Este efecto se observó en al menos 6 células por condición, mientras que a la par de estos experimentos en igual número de células siempre existió corriente de Ca^{2+} en las células transfectadas con el ADNc del canal G12B descartando problemas técnicos introducidos por la transfección con el ADNc (Figura 17).

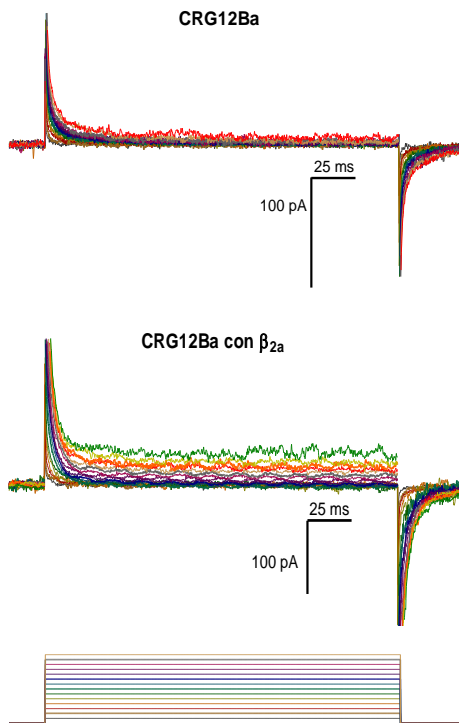


Figura 17. Registros representativos de dos células HEK 293T transfectadas con el ADNc del canal CRG12Ba, solo (registro superior) o en presencia de la subunidad β_{2a} (registro inferior); en ninguna célula se observa corriente de Ca^{2+} , efecto también detectado en presencia de la subunidad β_3 por lo que se omite su representación. Los registros se obtuvieron utilizando un protocolo con una serie de pasos despolarizantes de -90 mV a $+80$ mV con incrementos de 10 mV mostrado en la parte inferior.

Posteriormente se registró el canal CRG12Bb solo o en presencia de las subunidades β_{2a} o β_3 , observándose que sin la presencia de alguna subunidad no se generó corriente cuantificable ($n=5$ células), mismo efecto que se observa en presencia de la subunidad β_3 ($n=4$ células). Sin embargo en presencia de la subunidad β_{2a} fue posible registrar corrientes de Ca^{2+} ($n=5$ células; Figura 18 y 19).

A diferencia del canal CRG12Ba que no generó corrientes de Ca^{2+} en presencia de alguna subunidad β , es evidente que el canal CRG12Bb es cuantificable solo en presencia de la subunidad β_{2a} (Figura 18 y 19).

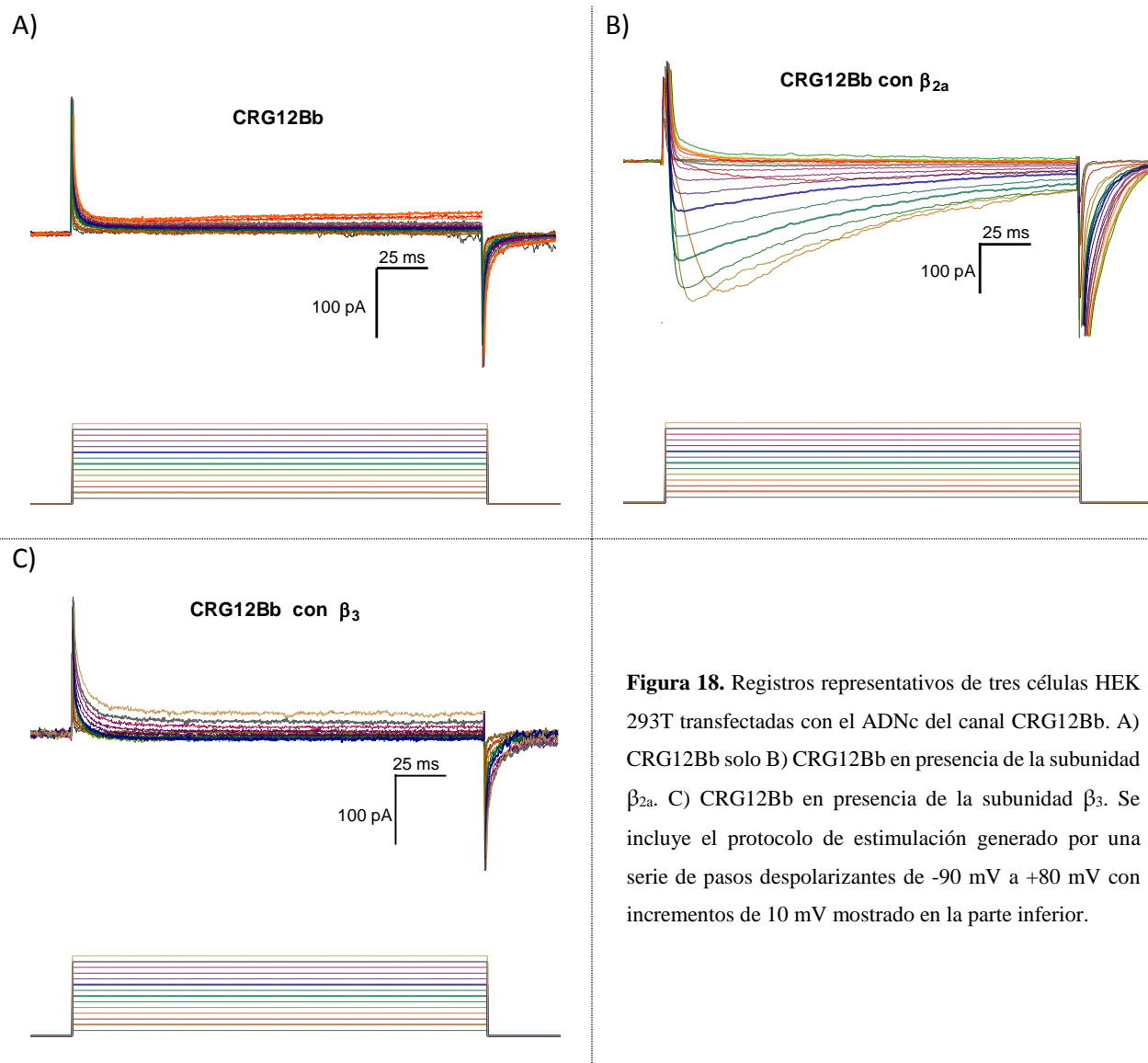


Figura 18. Registros representativos de tres células HEK 293T transfectadas con el ADNc del canal CRG12Bb. A) CRG12Bb solo B) CRG12Bb en presencia de la subunidad β_{2a} . C) CRG12Bb en presencia de la subunidad β_3 . Se incluye el protocolo de estimulación generado por una serie de pasos despolarizantes de -90 mV a +80 mV con incrementos de 10 mV mostrado en la parte inferior.

Las gráficas de la corriente y la conductancia en dependencia al voltaje (gráficas de relación I-V y G-V de la Figura 19 respectivamente) después de ser normalizados y/o ajustados con la ecuación correspondiente, muestran ciertas similitudes con el canal original G12B aunque también se observa que el canal CRG12Bb en presencia de la subunidad β_{2a} difiere en algunas propiedades que el reportado previamente por Arias y col en 2005.

Por ejemplo, se observa que la corriente generada por el canal CRG12Bb en presencia de la subunidad β_{2a} , empieza a detectarse a un potencial cercano a -70 mV, alcanzando su pico máximo a un potencial de -50 mV, mientras que, a voltajes más positivos la amplitud de la corriente disminuye y tiene un V_{inv} cercano a +40 mV, además como se puede observar el curso temporal de la activación e inactivación se acelera conforme el valor de V_m aumenta (Figura 18 y 19), generando un entrecruzado de los trazos de corrientes, típico de las corrientes tipo T, siendo estas características similares al reportado por Arias y col. en 2005 para el canal G12B

Esta primera observación se demuestra en la Figura 19 en la que presento el análisis “cuantitativo” de las corrientes de Ca^{2+} generadas por CR12Bb en presencia de la subunidad β_{2a} . Dicha comparación de los trazos de corrientes en el registro del canal G12B en ausencia de alguna subunidad β (Figura 16A), y el canal CRG12Bb en presencia de la subunidad β_{2a} (Figura 18B).

Se observan diferencias respecto a su cinética de activación e inactivación siendo aparentemente más rápida la inactivación en el primer canal al inactivarse totalmente durante el tiempo que dura el pulso (200 ms), no ocurriendo así en el canal CRG12Bb que a pesar de transcurrir el mismo tiempo en el registro no se ha inactivado totalmente, registrándose colas de corrientes “robustas” (ver Tabla 3 y Figuras 18 y 19).

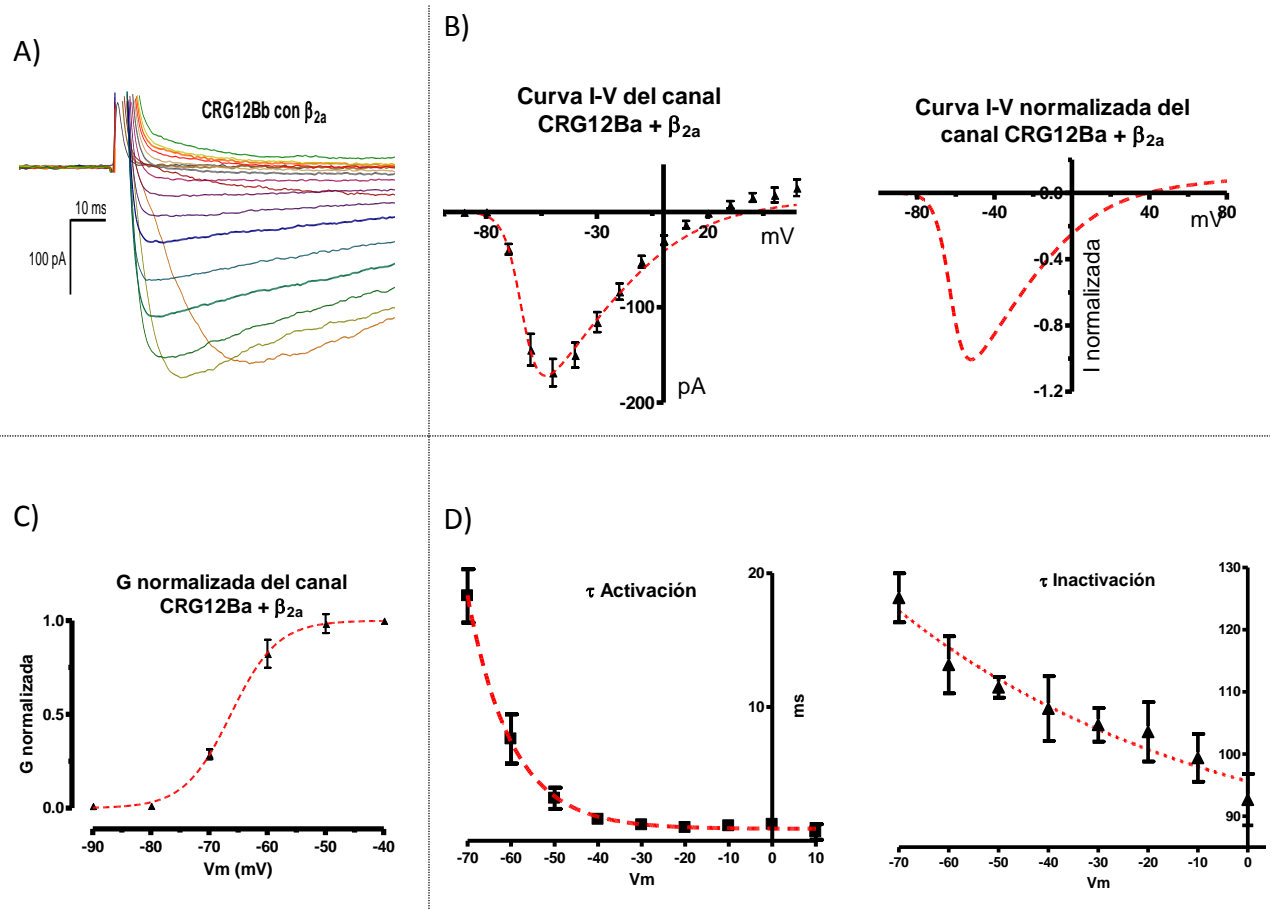


Figura 19. Propiedades electrofisiológicas del canal CRG12Bb en presencia de la subunidad β_{2a} , expresado en células HEK 293T, registrándose por método de célula completa. A) Registro representativo de una célula HEK 293T transfectada por PEI; las corrientes se activaron por una serie de estímulos despolarizantes de -90 mV a $+80$ mV con incrementos de 10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV, se muestran únicamente los primeros 50 ms del registro. B) Relación corriente-voltaje (I-V); la gráfica superior se elaboró con los datos directamente tomados de los registros, mientras que la gráfica inferior muestra el ajuste de datos utilizando la ecuación 1 descrita en el apartado de Materiales y Métodos. C) Curva de activación; la conductancia (G) se obtuvo para cada V_m utilizando la ecuación 2. D) Constantes de tiempo de activación (izquierda) e inactivación (derecha), para su cálculo se utilizó la ecuación 5.

A partir de las curvas y el análisis reportados en las Figuras 16 y 19, se realizó un resumen de las propiedades electrofisiológicas que son mostrados en la Tabla 3 acerca del canal G12B (solo) y el canal CRG12Bb en presencia de la subunidad β_{2a} , comparándose con las reportados por Arias y col. en 2005; se excluyeron los datos del resto de las condiciones (canal CRG12Ba solo o en presencia de alguna subunidad β , y del canal CRG12Bb solo o en presencia de la subunidad β_3), debido a que no se generaron corrientes cuantificables.

Tabla 3. Propiedades electrofisiológicas de los canales G12B y CRG12Bb. Se muestran los valores reportados en la literatura en (Arias *et al.* 2005) y los obtenidos en este estudio (2015).

	Canal G12B (2005)	Canal G12B (2015)	Canal G12B con β_{2a} (2005)	Canal CRG12Bb con β_{2a} (2015)
1) Densidad de Corriente (pA/pF)**	24 ± 3	27.7 ± 4.6	24 ± 3	18 ± 4
2) Umbral de activación (mV)	~ -70.0	~ -70.0	~ -70.0	~ -70.0
3) Pico de corriente (pA)	-50.0	-50.0	-50.0	-50.0
4) V_{inv} (mV)	~40.0	~40.0	~40.0	~40.0
5) $G_{m\acute{a}x}$ (pS)*	33 ± 6	37.65 ± 6.8	24 ± 3	3.9 ± 0.6
6) V_{50} de activación	-63.1 ± 0.7	-60.43 ± 4.02	-69.8 ± 0.8	-64.96 ± 1.3
7) k de activación (mV)	4.3 ± 0.2	3.06 ± 0.5	4.4 ± 0.1	3.6 ± 0.4
8) τ activación (ms)**	No reportado	0.62 ± 0.1	No reportado	0.98 ± 0.1
9) τ inactivación (ms)**	No reportado	26.16 ± 2.7	No reportado	103.57 ± 4.7
*Los datos se representan a un V_m de -40 mV. ** Los datos se representan a un V_m de -20 mV.				

DISCUSIÓN

Los canales Ca_v del tipo HVA son complejos multiprotéicos (multiméricos) que permiten el paso de Ca^{2+} al interior de las células en respuesta a cambios en su V_m . Estos canales intervienen en procesos fisiológicos de vital importancia para las células, no obstante los aspectos fundamentales de su estructura y/o función continúan sin ser entendidos cabalmente, en particular en lo concerniente a la regulación de las subunidades α_1 por las subunidades β .

Actualmente se cuenta con información que describe algunos puntos importantes en la regulación de este tipo de canales, iniciando desde la ubicación del sitio principal donde se acoplan ambas subunidades (en la unión AID-ABP), hasta algunos de los efectos en las propiedades electrofisiológicas y/o farmacológicas (Catterall 2011; Buraei 2010; Arias 2005; Fang y Colecraft 2011).

Con el apoyo de técnicas de biología molecular y de electrofisiología, se ha determinado que las subunidades β afectan la cinética de activación dependiente del voltaje acelerándola, siendo menos evidente en canales neuronales, desplazando la activación de -5mV a -25mV; a su vez las subunidades β afectan la cinética de inactivación acelerándola o enlenteciéndola, en el caso de la inactivación dependiente del voltaje las subunidades β_1 , β_3 y β_4 la hiperpolariza mientras que la subunidad β_{2a} la despolariza (Buraei *et al.* 2010).

Además uno de los efectos evidentes es que las subunidades β permiten la expresión en la membrana celular de los canales Ca_v de alto umbral (HVA), incrementándola dramáticamente. Esto se ha observado en sistemas de expresión heterólogos, coexpresando las cuatro isoformas de las subunidades β , en presencia de las subunidades α_1 de canales tipo HVA (Buraei *et al.* 2010). No obstante, los efectos dependen en gran medida de la combinación de subunidades involucradas.

Trabajos similares al presente estudio, encaminados a definir con mayor detalle la interacción entre la subunidad α_1 y β , y sus efectos sobre la expresión y/o regulación de los canales Ca_v del tipo HVA, han mostrado la importancia que tienen las asas intracelulares, los extremos amino y/o carboxilo, permitiendo establecer algunas áreas en ambas subunidades con funciones características (Fang y Colecraft 2011; Arias *et al.* 2005).

Expresión de los canales CRG12Ba y CRG12Bb.

El resultado que fue evidente en primera instancia para los canales quiméricos CRG12Ba y CRG12Bb fue en su expresión. Inicialmente, al realizar los registros del canal CRG12Ba solo o en presencia de alguna subunidad β analizada, el resultado fue la nula generación de corrientes de Ca^{2+} (Figura 16), mientras que el canal CRG12Bb tuvo el mismo efecto bajo dos condiciones, el canal solo y en presencia de la subunidad β_3 , resaltando que en presencia de la subunidad β_{2a} existió una corriente cuantificable, con propiedades electrofisiológicas discutidas posteriormente (Figura 19).

Se sabe que las proteínas se trasladan desde los ribosomas donde fueron sintetizados, hacia sitios diferentes en la célula para desempeñar sus funciones específicas. Algunas de ellas están destinadas a ser componentes de organelos específicos mientras que otras permanecen en el citoplasma. Además, existen las que se exportan fuera de la célula, o como el caso de los canales Ca_v , estarán ubicados en las diversas membranas celulares. Una expresión correcta de las proteínas de membrana como los canales Ca_v implica diversos procesos previos como la síntesis de los péptidos de las subunidades involucradas, el acople de ellos, el traslado hacia la membrana y el adecuado plegamiento de los dominios y/o segmentos transmembranales, y solo al pasar estos procesos se observaría un canal funcional.

De forma general, la expresión de la subunidad α_1 de los canales Ca_v en la membrana plasmática inicia con la síntesis del ARNm a partir del gen involucrado, seguida de su traducción en una proteína que tiene que ser plegada adecuadamente de acuerdo a la topología del canal en el retículo endoplásmico y solo así sería exportada a la membrana para activar la función específica (Catterall, 2011).

En resumen, las proteínas de las subunidades α_1 de los canales Ca_v poseen en su secuencia de aminoácidos diversas señales que tienen una primera función durante su síntesis en el ribosoma, que incluyen desde su direccionamiento hacia el retículo endoplásmico hasta el correcto plegamiento y/o la exportación hacia la membrana plasmática. Estas señales son detectadas por proteínas específicas con la función de dirigir las hacia su destino en la célula; de esta forma se asegura que terminarán en la membrana plasmática o en el organelo celular apropiado. Estas secuencias son un componente fundamental del sistema de direccionamiento y plegamiento en las células (Murray *et al.* 2010).

Existen diversos estudios que describen el rol de estas señales dentro de la subunidad α_1 de los canales Ca_v del tipo HVA involucrados en la expresión en la membrana plasmática, regulando tanto la cantidad de canales como su ubicación en ella. Por un lado, al hacer estudios donde elaboraron proteínas de fusión del canal α_{1S} con GFP, resulta que se requiere de la interacción de la subunidad α_1 con la subunidad β para que el complejo se localice en la membrana sarcoplásmica; la explicación que se maneja es que la subunidad α_1 posee una señal de retención en el retículo endoplásmico (SRRE) presente en el asa I-II, señal que es ocultada en el momento en que la subunidad β se acopla al AID (Bichet *et al.* 2000).

Por otro lado, se observó que existen SRRE ajenas al asa I-II en los extremos amino y carboxilo del canal $Ca_v2.1$, ya que al eliminar alguna de estas regiones se observa retención del canal en el retículo endoplásmico, evitando su expresión en células COS7 (Cornet *et al.* 2002).

Previo a este trabajo existen reportes donde infieren un papel del extremo carboxilo en la expresión de los canales Ca_v , por ejemplo, en canales $\text{Ca}_v1.1$ se identificó una señal de localización presente en la secuencia con una longitud de 55 aminoácidos en la región cercana al segmento IVS6 del extremo carboxilo. Esta señal tiene la función de localización en la membrana plasmática en fibras musculares; este resultado fue similar en la expresión de los canales $\text{Ca}_v1.2$ independientemente de la subunidad β expresada (Gao *et al.* 1999; Flucher *et al.* 2000).

Con estos datos se propuso inicialmente que el asa I-II y los extremos amino y carboxilo de los canales HVA forman una estructura de retención en el retículo endoplásmico, que requiere que la unión con la subunidad β bloquee las diversas señales de retención o de localización existentes en ellas (Cornet *et al.* 2002), y que de este modo la proteína pueda ser exportada del retículo endoplásmico y llegar a la membrana plasmática.

La diferencia entre los canales CRG12Ba y el CRG12Bb es la presencia o ausencia de 5 aminoácidos (VAVIM), ubicados justamente al final del segmento IVS6, y sin embargo esta diferencia tuvo un gran efecto al hacer a un canal funcional y al otro no. Con esta información se discute que el efecto por parte del canal CRG12Ba puede deberse a que la modificación del extremo carboxilo con los 5 aminoácidos extras, genera un canal que no se expresa en la membrana plasmática aunque una posibilidad alternativa se plantea posteriormente.

¿Qué nos hizo suponer lo anterior? Por un lado, la unión entre las subunidades α_1 y β es un fenómeno específico, que debe llevarse a cabo mediante la unión no covalente en sitios específicos dentro de los canales Ca_v del tipo HVA para que haya expresión en la membrana plasmática (Catterall 2011, Arias *et al.* 2005), esto mediante la oclusión de señales que posee en sus secuencias las subunidades α_1 (Bichet *et al.* 2000). Por otro lado, durante el plegamiento de los canales Ca_v las estructura secundaria principal en los segmentos transmembranales que adoptan cuando son funcionales son las α -hélice (Murray *et al.* 2010; Eisenberg, 2007).

De acuerdo a trabajos anteriores los 5 aminoácidos extra (VAVIM) en el canal CRG12Ba se pliegan formando justamente una estructura en α -hélice (Raybaud *et al.* 2007; ver Figura 20). Desde hace más de 50 años se sabe que por el ángulo de los enlaces y la longitud de los aminoácidos, se necesitan al menos 3.7 de ellos para generar una vuelta en esta estructura (Eisenberg, 2007), posiblemente generando que los aminoácidos extra (1.3 para ser específicos) alteren el ángulo de torsión de todo el extremo carboxilo del canal CRG12Ba, alejando el sitio de interacción en el extremo carboxilo del canal CRG12Ba y el sitio de interacción en las subunidades β . Entonces, el ocultamiento de los sitios de retención pudo no haberse dado, obteniendo como resultado que el canal no se exprese en la membrana y por ende no se registre ninguna corriente concordando con lo observado.

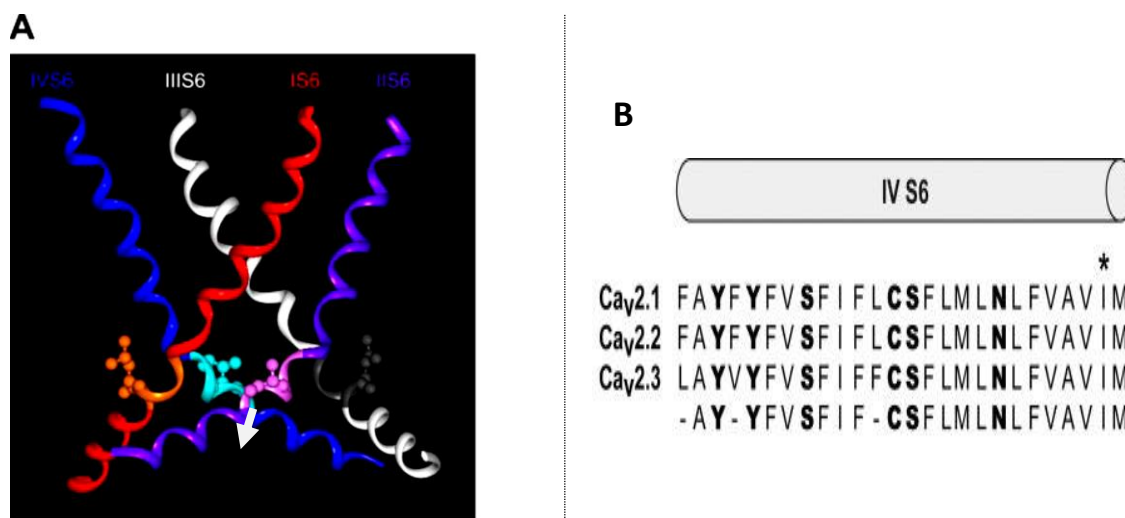


Figura 20. Modelo molecular hecho por computadora de los segmentos S6 en Cav2.3 usando el coordinado molecular de Kv1.2 y la estructura secundaria del motivo VAVIM en canales Cav2. A) Modelo molecular de la región del poro: se muestra IS6 en rojo, IIS6 en violeta, IIIS6 en blanco y IVS6 en azul sin el filtro de selectividad y la hélice del poro, representado en forma de cintas. La figura fue producida usando INSIGHT (Accelrys), se observa en azul turquesa la región correspondiente al motivo VAVIM señalada mediante una flecha, que forma una estructura en α -hélice. B) Alineamiento de secuencias de canales Cav2 del segmento IVS6: se muestra en negritas los aminoácidos conservados, finalizando se encuentra el motivo VAVIM, en la parte superior se encuentra un cilindro con el que el autor esquematizo un α -hélice generada por diversos análisis computacionales (modificado de Raybaud *et al.* 2007).

Esto también explica el efecto visto a su vez en el canal CRG12Bb, debido a que inicialmente el canal RG12Ba posee el extremo del canal Cav3.1, que no necesita de las subunidades β para expresarse, mientras que al sustituir por el respectivo segmento del canal Cav2.2 le generamos la necesidad de ocultar las señales de retención en retículo endoplásmico presentes en el extremo carboxilo, explicando porque el canal no genera corrientes sin la presencia de alguna subunidad β , en contraste con el efecto cuantificable por la subunidad β_{2a} (Figura 18 y 19).

El efecto reportado por el mismo canal en presencia de la subunidad β_3 , donde tampoco hay corrientes detectables, puede que haya sido a causa de efectos intrínsecos, debido a las diferencias estructurales que las subunidades β_1 , β_3 y β_4 tienen respecto a la subunidad β_{2a} (Buraei *et al.* 2010).

Una primera idea discutida hasta ahora que explica la nula generación de corrientes de Ca^{2+} por parte de los canales CRG12Ba y CRG12Bb (solo o en presencia de la subunidad β_3), fue que debido a componentes estructurales presentes en el extremo carboxilo como las señales de retención en el retículo endoplásmico, estos simplemente no se expresaron en la membrana plasmática. Sin embargo, otro acontecimiento que pudo ocurrir es que los canales llegaron a la membrana pero, y en especial el canal CRG12Ba, no resultaron funcionales.

Activación en los canales Cav

Existe un extraordinario progreso para conocer la estructura de los canales iónicos, incrementado nuestro entendimiento de las propiedades de su selectividad iónica, conductancia, y la activación e inactivación o "*gating*", entre otros temas. Actualmente se conoce que el poro en los canales Cav está formado por los segmentos S5 y S6 de los cuatro dominios que conforman la subunidad principal α_1 , y que el asa que los conecta se pliega hacia dentro del poro formando el filtro de selectividad, que es un camino estrecho que determina el ión que pasa a través del poro.

En la parte intermedia del poro los cuatro segmentos S6 forman un vestíbulo interno, limitado por un pasaje estrecho que puede ser abierto únicamente cuando el canal es activado (Elinder *et al.* 2007).

El *gating* o la apertura y cierre en los canales iónicos, es un proceso complejo en el que las proteínas que integran a los canales Cav , generan cambios en su conformación que permiten que fluya el ión Ca^{2+} hacia el interior de la célula. A grandes rasgos, el proceso se inicia con un movimiento de los segmentos S1 a S4 debido a un cambio en el Vm (identificado como dominio sensor de cambios en el Vm), seguido del movimiento en la totalidad del segmento S5 y S6, que generaría que por el poro puedan transitar los iones (Catterall, 2011; Elinder *et al.* 2007).

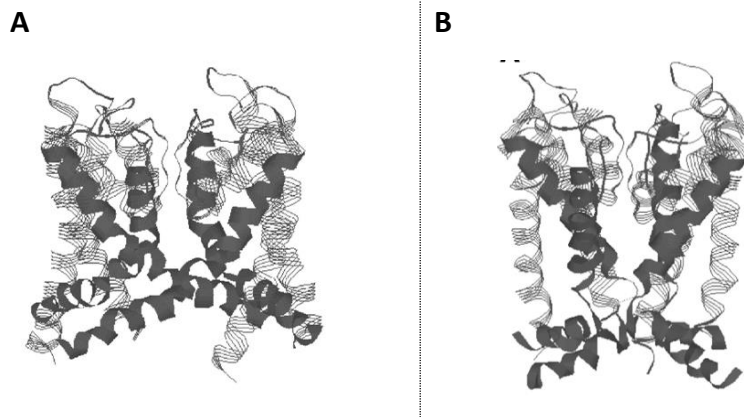



Figura 21. Estructura tridimensional representativa de A) bisagra de Glicina y B) curva PVP. Modelos homólogos del canal $Kv1.5$. Modificado de Elinder *et al.* 2007.

Se han expuesto dos modelos para explicar la apertura de los canales iónicos, esto a partir de la cristalización de canales de K^+ : el primer modelo es el de la *bisagra de glicina* es mostrado con un canal con una gran entrada, causada por un doblez en la estructura del segmento S6, donde el punto de pivote o doblez, está ubicado en un aminoácido altamente conservado glicina (G) cercano al filtro de selectividad (Figura 21A); posteriormente se descubrió una secuencia de tres aminoácidos Pro-Val-Pro (PVP) altamente conservada, que generan en conjunto un doblez en el segmento S6 ubicado al final del vestíbulo (curva PVP), que a diferencia de la bisagra de glicina parece estar involucrado tanto en la apertura como en el cierre de los canales (Figura 21B; Elinder *et al.* 2007).



La subunidad α_1 de los canales Ca_v están relacionados en su estructura a la correspondiente de los canales K_v , esto a pesar que solo poseen entre ellos del 10 al 25% de similitud; estructuralmente generan un vestíbulo interno que fue inferido desde la estructura cristalina de los canales $KcsA$, $MthK$, K_vAP , K_{irBac} y $K_v1.2$, donde los segmentos transmembranales M2/S6 forman la compuerta de activación que controla la apertura del canal.

Al estudiar la importancia funcional de los aminoácidos del segmento S6 en el canal $Ca_v2.3$, se encontró una secuencia de 5 aminoácidos hidrofóbicos –VAVIM–, altamente conservada en los canales Ca_v del tipo HVA, localizados al final del segmento IVS6.

Por otro lado, numerosos algoritmos alinean la secuencia PVPIV involucrada en la apertura y cierre en los canales K_v con los aminoácidos FVAVIM (50% de identidad) de los canales Ca_v del tipo HVA, sugiriendo que esta región juega un rol en la activación e inactivación de los canales Ca_v , al tener la función propuesta para el motivo PVP (Elinder *et al.* 2007; Raybaud *et al.* 2007).

Sin embargo, la curva en el segmento IVS6 generada por los aminoácidos del motivo VAVIM le otorga estabilidad al canal, tanto en el estado abierto como en el cerrado (Raybaud *et al.* 2007).

Desde el momento en que se diseñaron los canales CRG12Ba y CRG12Bb, se partió del conocimiento que la funcionalidad de un canal depende en forma resumida de una correcta expresión en la membrana plasmática y de un adecuado plegamiento en ella.

De acuerdo con autores como Raybaud y col. en 2007, se partió del hecho que el motivo VAVIM genera un control crítico de la estabilidad de la estructura de los estados abierto y cerrado de los canales; incluso estos residuos hidrofóbicos promueven mayormente el estado cerrado.

Partiendo que esta estructura solo se identificó en los canales Ca_v del tipo HVA, debe existir una secuencia homóloga en los canales del tipo LVA que tenga la función de dar estabilidad en la apertura/cierre de los canales, por lo que al agregar esta secuencia de 5 aminoácidos con una función extra se favorece que el canal no genere corriente iónica debido a la conformación obtenida, explicando de este modo porque el canal CRG12Ba no generó ninguna corriente. En el caso del Canal CRG12Bb, se respeta la estructura de apertura/cierre del canal al no agregar una secuencia extra. Entonces, el efecto observado no depende de esta secuencia VAVIM, sino de todo el extremo carboxilo.

Inactivación en los canales Ca_v

Al parecer el tiempo que permanece activo un canal Ca_v , comenzando el proceso de inactivación, depende de estructuras internas creadas por secuencias de aminoácidos específicos mediante la unión de proteínas reguladoras (Arias-Olguín *et al.* 2008; Arias *et al.* 2005, Arikath *et al.* 2003). El proceso de inactivación es sujeto de un número considerable de estudios, en donde se pretende exponer la relación que existe entre la estructura secundaria que describe la topología de los canales y su función en la inactivación, llevándose a cabo principalmente en los canales operados por voltaje de Na^+ o de K^+ (Catterall, 2011).


Debido a esto, es posible encontrar una mejor caracterización de las estructuras moleculares involucradas en esos canales, contrario a lo que sucede para el caso de los canales Ca_v . Para algunos canales operados por voltaje de Na^+ y K^+ , se han identificado dos tipos de inactivación: en primer plano se encuentra la generada por un único motivo responsable de formar una partícula inactivante que define el tipo de inactivación tipo N; y en segundo plano la generada por el movimiento de los segmentos S6 o TM2 que bloquean el vestíbulo y que describen la inactivación tipo C.

En el caso particular de los canales Ca_v , existen diferencias entre los diferentes tipos de canales. En los canales HVA, las regiones que participan en el proceso de inactivación son los segmentos S6 de los dominios II, III y IV, el asa I-II y los extremos amino y/o carboxilo (Berjukow *et al.* 2001; Berrou *et al.* 2001), mientras que en el tipo LVA el proceso de inactivación incluye el segmento III S6, el dominio IV, las asas I-II y III-IV, el filtro de selectividad y el extremo carboxilo (Arias-Olguin *et al.* 2008; Murbartian *et al.* 2002).

Refiriéndose a los resultados obtenidos, después que el canal CRG12Bb en presencia de la subunidad β_{2a} , se expresó en la membrana plasmática a consecuencia de su unión con la subunidad β , es evidente que el intercambio del extremo carboxilo tuvo un efecto en la cinética de inactivación (ver Figura 19 y Tabla 4), haciéndonos pensar que dicho extremo carboxilo está involucrado en el cierre del canal durante la inactivación.

En primera instancia se discutió el efecto debido a la expresión de los canales CRG12Ba y CRG12Bb, debido a que fue evidente que no se presentó corriente de Ca^{2+} cuantificable. Sin embargo, este efecto en el canal CRG12Ba pudo deberse además del ya expuesto a que la alteración ocasionada, ajustó la dependencia al voltaje de activación o inactivación, trasladándolos a un potencial más negativo que el potencial de mantenimiento utilizado en el protocolo (-100 mV), por lo que la mayoría de canales podrían estar inactivados en la membrana plasmática.

Al tratar de explicar con la idea anterior el efecto sobre el canal CRG12Bb, cuya generación de corriente fue resultado de la combinación específica con la subunidad β_{2a} , resulta que el desplazamiento al voltaje de activación e inactivación es un efecto atribuido a las 4 isoformas, y que por lo regular es un efecto hiperpolarizante de -4 hasta -12 mV. No obstante, en el caso de la subunidad β_{2a} el efecto es despolarizante (Buraei *et al.* 2010). Entonces probablemente el potencial de mantenimiento utilizado haya entrado dentro del intervalo de activación del canal.



Por otro lado hay fuerte evidencia que sostiene el papel del extremo carboxilo en la cinética de inactivación de los canales Ca_v . Por ejemplo, la sustitución del extremo carboxilo del canal $Ca_v3.3$ por el correspondiente al canal $Ca_v3.1$ genera un canal con una cinética de inactivación más lenta (Kang *et al.* 2008); además se observa el mismo efecto de disminución de la cinética de inactivación en el caso de sustituir en $Ca_v3.1$ la región proximal del extremo carboxilo de un canal HVA regulado por las subunidades β (canal $Ca_v1.2$; Staes *et al.* 2001), efectos que corresponden con lo observado por parte del canal CRG12Bb cuando se puso en presencia de la subunidad β_{2a} , confirmando que el extremo carboxilo del canal $Ca_v2.2$ está involucrado en la propiedades de inactivación del canal.

Entonces hasta ahora los efectos que podemos atribuir al extremo carboxilo de la subunidad α_1 del canal $Ca_v2.2$, en la regulación de las propiedades biofísicas dadas por las subunidades β , son en la cinética de inactivación, junto al de la expresión en la membrana.

CONCLUSIONES.

Finalmente a partir de los resultados y de la discusión podemos concluir:

1. El ADNc del canal CRG12Ba no genera corrientes de Ca^{2+} cuantificables solo o en presencia del ADNc de la subunidad β_{2a} o β_3 en el sistema de células HEK 293T.
2. El ADNc del canal CRG12Bb solo genera corrientes en presencia del ADNc de la subunidad β_{2a} .
3. El extremo carboxilo del canal $\text{Ca}_v2.2$ está involucrado en la funcionalidad del canal al estar relacionado en la expresión de la subunidad α_1 en la membrana plasmática.
4. El extremo carboxilo del canal $\text{Ca}_v2.2$ está implicado en la funcionalidad del canal al estar involucrado en la regulación de propiedades de la apertura y cierre del canal.
5. Es necesario llevar a cabo experimentos adicionales que permitan enfocar el entendimiento acerca de las interrogantes surgidas a partir de los resultados (ver Perspectivas).

PERSPECTIVAS DEL TRABAJO.

La información previa sostiene ideas que explican porque los canales CRG12Ba y CRG12Bb tuvieron el comportamiento reportado en el apartado de los resultados. Sin embargo, es importante mencionar que con los experimentos realizados a la fecha no es posible establecer si estas ideas o deducciones son las correctas. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo estudios adicionales que nos permitan establecer qué sucedió con estos canales, ya sea evaluando cambios en su dependencia al voltaje o alteraciones en su expresión, procesamiento y tráfico.

Experimentos sobre la expresión: Existen diversas herramientas metodológicas que nos podrían explicar el nivel alcanzado por los canales CRG12Ba y/o CRG12Bb bajo las condiciones experimentales que no generaron corrientes de Ca^{2+} cuantificables mediante la técnica de *patch clamp*.

- A) Uso de proteínas de fusión, inmunología y/o técnicas de fluorescencia
- B) Variación al protocolo e incluso de configuración de la técnica del *patch clamp*.

Experimentos sobre la apertura y el cierre (gating): Asumiendo que los canales se expresen en la membrana plasmática de las células HEK 293T, el movimiento del sensor del voltaje debe estar intacto en los canales CRG12Ba y/o CRG12Bb, por lo que el análisis de las corrientes de compuerta (“gating currents”) proveería una herramienta excelente para comparar las propiedades biofísicas de los canales silvestres y quiméricos (Hamill et al., 1981). En este sentido, es necesario llevar a cabo estudios más detallados en los cuales se elimine por partes el extremo carboxilo, permitiendo identificar qué región(es) dentro de esta estructura son fundamentales para la unión con las subunidades β , su posible interacción con otros elementos necesarios para regular su expresión, procesamiento y tráfico hacia la membrana plasmática, y/o para determinar sus propiedades biofísicas.

LITERATURA CITADA

- Arias J.M., Murbartian J., Vitko I., Lee J.H. y Perez-Reyes E. 2005. Transfer of β subunit regulation from high to low voltage-gated Ca^{2+} channels. FEBS Lett. 3907-3912.
- Arias-Olguin II. 2009. El estudio de la relación estructura-función de los canales de calcio dependientes de voltaje CaV3 (Conocidos como canales tipo T o LVA). Tesis de doctorado. UNAM.
- Arias-Olguin II., Vitko I., Fortuna M., Baumgart J.P., Sokolova S., Shumilin I.A., Van Deusen A., Soriano-García M., Gomora J.C., Perez-Reyes E. 2008. Characterization of the gating brake in the I-II loop of Ca(v)3.2 T-type Ca(2+) channels. J Biol Chem. 283:8136-44.
- Arikath J. y Campbell K.P. 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. Curr Opin Neurobiol 13, 298-307.
- Bae J., Jin S.E., Lee C. 2010. Interaction of T-type calcium channel CaV3.3 with the beta subunit. Mol and cells. 30, 3. 185-191.
- Bech-Hansen N.T., Naylor M.J., Maybaum T.A., Pearce W.G., Koop B., Fishman G.A., Mets M., Musarella M.A., Boycott K.M. 1998. Loss-of-function mutations in a calcium-channel $\alpha 1$ -subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. Nat. Genet. 19, 264-267.
- Berjukow S., Marksteiner R., Sokolov S., Weiss R.G., Margreiter E., Hering S. 2001. Amino acids in segment IVS6 and beta-subunit interaction support distinct conformational changes during Cav2.1 inactivation. J Biol Chem. 276:17076-82
- Berrou L., Bernatchez G., Parent L. 2001. Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of $\alpha 1E$ (Cav2.3) calcium channels. Biophys J. 80:215-28
- Bichet D. 2000. The I-II loop of the Ca^{2+} channel $\alpha 1$ subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. Neuron. 25. 177-190.
- Bidaud I., Mezghrani A., Swayne L. A., Monteil A., Lory P. 2006. Voltage-gated calcium channels im genetic diseases. Biochimica et biophysica Acta 1763. 1169-1174.

-
-
- Biel M., Ruth P., Bosse E., Hullin R., Stuhmer W., Flockerzi V., Hofmann F. 1990. Primary structure and functional expression of a high-voltage activated calcium channel from rabbit lung. *FEBS Lett.* 269, 409-412.
 - Borsotto M., Barhanin J., Fosset M., Lazdunski M. 1985. The 1,4-dihydropyridine receptor associated with the skeletal muscle voltage-dependent Ca^{2+} channel. Purification and subunit composition. *J. Biol. Chem.* 260: 14255-14263.
 - Buraei Z., Yang J. 2010. The beta subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Physiol. Rev.* 90. 1461-1506
 - Catterall W.A. 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:1-23.
 - Catterall W.A. y Few AP. 2008. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 59: 882–901.
 - Catterall W.A. 1991. Excitation-contraction coupling in vertebrate skeletal muscle: A tale of two calcium channels. *Cell* 64: 871–874.
 - Chanda B. y Bezanilla F. 2008. A common pathway for charge transport through voltage-sensing domains. *Neuron* 57, 345-51.
 - Chang S.S., Grunder S., Hanukoglu A., Rösler A., Mathew P.M., Hanukoglu I., Schild L., Lu Y., Shimkets R.A., Nelson-Williams C., Rossier B.C. y Lifton R.P. 1996. Mutations in subunits the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nature Genet.* 12, 248-253.
 - Chen R.S., Deng T.C., García T., Sellers Z.M., Best P.M. 2007. Calcium channel γ subunits: a functionally diverse protein family. *Cell Biochem.* 47: 178-186.
 - Chen Y.H., Li M.H, Zhang Y., He L.L., Yamada Y., Fitzmaurice A., Shen Y., Zhang H., Tong L., Yang J. 2004. Structural basis of the α_1 - β subunit interaction of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Nature.* 429: 675-680.
 - Choe, S. 2002. Potassium channel structures. *Nat Rev Neurosci* 3, 115-21.
 - Cornet V. 2002. Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum. *Eur. J. Neurosci.* 16. 883-895.
-
-

-
- Crozier I.G., Loughnan A., Dow L.J., Low C.J., Ikram H. 1989. Congenital long QT syndrome in adults. *N Z Med J.* 102: 340-1.
 - Cribbs L.L., Lee J.H., Yang J., Satin J., Zhang Y., Daud A., Barclay J., Williamson M.P., Fox M., Rees M., Perez-Reyes E. 1998. Cloning and characterization of $\alpha 1H$ from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family. *Circ. Res.* 83, 103-109.
 - Curtis B.M. y Catterall W.A. 1984. Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 23, 2113-2118.
 - De Waard M, Scott V.E.S, Pragnell M. y Campbell K.P. 1996. Identification of critical amino acids involved in $\alpha 1$ - β interaction in voltage-dependent Ca^{2+} channels. *FEBS Lett.* 380, 272–276
 - De Waard M., Pragnell M., Campbell K.P. 1994. Ca^{2+} channel regulation by a conserved β subunit domain. *Neuron.* 13: 495-503.
 - Dolphin A.C. 2003. Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *Bioener Biomemb.* 599-620.
 - Dubel S.J., Starr T.V., Hell J., Ahlijanian M.K., Enyeart J.J., Catterall W.A., Snutch T.P. 1992. Molecular cloning of the α -1 subunit of an ω -conotoxin-sensitive calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 5058—5062.
 - Dunlap K., Luebke J.I., Turner T.J. 1995. Exocytotic calcium channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* 18: 89–98.
 - Eisenberg D. 2003. The discovery of the α -helix a β -sheet, the principal structural features of proteins. *PNAS.* Vol 100 No. 20. 11207-11210.
 - Elinder F., Nilsson J., Arhem P. 2007. On the opening of voltage-gated ion channels. *Phys and Behavior.* 92, 1-7.
 - Eroglu C., Allen N.J., Susmann M.W., O'Rourke N.A., Park C.Y., Ozkan E., Chakraborty C., Mulinyawe S.B., Annis D.S., Huberman A.D., Green E.M., Lawler J., Dolmetsch R., García K.C., Smith S.J., Luo Z.D., Rosenthal A., Mosher D.F. 2009. Gabapentin receptor $\alpha 2\delta$ -1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell.* 139: 380-392
-

-
-
- Ertel E.A., Campbell K.P., Harpold M.M., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snutch T.P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R.W., Catterall W.A. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25, 533-535.
 - Fang K y Colecraft H.M. 2011. Mechanism of auxiliary β -subunit-mediated membrane targeting of L-type (CaV1.2) channels. *J Physiol* 589.18. 4437-4455.
 - Fatt P. y Katz B. 1953. The electrical properties of crustacean muscle fibres. *J Physiol.* 120. 171-204
 - Flavell S.W., Greenberg M.E. 2008. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31: 563–590.
 - Flucher B.E., Kasielke N., Grabner M. 2000. The triad targeting signal of the skeletal muscle calcium channel is localized in the COOH terminus of the α_{1S} subunit. *J Cell Biol.* 151:467-78
 - Fox A.P., Nowycky M.C., Tsien R.W. 1987. Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones. *J. Physiol.* 394, 149-172.
 - Gao T., Chien A.J., Hosey M.M. Complexes of the α_{1C} and β subunits generate the necessary signal for membrane targeting of class C L-type calcium channels. *J Biol Chem* 274: 2137–2144, 1999.
 - Hagiwara S., Ozawa S., Sand O. 1975. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* 65, 617—644.
 - Hansson J.H., Schild L., Lu Y., Wilson T.A., Gautschi I., Shimkets R., Nelson-Williams C., Rossier B.C. Lifton R.P. 1995. A de novo missense mutation of the β subunit of the epithelial sodium channel causes hypertension and Liddle syndrome identifying a prolinerich segment critical for regulation of channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 11495-11499.
 - Hamill O.P, Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigwort F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pfluger Arch.* 391:85-100.
 - Heckman L.K. y Pease L.R. 2007. Protocol: Gene splicing and mutagénesis by PCR-driven overlap extension. *Nature protocols.* Vol. 2 No.4. 924-933.
-
-

-
-
- Hidalgo P., Neely A. 2007. Multiplicity of protein interactions and functions of the voltage-gated calcium channel beta-subunit. *Cell Calcium*. 42. 389-396.
 - Hille B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd Ed., Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA
 - Hille B. y Catterall W.A. 1999. Electrical excitability and ion channels. *Basic neurochemistry*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven. 119-137
 - Kandel E.R., Schwartz J.H., Jessell T.M. 2000. *Principles of neural science*. Mc Graw Hill. 4ta edición. Pp. 105-125.
 - Kang H.W., Park J.Y., Lee J.H. (2008). Distinct contributions of different structural regions to the current kinetics of the Cav3.3 T-type Ca²⁺ channel. *Biochim Biophys Acta*. 1778:2740-8
 - Lacinová L. 2005. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys*. 24:1-78.
 - Lee J.H., Daud A.N., Cribbs L.L., Lacerda A.E., Pereverzev A., Klöckner U., Schneider T., Perez-Reyes E. 1999. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J. Neurosci*. 19, 1912-1921.
 - Llinas R., Sugimori M., Lin J.W., Cherksey B. 1989. Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 1689-1693.
 - Llinas R. y Yarom Y. 1981. Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurons in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J. Physiol*. 315, 549-567.
 - Mikami A., Imoto K., Tanabe T., Niidome T., Mori Y., Takeshima H., Narumiya S., Numa S. 1989. Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* 340: 230–233.
 - Mori Y., Friedrich T., Kim M.S., Mikami A., Nakai J., Ruth P., Bosse E., Hofmann F., Flockerzi V., Furuichi T. 1991. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 350, 398-402.
-
-

-
-
- Murbartián J., Arias J.M., Lee J.H., Gomora J.C., Perez-Reyes E. 2002. Alternative splicing of the rat Cav3.3 T-type calcium channel gene produces variants with distinct functional properties. *FEBS Lett.* 528:272-8
 - Murray R.K., Bender D.A., Botham K.M., Kennelly P.J., Rodwell V.W., Granner D.K., Gross P.I., Keeley F.W., Mayes P.A., Rand M.L. 2010. *HARPER Bioq.* 28 Edición. Mc Graw Hill. México.
 - Neher E. y Sakman B. 1976. Single-channel currents recorded from membranes of denervated frog muscle fibers. *Nature.* 260:799-802.
 - Niidome T., Kim M.S., Friedrich T., Mori Y. 1992. Molecular cloning and characterization of a novel calcium channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* 308, 7-13.
 - Nowycky M.C., Fox A.P., Tsien R.W. 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316, 440-443.
 - Perez-Reyes E., Cribbs L.L., Daud A., Lacerda A.E., Barclay J., Williamson M.P., Fox M., Rees M., Lee J.H. 1998. Molecular characterization of a neuronal low voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391, 896-900.
 - Pragnell M., De Waard M., Mori Y., Tanabe T., Snutch T.P., Campbell K.P. 1994. Calcium channel β -subunit bind to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the α 1-subunit. *Nature.* 368: 67-70.
 - Randall A.D., Tsien R.W. 1997. Contrasting biophysical and pharmacological properties of T-type and R-type calcium channels. *Neuropharmacology* 36, 879—893
 - Raybaud A., Baspinar E.E., Dionne F., Dodler Y., Sauvé R., Parente L. 2007. The role of distal S6 hidropobic residues in the voltage-dependent gating of CaV2.3 channels. *The journal of biological chemistry.* Vol 282. No. 38. 27944-27952.
 - Sambrook J. y Russell D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A.
 - Starr T.V., Prystay W., Snutch T.P. 1991. Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5621-5625.
-
-

-
- Staes M, Talavera K, Klugbauer N, Prenen J, Lacinova L, Droogmans G, Hofmann F, Nilius B. 2001. The amino side of the C-terminus determines fast inactivation of the T-type calcium channel α_1G . *J Physiol.* 530:35-45
 - Seidman C.E, Struhl K. 1997. *Currents Protocols in Molecular Biology.* 1.8 1-1.8.10. Suplem. 37
 - Seino S., Chen L., Seino M., Blondel O., Takeda J., Johnson J.H., Bell G.I. 1992. Cloning of the α_1 subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic β cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 584-588.
 - Soong T.W., Stea A., Hodson C.D., Dubel S.J., Vincent S.R., Snutch T.P. 1993. Structure and functional expression of a member of the low voltage-activated calcium channel family. *Science* 260, 1133-1136.
 - Starr T. V., Prystay W., Snutch T. P. 1991. Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 5621-5625.
 - Tanabe T., Takeshima H., Mikami A., Flockerzi V., Takahashi H., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Hirose T., Numa S. 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328, 313-318.
 - Tareilus E., Roux M., Qin N., Olcese R., Zhou J., Stefani E., Birnbaumer L. 1997. A *Xenopus* oocyte β subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 94: 1703-1708.
 - Terauchi Y., Sakura H., Yasuda K., Iwamoto K., Takahashi N., Ito K., Kasai H., Susuki H., Ueda O., Kamada N., Jishage K., Komeda K., Noda M., Kanasawa Y., Taniguchi S., Miwa I., Akanuma Y., Kodama T., Yazaki Y., Kadowaki T. 1995. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *J.Biol.Chem.* 270, 30253-30256.
 - Tsien R.W., Lipscombe D., Madison D.V., Bley K.R., Fox A.P. 1988. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci* 11: 431–438.
 - Wan J., Khanna R., Sandusky M., Papazian D.M., Baloh R.W. 2005. CACNA1A mutations causing episodic and progressive ataxia alter channel trafficking and kinetics. *Neurology.* 64:2090-2097
-

-
-
- Williams M.E., Feldman D.H., McCue A.F., Brenner R., Velicelebi G., Ellis S.B., Harpold M.M. 1992a. Structure and functional expression of α_1 , α_2 , and β subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* 8, 71-84.
 - Williams M.E., Brust P.F., Feldman D.H., Patthi S., Simerson S., Maroufi A., McCue A.F., Velicelebi G., Ellis S.B., Harpold M.M. 1992b. Structure and functional expression of an ω -conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* 257, 389-395.
 - Yang S.N., Berggren P.O. 2006. The role of voltage-gated calcium channels in pancreatic b-cell physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 27: 621–676.

ANEXOS

Secuencia de nucleótidos (arriba) y aminoácidos (debajo) del canal CRG12Ba (para el canal CRG12Bb solo se debe excluir el motivo VAVIM).

```
1 atgctccccacccgggtccccgggtgctgaggacacctcctctgaggggctccgctcgccctcttcggacccccggggccccggct 90
1 M L P H R V P R L R E D T S S E G L R S P L F G P P G A P A 30

91 ggccagaggatggacgaggaggatggagcgggcccggaggagtcgggacagccccgtagcttcacgcagctcaacgacctgtccggg 180
31 G Q R M D E E E D G A G A E E S G Q P R S F T Q L N D L S G 60

181 gccggggccggcaggggcccgggtgacggaagaccggcagcgggactccgaggcggaggggctgccgtaccggcgctagcc 270
61 A G G R Q G P G S T E K D P G S A D S E A E G L P Y P A L A 90

271 ccggtgggttttcttacttgaccagacagccgcccgggagctggtgtctccgcacggtctgtaaccggtgggttcgagcagtcagt 360
91 P V V F F Y L S Q D S R P R S W C L R T V C N P W F E R V S 120

361 atgctggtcattcttctcaactgtgtgactctgggtatgttcaggccgtgtgaggacattgcctgtgactcccagcgtgccggatcctg 450
121 M L V I L L N C V T L G M F R P C E D I A C D S Q R C R I L 150

451 caggccttcgatgacttcatctttgccttctttgctgtggaatggtggtgaagatggtggccttgggcatctttggaagaatgttac 540
151 Q A F D D F I F A F F A V E M V V K M V A L G I F G K K C Y 180

541 ctgggagacacttgaaccggcttgactttttcattgtcattgcaggatgctggagtattcgtggacctgcagaacctcagcttctcc 630
181 L G D T W N R L D F F I V I A G M L E Y S L D L Q N V S F S 210

631 gcagtcaggacagtcctgtgtgctgcgaccgctcagggccattaaccgggtgccagcatgcccattctcgtcacattactgctggacacc 720
211 A V R T V R V L R P L R A I N R V P S M R I L V T L L L D T 240

721 ttgcctatgctgggcaacctcctgctgctctgtttctcgtcttttcatctttggcctcgtggcgctccagctgtgggcagactgctt 810
241 L P M L G N V L L L C F F V F F I F G I V G V Q L W A G L L 270

811 cgcaaccggtgcttctccccgagaacttcagcctccccctgagcgtggacctggagccttattaccagacagagaatgaggacgagagc 900
271 R N R C F L P E N F S L P L S V D L E P Y Y Q T E N E D E S 300

901 cccttcatctgctcctcagcctcgggagaatggcatgagatcctcagagatgtgccacactcgtggggaagcggtggtggcccacc 990
301 P F I C S Q P R E N G M R S C R S V P T L R G E G G G G P P 330

991 tgcagtctggactatgagacctataacagtccagcaacaccacctgtgtcaactggaaccagtactataccaactgctctcggggcag 1080
331 C S L D Y E T Y N S S S N T T C V N W N Q Y Y T N C S A G E 360

1081 cacaacccttcaaagcgcacatcaactttgacaacattggctatgctggatcgccatcttcagggtcatcacactggagggctgggtc 1170
361 H N P F K G A I N F D N I G Y A W I A I F Q V I T L E G W V 390

1171 gacatcatgtacttcgtaatggacgctcactccttctacaacttcatctacttcttctcatcatcgtgggctccttcttcatgac 1260
391 D I M Y F V M D A H S F Y N F I Y F I L L I I V G S F F M I 420

1261 aaactgtgctggtggtgattgccacgcagTTCGCCAAAGAGCGGGAGCGAGTCGAGAACCGCCGTGCCTTCCTGAAGCTCCGCAGGCAG 1350
421 N L C L V V I A T Q F A K E R E R V E N R R A F L K L R R Q 450

1351 CAGCAGATTGAGCGAGAACTGAATGGGTACTTGGAGTGGATCTTCAAGCGGAGGAAGTCATGTTGGCAGAGGAGGACAAGAACGCAGAA 1440
451 Q Q I E R E L N G Y L E W I F K A E E V M L A E E D K N A E 480

1441 GAGAAGTCCCCTTTGGATGTGTGAAGAGAGCTGCTACCAAGAAGAGCCGAAATGACCTCATCCATGCAGAAGAGGGGGAGGACCGGTTT 1530
481 E K S P L D V L K R A A T K K S R N D L I H A E E G E D R F 510

1531 GTAGACCTCTGTGCTGCTGGGTCTCCCTTTGCTCGTGCCAGCCTCAAGAGTGGGAAGACAGAGAGCTCATCGTACTTCCGGAGGAAGGAG 1620
511 V D L C A A G S P F A R A S L K S G K T E S S S Y F R R K E 540
```

Continuación.

1621 AAGATGTTCGGTTCCTTATCCGTCGTATGGTGAAAGCAaaataactttggccggggaatcatgatcgccatcctgggtcaatacactcagc 1710
541 K M F R F L I R R M V K A K Y F G R G I M I A I L V N T L S 570

1711 atgggcatcgagtaccacgagcagcccaggagctcaccaacgcctggaaatcagcaacatcgtcttcaccagcctcttcgccttgag 1800
571 M G I E Y H E Q P E E L T N A L E I S N I V F T S L F A L E 600

1801 atgctgctgaaactgctgtctacggctccctttggctacattaagaatccctacaacatctttgatgggtgctattgtgggtcatcagtg 1890
601 M L L K L L V Y G P F G Y I K N P Y N I F D G V I V V I S V 630

1891 tgggagattgtgggccagcagggaggtggcctgtcgggtgctcgggaccttccgcctgatgcgggtgctgaagctgggtgcgttccctgccg 1980
631 W E I V G Q Q G G G L S V L R T F R L M R V L K L V R F L P 660

1981 gcctgcagcgcagctcgtgggtgctcatgaagaccatggacaacgtggccaccttctgcctcatgctctcatgcttcatcttcatcttc 2070
661 A L Q R Q L V V L M K T M D N V A T F C M L L M L F I F I F 690

2071 agcatcctgggcatgcatctctttggttgaagttcgcatctgaacgggatggggacacggttccagaccggaagaatttcgactccctg 2160
691 S I L G M H L F G C K F A S E R D G D T L P D R K N F D S L 720

2161 ctctggccatcgctactgtctttcagattctgactcaggaagactggaataaagtccctctacaacggcatggcctccacatcgtcttgg 2250
721 L W A I V T V F Q I L T Q E D W N K V L Y N G M A S T S S W 750

2251 gctgctctttacttcatgcacctcatgacttttggcaactatgtgctctttaaactgctgggtggccattcttgggaaggattccaggca 2340
751 A A L Y F I A L M T F G N Y V L F N L L V A I L V E G F Q A 780

2341 gagggagatgccaccaagtctgagtcagagcctgatttcttttgcgccagtgtggatgggtgatggggacagaagaagcgttggccctg 2430
781 E G D A T K S E S E P D F F S P S V D G D G D R K K R L A L 810

2431 gtggctttgggagaacacgcggaactacgaaagagccttttccaccctcatcatccatacggctgacacacaaatgtcacaccccaag 2520
811 V A L G E H A E L R K S L L P P L I I H T A A T P M S H P K 840

2521 agctccagcacaggtgtgggggaagcactgggctctggctctcgagctaccagtagcagtggttccgctgagcctggagctgcccacat 2610
841 S S S T G V G E A L G S G S R R T S S S G S A E P G A A H H 870

2611 gagatgaaatgtccgccaagtccccgcagctccccgcacagtccttgagtgccgcaagcagctggaccagcagggcctccagcaggaac 2700
871 E M K C P P S A R S S P H S P W S A A S S W T S R R S S R N 900

2701 agcctgggcccggccccagcctaaagcgggagggcccagcggggagcgggaggtccctgctgtctggagagggccaggagagtcaggat 2790
901 S L G R A P S L K R R S P S G E R R S L L S G E G Q E S Q D 930

2791 gagggaaagtccagaagaggaccgggcccagcaggcagtgaccatcgccacaggggttccttggaaactgagggcaagagttcc 2880
931 E E E S S E E D R A S P A G S D H R H R G S L E R E A K S S 960

2881 tttgacctgctgacactctgcaggtgccggggctgcaccgcacagccagcggcggagctctgctctgagcaccaagactgtaatggc 2970
961 F D L P D T L Q V P G L H R T A S G R S S A S E H Q D C N G 990

2971 aagtcgcttcaggcgcttggccccgcacctgaggactgatgacccccaaactggatggggatgatgacaatgatgaggggaaatctgagc 3060
991 K S A S G R L A R T L R T D D P Q L D G D D D N D E G N L S 1020

3061 aaaggggaacgcatacaagcctgggtcagatcccggcttctgctgttggcagagcagagattcctggctggcctatatctttcctcct 3150
1021 K G E R I Q A W V R S R L P A C C R E R D S W S A Y I F P P 1050

3151 cagtcaaggtttcgtctcctgtgtcaccggatcatcaccacaagatgtttgacctgtggtcctcgtcatcatcttccctcaactgtatc 3240
1051 Q S R F R L L C H R I I T H K M F D H V V L V I I F L N C I 1080

3241 accatcgctatggagcggccccaaaattgacccccacagcgtgagcgcacatcttctgacctctccaactacatcttcacggcagctttt 3330
1081 T I A M E R P K I D P H S A E R I F L T L S N Y I F T A V F 1110

3331 ctgactgaaatgacagtgaaagtggtggcactgggctgggtgcttggggagcagggcctacctgagcagcagctggaatgtgctggacggc 3420
1111 L A E M T V K V V A L G W C F G E Q A Y L R S S W N V L D G 1140

Continuación.

3421 ttgctgggtgctcatctccgctcatcgacatcctgggtctccatgggtctccgacagcgccaccaagatccttggcatgctgaggggtgctgcg 3510
1141 L L V L I S V I D I L V S M V S D S G T K I L G M L R V L R 1170

3511 ctgctgcggaccctgctccactcagggctcatcagccgggcccagggactgaagctgggtgtagagactctgatgtcatccctcaaacc 3600
1171 L L R T L R P L R V I S R A Q G L K L V V E T L M S S L K P 1200

3601 attggcaacatttggtcatttggctgtgccttcttcatcatttttgaattctcgggggtcagctcttcaaaggaagtcttctgctgtgt 3690
1201 I G N I V V I C C A F F I I F G I L G V Q L F K G K F F V C 1230

3691 caggggtgaggacaccaggaacatcaactaacaatccgactgcgctgagggccagctaccgatgggtccggcacaagtacaactttgacaac 3780
1231 Q G E D T R N I T N K S D C A E A S Y R W V R H K Y N F D N 1260

3781 ctgggcccaggctctgatgtccctggttggctggcctccaagatgggtgggtgacatcatgatgatgggtggatgctgtgggtgtg 3870
1261 L G Q A L M S L F V L A S K D G W V D I M Y D G L D A V G V 1290

3871 gatcagcagcccatcatgaaccacaaccctggatgctgtctatacttcatctccttctcctcatcgtggccttcttctgctgaacatg 3960
1291 D Q Q P I M N H N P W M L L Y F I S F L L I V A F F V L N M 1320

3961 tttgtggcgctgggtgggagaacttccataagtgcagacagcaccaggaggaggaggcggcggtgaggagaagcgactacgg 4050
1321 F V G V V V E N F H K C R Q H Q E E E E A R R R E E K R L R 1350

4051 aggctggagaaaaagagaaggagtaaggagaagcagatggccgaagcccagtgcaagccctactactctgactactcgagattccggctc 4140
1351 R L E K K R R S K E K Q M A E A Q C K P Y Y S D Y S R F R L 1380

4141 ctgtgccaccactgtgtaccagccactacctggaccttctcatcactgggtgctcatcgggctgaactgggtcactatggccatggaacat 4230
1381 L V H H L C T S H Y L D L F I T G V I G L N V V T M A M E H 1410

4231 taccagcagccccagatcctggacgaggtctgaagatctgcaattacatctttaccgtcatctttgtctttgagtcagtttcaaactt 4320
1411 Y Q Q P Q I L D E A L K I C N Y I F T V I F V F E S V F K L 1440

4321 gtggcctttggcttcccgcttcttccaggacaggtggaaccagctggacctggctattgtgcttctgtccatcatgggcatcacactg 4410
1441 V A F G F R R F F Q D R W N Q L D L A I V L L S I M G I T L 1470

4411 gaggagattgaggtcaatGCTTcgtgcccatacaaccaccatcatccgtatcatgaggggtgctccgattgctcgagttctgaagctg 4500
1471 E E I E V N A S L P I N P T I I R I M R V L R I A R V L K L 1500

4501 ttgaagatggctgtgggcatgcccggcactgctgGacacgggtatgcagggcctgcccagggtggggaacctgggacttctcttcatgtta 4590
1501 L K M A V G M R A L L D T V M Q A L P Q V G N L G L L F M L 1530

4591 ttgtttttcatctttgcaGctctggcgctggagctctttggagacctggagtgtgatgagacacaccttgtgagggcttgggtcgcat 4680
1531 L F F I F A A L G V E L F G D L E C D E T H P C E G L G R H 1560

4681 gccaccttttaggaactttggatggcctttctgacctcttccagtgctccactggtgacaactggaatggtattatgaaggacacctc 4770
1561 A T F R N F G M A F L T L F R V S T G D N W N G I M K D T L 1590

4771 cgggactgtgaccaggagtccacctgctacaacactgtcatctcccctatctactttgtgctcttctgctgctgacgcccagtttgtgctg 4860
1591 R D C D Q E S T C Y N T V I S P I Y F V S F V L T A Q F V L 1620

4861 gtcaactgggtcatagCTGTGCTGATGAAGCACCTG**GTTGCTGTGATCATG**GACAatttgcataacctcacggggattcttccatccta 4950
1621 V N V V I A V L M K H L **V A V I M** D N F E Y L T R D S S I L 1650

4951 gggccgaccacctcgatgaattcattcgctctgggctggaatacggcagctgctgtgggctgcatcagttacaatgacatggttgag 5040
1651 G P H H L D E F I R V W A E Y D P A A C G R I S Y N D M F E 1680

5041 atgctgaaacacatgtccccacctctgggtttggggaagaaatgcccgctcgagttgcatacaagcgctggttcgaatgaaatgccc 5130
1681 M L K H M S P P L G L G K K C P A R V A Y K R L V R M N M P 1710

5131 atatccaatgaggacatgacggtacactttacatccacactgatggcctcatccggacggcactggagatcaagcttggcccagcgggg 5220
1711 I S N E D M T V H F T S T L M A L I R T A L E I K L A P A G 1740

5221 aaaaaacagcacaatgtgatgctgagctgaggaaggagatctcttctgtgtgggtaactctgcccagaagactctggacttactggtg 5310
1741 T K Q H Q C D A E L R K E I S S V W A N L P Q K T L D L L V 1770

Continuación.

5311 ccacccccacaaacctgacgagatgacagtggggaaggtctatgcggtctcatgatatttgacttctacaaacagaacaaaaccaccaga 5400
1771 P P H K P D E M T V G K V Y A A L M I F D F Y K Q N K T T R 1800

5401 gatcagactcaccaagctcctggaggcctgtcccagatgggtcctgtttccctgttccatcctctgaaggccaccctggagcagacacag 5490
1801 D Q T H Q A P G G L S Q M G P V S L F H P L K A T L E Q T Q 1830

5491 cccgctgtgctccgagagctcgggttttccttcgacaaaagagtgcacttcctcagcaatgggggcccatacaaacccaggaaagt 5580
1831 P A V L R G A R V F L R Q K S A T S L S N G G A I Q T Q E S 1860

5581 ggcatcaaggagtcctgtcctggggcagcagaggaccaggagctactttatgaggccagagcacctctagaacgtggccattctgca 5670
1861 G I K E S L S W G T Q R T Q D V L Y E A R A P L E R G H S A 1890

5671 gagatccctgtggggcagccaggagcactgggtgtagatgtccagatgcagaacatgacattgagaggaccggatggggagcccagcct 5760
1891 E I P V G Q P G A L A V D V Q M Q N M T L R G P D G E P Q P 1920

5761 ggcttgagagccaagggcagcggcctctatgccacgcctggcggcagaaacacagccggcccctaatgccagcccctgaagcgctcc 5850
1921 G L E S Q G R A A S M P R L A A E T Q P A P N A S P M K R S 1950

5851 atctccacactggctccacgcccgcagggactcagctttgcaacacagtcctggaccggccacctcctagccaggtgtcccacaccac 5940
1951 I S T L A P R P H G T Q L C N T V L D R P P P S Q V S H H H 1980

5941 caccaccgctgccaccggcagggacaagaagcagaggtccctggaaaagggcccagcctgtctgttgacacagaaggtgcaccaagt 6030
1981 H H R C H R R R D K K Q R S L E K G P S L S V D T E G A P S 2010

6031 actgctgcaggatctggcctgccccatggagaagggctccacaggtgcccggcgggagcgttaagcaagagcagggccggtcccaggagcgg 6120
2011 T A A G S G L P H G E G S T G C R R E R K Q E R G R S Q E R 2040

6121 aggcagccctcctcctcttctcagagaagcagcgttctattcctgtgaccgctttgggagccggagccccacaacctaaagccctcc 6210
2041 R Q P S S S S S E K Q R F Y S C D R F G S R E P P Q P K P S 2070

6211 ctcaatctggtgctagcagcggcggcaggtggcgggagcagctccccagactcccctgaccccacgcccagcatcacctacaag 6300
2071 L S S H P I S P T A A L E P G P H P Q G S G S V N G S P L M 2100

6301 tcaacatctggtgctagcagcggcggcaggtggcgggagcagctccccagactcccctgaccccacgcccagcatcacctacaag 6390
2101 S T S G A S T P G R G G R R Q L P Q T P L T P R P S I T Y K 2130

6391 acggccaattcctcgcctgtccactttgctgagggtcagagtgcccttcagccttctcccctggcgtctcagccgcccctttctgaa 6480
2131 T A N S S P V H F A E G Q S G L P A F S P G R L S R G L S E 2160

6481 cacaatgccctgctccagaaagaccctgagccagcctctagcttctggctcccgcattgctctgacccttacctagggcagcgtctg 6570
2161 H N A L L Q K E P L S Q P L A S G S R I G S D P Y L G Q R L 2190

6571 gacagtgaggcctctgcccacaacctgcctgaggatacactcacctttgaagggccgtggccaccaactctggccgctcctccaggact 6660
2191 D S E A S A H N L P E D T L T F E E A V A T N S G R S S R T 2220

6661 tcctatgtgtcctccctcacttcccacccctctccgcccgtgtacccaatggctaccactgacactttgggactcagcaccggcgtc 6750
2221 S Y V S S L T S Q S H P L R R V P N G Y H C T L G L S T G V 2250

6751 cgggcccggcacagctaccaccaccCAGACCAGGATCACTGGTGCTGA 6798
2251 R A R H S Y H H P D Q D H W C * 2266