



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
FACULTAD DE MEDICINA

**INHIBICIÓN DE LA INACTIVACIÓN RÁPIDA DE LOS CANALES DE CALCIO  
Cav2.2 POR EL DÍMERO  $\beta\gamma$  DE LAS PROTEÍNAS G EN NEURONAS  
SIMPÁTICAS DE RATA**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**BIÓL. ARTURO REYES VACA**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**DR. DAVID E. GARCÍA DÍAZ**  
**DEPTO. DE FISIOLÓGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.**  
**COMITÉ TUTOR**  
**DR. FROYLÁN MIGUEL GÓMEZ LAGUNAS**  
**DEPTO. DE FISIOLÓGÍA, FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.**

**DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ**  
**DEPTO. NEUROPATOLOGÍA MOLECULAR, INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**  
**CELULAR, U.N.A.M.**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., MÉXICO, MARZO 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Índice de contenido

Agradecimientos .....	1
Resumen .....	4
Abreviaturas.....	6
1. Introducción .....	7
2. Antecedentes .....	9
2.1. Estructura y clasificación de los canales de calcio dependientes del voltaje.....	9
2.2. Regulación de los canales de calcio dependientes del voltaje a través de receptores acoplados a proteínas G .....	13
2.2.1. Proteínas G heterotriméricas .....	13
2.2.2. Regulación de los Cav2.2 por el dímero Gβγ.....	16
2.2.3. Regulación de la inactivación de los Cav2.2 por el dímero Gβγ .....	18
3. Planteamiento del problema .....	19
5. Objetivos .....	20
5.1. Objetivo general.....	20
5.2. Objetivos específicos .....	20
6. Métodos .....	21
6.1. Cultivo primario de neuronas de rata.....	21
6.2. Microinyección intranuclear de neuronas SCG .....	23
6.3. Registro electrofisiológico .....	24
6.4. Análisis de los datos .....	27

7. Resultados .....	30
7.1. La inhibición de los $Ca_v2.2$ por la subunidad $G\beta_1$ es dependiente del voltaje, mientras que por la subunidad $G\beta_5$ es resistente al voltaje.....	30
7.2. El componente rápido de la inactivación de los $Ca_v2.2$ es inhibido por la subunidad $G\beta_1$ , pero no por la subunidad $G\beta_5$ .....	33
7.3. El componente rápido de la inactivación de los $Ca_v2.2$ es ocluido por la subunidad $G\beta_1$ a través de un mecanismo dependiente del voltaje.....	35
7.4. La subunidad $G\beta_1$ regula la dependencia del voltaje de la inactivación de los $Ca_v2.2$ y reduce la fracción de los canales inactivados.....	39
7.5. La subunidad $G\beta_1$ reduce la conductancia macroscópica de los $Ca_v2.2$ .....	41
8. Discusión.....	44
9. Referencias .....	48
10. Material Anexo .....	55

## **Agradecimientos**

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección del Dr. David Erasmo García Díaz, dentro del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM, y gracias al apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyectos IN218016 e IV100116, y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyecto No. 255635.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)** por brindarme las facilidades académicas, sociales, artísticas y deportivas. Es un honor formar parte de esta casa de estudios.

Al **Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas** por haberme permitido ser uno de sus estudiantes y facilitar mi enseñanza por medio de cursos especializados.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca, No 363238, que me fue otorgada durante la realización de mi doctorado.

Al **Dr. David García** por haberme permitido realizar el doctorado en el Laboratorio de Biofísica y Células Troncales.

A los miembros de mi comité tutor: **Dr. Froylán Gómez Lagunas** y al **Dr. Juan Carlos Gómora Martínez**. Gracias por los consejos.

Al equipo de biofísica formado por: **la Dra. Julieta Garduño, la Biól. Isabel Arenas y la Dra. Lizbeth de la Cruz**. Gracias por su amistad, por su apoyo incondicional, tiempo, dedicación y paciencia.

A la **Dra. Julieta Garduño** por su amistad y por haberme devuelto la pasión por la ciencia. Por aconsejarme y dirigirme en el presente trabajo y enseñarme con el ejemplo que el título de Doctor se gana con honestidad, perseverancia, dedicación y trabajo.

A la **Dra. Lizbeth de la Cruz** por su apoyo tanto académico como personal. Las mejores discusiones que he tenido en mi trayectoria académica han sido a la hora de té, gracias por esos grandes momentos.

A la **Biól. Isabel Arenas** por formar parte esencial en mi formación académica. Gracias por enseñarme, dirigirme y facilitarme la realización de los experimentos en el Laboratorio.

Al **Sr. Luis Martínez** por todas las atenciones. Gracias por su apoyo técnico en el Laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio: **Julieta Garduño, Lizbeth de la Cruz, Isabel Arenas, Erika Puente, Jorge Bravo, Héctor Castro, Karina Bermeo y Antonio Barajas.** Gracias.

A mis amigos: **Alejandro Avalos, Anahí Valdés, Jazmín Ortiz, Moisés Olea, Jessica Ramírez, Vilma, Alma Pineda y Daniel Mujica** por contar siempre con su apoyo.

Y con dedicación especial a mi familia. En particular, a mis padres **Francisco Reyes Aparicio y María de Jesús Vaca Colín.** Gracias.

## Resumen

La regulación dependiente del voltaje de los canales de calcio tipo N ( $\text{Ca}_v2.2$ ) por las proteínas G se lleva a cabo por el dímero beta gamma ( $\text{G}\beta\gamma$ ). La mayoría de las investigaciones, relacionadas con esta regulación, se han dirigido a estudiar la activación, mientras que pocos estudios se han enfocado en el efecto del dímero  $\text{G}\beta\gamma$  sobre la inactivación de los canales  $\text{Ca}_v2.2$ .

En el presente trabajo se estudió si el dímero  $\text{G}\beta\gamma$  enlentece los componentes de la inactivación de los  $\text{Ca}_v2.2$  en las neuronas del ganglio simpático cervical superior de rata (SCG). La corriente de los  $\text{Ca}_v2.2$  fue registrada en neuronas SCG, por medio de la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (patch-clamp) en configuración de célula entera, con y sin sobreexpresión del dímero  $\text{G}\beta\gamma$ . En neuronas sin sobreexpresión, se encontró que el dímero  $\text{G}\beta_5\gamma_4$  no tiene efecto sobre la inactivación, mientras que el dímero  $\text{G}\beta_1\gamma_4$  reduce el decaimiento de la corriente en un 80%. En condiciones sin sobreexpresión, el decaimiento de la corriente de los  $\text{Ca}_v2.2$  presenta un componente rápido y uno lento; en tanto que, las neuronas que sobreexpresaron el dímero  $\text{G}\beta_1\gamma_4$  únicamente mostraron el componente lento, sugiriendo que el componente rápido en la inactivación de los  $\text{Ca}_v2.2$  está ausente bajo esta condición. La ausencia del componente rápido en la inactivación de neuronas sobreexpresadas con el dímero  $\text{G}\beta_1\gamma_4$  es restablecido por un pulso de voltaje fuertemente despolarizante. El dímero  $\text{G}\beta_1\gamma_4$  desplaza la curva de inactivación hacia voltajes más positivos y reduce la proporción de los  $\text{Ca}_v2.2$  en estado inactivado. Además, se observó una reducción en la conductancia macroscópica a 20 ms en neuronas sobreexpresadas con el dímero  $\text{G}\beta_1\gamma_4$ . Estos resultados sugieren que el dímero  $\text{G}\beta_1\gamma_4$  inhibe el componente rápido en

la inactivación, y sugieren que este dímero lleva a una fracción de los Cav2.2 a un estado no conductor.

## Abreviaturas

<b>Cav2.2</b>	Canales de calcio dependientes del voltaje tipo N
<b>Cav<math>\alpha</math>1</b>	Subunidad alfa de los canales de calcio dependientes del voltaje
<b>Cav<math>\alpha</math>2<math>\delta</math></b>	Subunidad alfa-2-delta de los canales de calcio dependientes del voltaje
<b>Cav<math>\beta</math></b>	Subunidad beta de los canales de calcio dependientes del voltaje
<b>Cav<math>\gamma</math></b>	Subunidad gamma de los canales de calcio
<b>CDI</b>	Inactivación dependiente de calcio
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GPCR</b>	Receptores acoplados a proteínas G
<b>GTP</b>	Trifosfato de guanosina
<b>G<math>\beta</math></b>	Subunidad beta de las proteínas G
<b>G<math>\gamma</math></b>	Subunidad gamma de las proteínas G
<b>HVA</b>	Canales de calcio de alto umbral de activación
<b>LVA</b>	Canales de calcio de bajo umbral de activación
<b>SGC</b>	Ganglio simpático cervical superior de rata
<b>VDCC</b>	Canales de calcio dependientes del voltaje
<b>VDI</b>	Inactivación dependiente de voltaje

## 1. Introducción

La entrada de iones de calcio, hacia el citoplasma en algunas neuronas, se lleva principalmente a través de los canales Cav2.2 (1). La concentración de calcio en células en reposo es menor a 0.1  $\mu\text{M}$  y puede llegar a elevarse, durante la activación de procesos celulares, hasta 100  $\mu\text{M}$  (2). El incremento de calcio intracelular despolariza el potencial de membrana de la célula y activa o participa en varios procesos celulares, entre estos, la liberación de neurotransmisores y hormonas (1). Si las concentraciones de calcio son muy altas, la célula puede entrar en muerte celular debido a la toxicidad de este ion (3, 4). Por lo que, las concentraciones de calcio son rigurosamente reguladas por distintos mecanismos, dos de los cuales son la inactivación y la inhibición de los Cav2.2 por las proteínas G (5).

La inhibición de los Cav2.2 por el dímero  $G\beta\gamma$  es el mecanismo de regulación más estudiado en las vías de señalización de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) que convergen en los Cav (6). Durante la aplicación de un pulso de voltaje despolarizante, el registro de la amplitud de la corriente de los Cav2.2, por medio de la técnica de patch-clamp en configuración de célula entera, muestra un incremento y posteriormente disminuye en el tiempo. Al incremento de la amplitud de la corriente al inicio del pulso se le denomina activación, mientras que a la disminución se le conoce como inactivación (7) de los Cav2.2. La gran mayoría de las investigaciones relacionadas con la regulación de los Cav por el dímero  $G\beta\gamma$  se han enfocado en estudiar el efecto que este dímero induce en la activación, y de acuerdo con estos estudios se ha establecido que el dímero  $G\beta\gamma$ : desplaza la curva de activación hacia voltajes más positivos (8), enlentece la activación (9), disminuye la amplitud

de la corriente e interactúa directamente con el Cav2.2 de la cual se libera con la aplicación de un pulso fuertemente despolarizante (10). De acuerdo con estos parámetros experimentales, a este tipo de regulación se le denomina: dependiente del voltaje (11).

Por otra parte, se ha sugerido que el dímero G $\beta\gamma$  enlentece la inactivación de los Cav2.2 (12, 13). Hallazgos similares se han observado con agonistas que activan principalmente a la vía de la regulación dependiente del voltaje (9), sugiriendo que el causante de dicho enlentecimiento en la inactivación de los Cav2.2 es el dímero G $\beta\gamma$ . Por consiguiente, la regulación de los Cav2.2, ha sido poco explorada y entendida. Un modelo clásico en el cual se ha estudiado la regulación de los Cav2.2 por el dímero G $\beta\gamma$  son las neuronas simpáticas de rata, en éstas, la cinética de la inactivación está conformada por un componente rápido y uno lento (12). Por lo cual, en el presente trabajo se investigó si el dímero G $\beta\gamma$  enlentece el o los componentes de la inactivación de los Cav2.2 en neuronas simpáticas de rata.

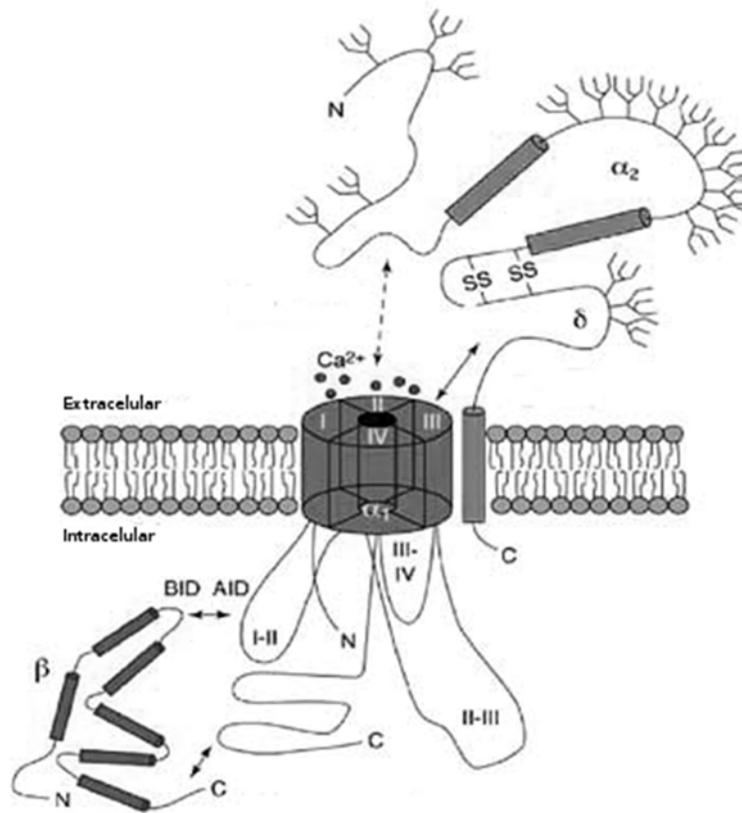
## 2. Antecedentes

### 2.1. Estructura y clasificación de los canales de calcio dependientes del voltaje

El VDCC es un complejo constituido por varios subtipos de subunidades, constituidos principalmente por la subunidad alfa 1 ( $Cav\alpha_1$ ) y al menos dos de las tres subunidades accesorias: beta ( $Cav\beta$ ), gamma ( $Cav\gamma$ ) y alfa dos delta ( $Cav\alpha_2\delta$ , Fig. 1).

La subunidad  $Cav\alpha_1$  es la más grande de todas (170-250 kDa), es la que forma el poro del canal a través del cual se lleva a cabo el flujo, la permeabilidad y la selectividad de los iones  $Ca^{2+}$ ; así como, los mecanismos de cierre y apertura (“gating”). Estructuralmente, esta subunidad presenta cuatro dominios diferentes (I-IV) unidos por asas citoplasmáticas. A su vez, cada dominio está formado por seis segmentos transmembranales (S1-S6). Los segmentos del S1 al S4 forman el dominio del sensor del voltaje (VSD), mediante el cual el canal detecta los cambios en el potencial de membrana. El VSD está cargado positivamente, siendo el S4 uno de los segmentos con mayor cantidad de cargas positivas debido a la presencia de residuos de arginina y lisina. Los segmentos S5 y S6 forman el filtro de selectividad y las paredes del poro del canal por donde cruzan los iones  $Ca^{2+}$  (14). 10 subtipos de subunidades  $Cav\alpha_1$  han sido identificados en mamífero y clasificados, por medio de técnicas de biología molecular, estudios biofísicos y electrofisiológicos, en dos grupos (Fig. 2): los canales de calcio de alto umbral de activación (HVA) y los canales de bajo umbral de activación (LVA). Los canales LVA,  $Cav3$  o tipo T están constituidos por tres isoformas ( $Cav3.1-3.3$ ). Los canales HVA se clasificaron, de acuerdo con la sensibilidad en su corriente a los fármacos de dihidropiridinas, en dos subfamilias:  $Cav1$  y  $Cav2$ . La corriente de los

canales Cav1 o tipo L es bloqueada o afectada por dihidropiridinas y se han identificado



**Fig. 1** Esquema representativo de las distintas subunidades que conforman el complejo de los VDCC. Adaptado de Dolphin (2006).

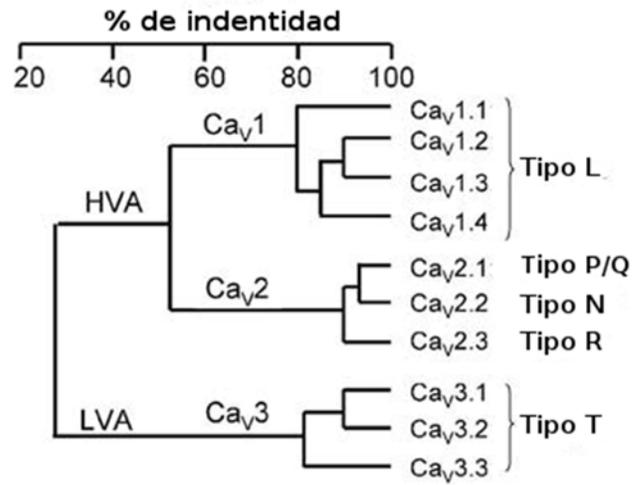
cuatro isoformas de estos canales ( $Cav1.1-1.4$ ). La corriente de la subfamilia de canales  $Cav_2$  es insensible a dihidropiridinas y se conforma por los canales  $Cav2.1$  o canales tipo P/Q, bloqueados por  $\omega$ -agatoxina IVA; los  $Cav2.2$  o tipo N, bloqueados por la  $\omega$ -conotoxina y los  $Cav2.3$  o tipo R, bloqueados por SNX-482 (15).

La subunidad  $Cav\beta$  interactúa directamente con la subunidad  $Cav\alpha_1$  del canal  $Cav$ , regulando

sus propiedades biofísicas, de tráfico y de estabilidad (16). Cuatro isoformas de la  $\text{Ca}_v\beta$  ( $\beta_1$ - $\beta_4$ ), con un peso molecular entre 50 y 78 kDa, se han descrito en el corazón, el cerebro, el pulmón, la aorta, la tráquea y el músculo esquelético de mamíferos (17). La interacción de la subunidad  $\text{Ca}_v\beta$  con la subunidad  $\text{Ca}_v\alpha_1$  ocurre del lado citoplasmático a través de una región denominada interacción con el dominio beta. Ésta es una región de 30 aminoácidos, altamente conservada, que se ubica en el amino terminal de la subunidad  $\text{Ca}_v\beta$ . El dominio de interacción con la subunidad beta le proporciona a la subunidad  $\text{Ca}_v\alpha_1$  una alta afinidad y especificidad. La subunidad  $\text{Ca}_v\beta_4$  predomina en los  $\text{Ca}_v2.1$ , mientras que la subunidad  $\text{Ca}_v\beta_3$  en los  $\text{Ca}_v2.2$  (18, 19). La subunidad  $\text{Ca}_v\beta$  favorece el tráfico de la subunidad  $\text{Ca}_v\alpha_1$  hacia la membrana plasmática, en gran parte, debido a que enmascara la señal de retención del retículo endoplásmico (20). Además, la coexpresión de la subunidad  $\text{Ca}_v\beta$  promueve la aceleración de la cinética de la inactivación (21) y el desplazamiento hacia voltajes más negativos de la relación corriente voltaje de los VDCC (22).

La subunidad  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$  ( $\alpha_2\delta$ -1 a la  $\alpha_2\delta$ -4) presenta un peso molecular aproximado de 170 kDa. Esta subunidad es el producto de un solo gen que es sometido a un corte postraduccional. El dominio  $\delta$  está unido a la membrana plasmática, mientras que el dominio  $\alpha_2$  interactúa de manera extracelular con la subunidad  $\text{Ca}_v\alpha_1$  (16).

La subunidad  $\text{Ca}_v\gamma$  solo está reportada en el músculo esquelético (17) y neuronas (23). Aunque esta subunidad no es parte integral de los VDCC, se le ha sido asociado con el tráfico de estos canales en la membrana plasmática (16) y altera la cinética de la activación e inactivación en los canales  $\text{Ca}_v2.1$ - $2.2$  (24).



**Fig. 2 Dendrograma de la clasificación de los VDCC.** Adaptado de Dolphin (2006).

## **2.2. Regulación de los canales de calcio dependientes del voltaje a través de receptores acoplados a proteínas G**

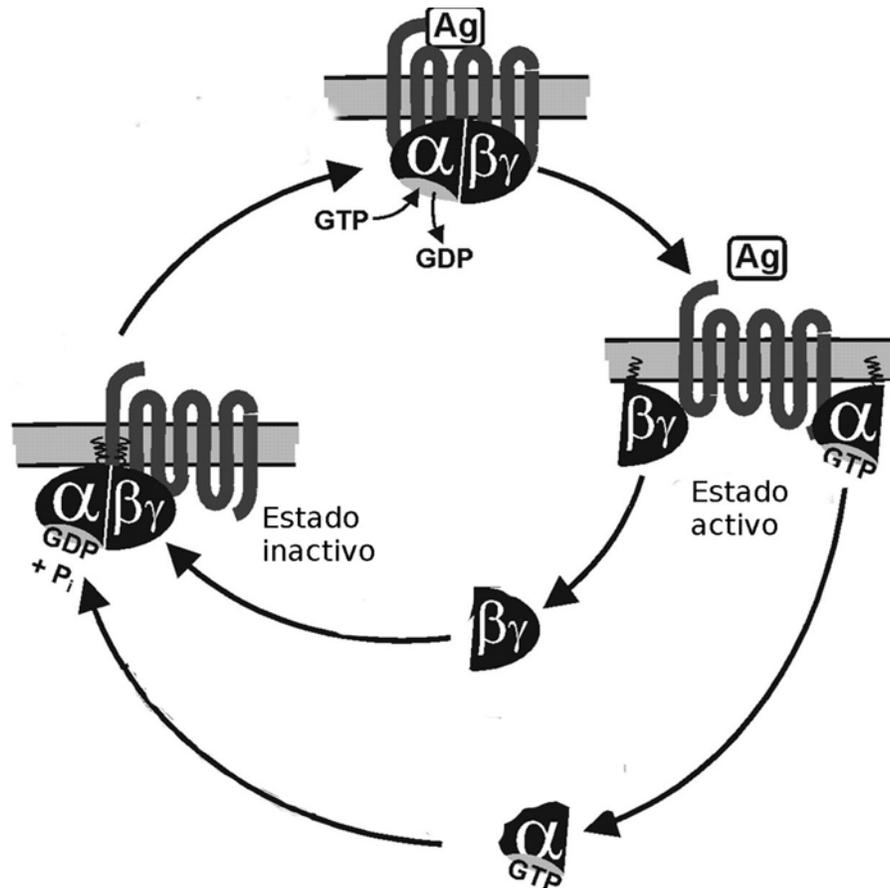
La diversidad funcional de los VDCC no sólo radica en la subunidad  $Ca_v\alpha_1$ , sino también en la regulación de las subunidades accesorias y en otras proteínas, tales como: el dímero  $G\beta\gamma$  (25), la adenilato ciclasa (26), la fosfolipasa C- $\beta$  (27), pequeñas proteínas G (28), proteínas SNARE (29) y la proteína cinasa C (30). Siendo la regulación de los  $Ca_v2.2$  por proteínas G el principal mecanismo de inhibición de los  $Ca_v2.2$  en neuronas (31).

### **2.2.1. Proteínas G heterotriméricas**

Las proteínas G heterotriméricas, de aquí en adelante nombradas proteínas G, están constituidas por tres polipéptidos distintos: la subunidad alfa ( $G\alpha$ ), la beta ( $G\beta$ ) y la gamma ( $G\gamma$ ). Las proteínas G se caracterizan por estar unida a un receptor de siete segmentos transmembranales (GPCRs) y por presentar una molécula de fosfato de guanosina en  $G\alpha$ , la cual determina el estado activo o inactivo de la proteína G.

La actividad funcional de las proteínas G es un ciclo, el cual empezaré explicando a partir de su estado inactivo (Fig. 3) (32). El GPCR forma un complejo con la proteína G. En este estado, la proteína  $G\alpha$  tiene unida una molécula de difosfato de guanosina (GDP). La activación del GPCR por un agonista, induce un cambio conformacional que promueve el intercambio de la molécula de GDP por la unión de una molécula de trifosfato de guanosina

(GTP). La adherencia de la molécula de GTP a la subunidad  $G\alpha$  disocia al complejo  $G\alpha\beta\gamma$  en dos componentes; por una parte, la subunidad  $G\alpha$  y por la otra el dímero  $G\beta\gamma$ .



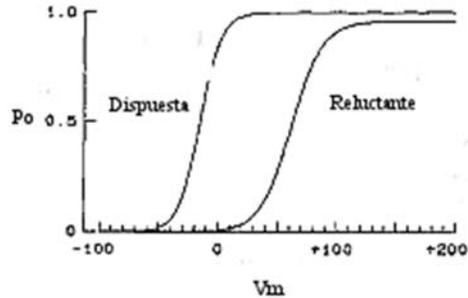
**Fig. 3 Ciclo de las proteínas G.** Adaptado de Wettschureck (2005).

Posteriormente, tanto la subunidad  $G\alpha$  como el dímero  $G\beta\gamma$  regulan río abajo a canales iónicos y a otras proteínas (33). Debido a la propiedad intrínseca de GTPasa de la subunidad  $G\alpha$  y junto con la ayuda de otras proteínas que regulan la vía de señalización de las proteínas G (RGS), el GTP se hidroliza a GDP y nuevamente el dímero  $G\beta\gamma$  se asocia con la subunidad  $G\alpha$  formando el complejo  $G\alpha\beta\gamma$ . Este complejo se une al GPCR, terminando el ciclo.

Las proteínas G se clasifican en cuatro grandes familias según el tipo y la respuesta fisiológica que desencadenan. La familia  $G_s\alpha$ , está asociada con el aumento en la concentración intracelular de adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) a través de la enzima adenilato ciclasa; la familia  $G_i\alpha$ , está asociada con la disminución de las concentraciones de AMPC; la familia  $G_q/11\alpha$ , está acoplada a la vía de señalización de la fosfolipasa  $C\beta$  y la familia  $G_{12/13\alpha}$ , está relacionada con la proliferación y la forma celular, la activación de Rho y el con el intercambiador  $Na^+/H^+$  (34).

### 2.2.2. Regulación de los Cav2.2 por el dímero Gβγ

En 1978 Dunlap y Fishbach reportaron que el componente, originado por los canales de calcio en el potencial de acción, disminuía ante la presencia de algunos neurotransmisores. Ellos propusieron que lo anterior ocurría por una reducción en el número de canales de calcio funcionales (35, 36). En respuesta, Bean en 1989 mostró que la reducción en la corriente de



**Fig. 4** Curva de activación de la población reluctante y de la población dispuesta, obtenida a partir de registros en neuronas simpáticas. Adaptado de Bean (1989).

los canales de calcio era debida a un cambio en la dependencia del voltaje de la activación y sugirió que dicha regulación era llevada a cabo por las proteínas G (8). Este autor sugirió que el corrimiento en la curva de activación hacia voltajes más positivos, por la aplicación de un activador de las proteínas G, se puede explicar por la coexistencia de dos poblaciones: una población no regulada (dispuesta), que requiere despolarizaciones moderadas para abrirse, y una población regulada (reluctante), que requiere de fuertes despolarizaciones para abrirse (Fig. 4).

El mecanismo de regulación de los Cav2.2 por proteínas G está acoplado a dos rutas de señalización que activan a los receptores  $G\alpha_{i/o}$  y  $G\alpha_{q/11}$  (37).

La vía de regulación acoplada a  $G\alpha_{i/o}$  involucra al dímero  $G\beta\gamma$ , el cual se une a la membrana plasmática por medio de la subunidad  $G\gamma$ . Esta regulación se desarrolla en menos de 1s, está delimitada a la membrana y es dependiente del voltaje (38). El dímero  $G\beta\gamma$  interactúa directamente con la subunidad Cav2.2 $\alpha$ , enlenteciendo la activación (9), reduciendo la amplitud de la corriente y desplazando la dependencia del voltaje de la curva de activación hacia voltajes más positivos (39). Se ha sugerido que la regulación del dímero  $G\beta\gamma$  es liberada por un pulso fuertemente despolarizante (10). Por otra parte, se ha sugerido que la vía reguladora correspondiente a la subunidad  $G\alpha_{q/11}$ , se lleva a cabo por la molécula del fosfatidilinositol-4,5 difosfato (PIP<sub>2</sub>) y su regulación no se libera por un pulso fuertemente despolarizante (40).

### **2.2.3. Regulación de la inactivación de los Cav2.2 por el dímero Gβγ**

En los registros de corriente macroscópica, la inactivación se define como una disminución en la amplitud de la corriente durante la aplicación de un pulso de voltaje despolarizante. La disminución de la corriente se debe a la transición del canal a un estado no conductor; a partir del cual, disminuye su disponibilidad para abrirse a potenciales más positivos y sólo se puede recuperar de este estado por medio de pulsos hiperpolarizantes (41). En los canales de calcio, la inactivación es dependiente tanto del voltaje (VDI) como de los iones de  $\text{Ca}^{2+}$  (CDI). Ambos mecanismos son fácilmente separables al reemplazar el calcio extracelular por  $\text{Ba}^{2+}$ . La CDI se activa con el incremento del calcio intracelular y es mediada por la activación de la calmodulina (42). Por otra parte, la VDI puede ocurrir desde estados cerrados o abiertos, y exhibe múltiples componentes cinéticos asociados a distintos procesos relacionados con la inactivación (43).

Se ha reportado que los Cav2.2 presentan CDI y VDI, siendo esta última la predominante (44). La VDI, en los Cav2.2, presenta inactivación de estados cerrados y abiertos (45). Se ha sugerido que el dímero Gβγ regula la inactivación de los estados cerrados (31). Sin embargo, se desconoce el mecanismo molecular que correlaciona la parte estructural con la regulación del dímero Gβγ. Se ha propuesto la participación del asa I-II de la subunidad Cav2.2α como la responsable del componente rápido de la inactivación y se ha sugerido que esta asa interactúa con el dímero Gβγ. Aunque, no se ha realizado un estudio detallado de la regulación que ejerce el dímero Gβγ sobre la inactivación de los Cav2.2.

### 3. Planteamiento del problema

La regulación de los canales de calcio Cav2.2 por las proteínas G ha sido objeto de estudio por más de 30 años. La mayoría de los estudios se han enfocado en la regulación de la activación de los Cav2.2 por las proteínas G. A partir de estos estudios se estableció que la regulación dependiente del voltaje es conducida por el dímero  $G\beta\gamma$  (25, 46), induciendo en los Cav2.2 un enlentecimiento cinético en la activación (9), una disminución en la amplitud de la corriente principalmente a voltajes moderados y, un desplazamiento en la curva de activación hacia voltajes más positivos (8). Por otra parte, se ha propuesto que los efectos inducidos en la inactivación de los Cav2.2 por el dímero  $G\beta\gamma$  es una consecuencia de la regulación por este dímero durante la activación (14), sugiriendo que la inactivación de los Cav2.2 no es afectada por el dímero  $G\beta\gamma$ . Sin embargo, Weiss y colaboradores (2007) mostraron que al activar las proteínas G con DAMGO, un agonista de GPCRs que reproduce la regulación de los Cav2.2 por proteínas G, la inactivación se enlentece (13). Asimismo, la norepinefrina, otro agonista de GPCRs que reproduce la regulación dependiente del voltaje por el dímero  $G\beta\gamma$  (47), también enlentece la inactivación de los Cav2.2 (9). Estos hallazgos experimentales sugieren que la inactivación de los Cav2.2 se enlentece por el dímero  $G\beta\gamma$ .

Las neuronas simpáticas de rata son un modelo clásico en el estudio de la regulación de los Cav2.2 por proteínas G. En esta preparación experimental, la inactivación presenta un componente rápido y uno lento. Por ello, el presente trabajo se enfocó en determinar si el enlentecimiento en la inactivación de los Cav2.2 por las proteínas G se debe a que el dímero  $G\beta\gamma$  enlentece el componente rápido y/o lento que forman parte de la inactivación de los Cav2.2.

## **4. Hipótesis**

El dímero  $G\beta\gamma$  enlentece el componente de inactivación rápida y/o lenta de los  $Ca_v2.2$  en neuronas simpáticas de rata.

## **5. Objetivos**

### **5.1. Objetivo general**

Mostrar que el dímero  $G\beta\gamma$  enlentece los componentes de inactivación de los  $Ca_v2.2$  en neuronas simpáticas de rata.

### **5.2. Objetivos específicos**

1. Seleccionar qué dímero  $G\beta\gamma$  reproduce la regulación dependiente e independiente del voltaje.
2. Determinar el porcentaje de inhibición en la inactivación de los  $Ca_v2.2$  por el dímero  $G\beta\gamma$ .
3. Hacer un análisis cinético del efecto de los dímeros  $G\beta\gamma$  en los componentes de la inactivación de los  $Ca_v2.2$ .
4. Determinar el efecto del dímero  $G\beta\gamma$  en la dependencia del voltaje de la inactivación de los  $Ca_v2.2$ .
5. Determinar el efecto del dímero  $G\beta\gamma$  en la recuperación de la inactivación de los  $Ca_v2.2$ .
6. Determinar el efecto del dímero  $G\beta\gamma$  en la conductancia macroscópica de los  $Ca_v2.2$ .

## **6. Métodos**

### **6.1. Cultivo primario de neuronas de rata**

Las neuronas del SCG fueron obtenidas de ratas macho de la cepa Wistar de 5 semanas de edad. Las ratas fueron cuidadas en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para el uso, cuidado y reproducción de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1990).

Las ratas fueron anestesiadas con CO<sub>2</sub> y posteriormente decapitadas. La cabeza fue enjuagada en una solución de cloruro de benzalconio al 70% y posteriormente colocada en posición rostral hacia arriba en una caja de Petri previamente tratada con agar. La piel y la musculatura del cuello fueron separadas por un corte medio sagital. Tomando como punto de referencia la tráquea, se exhibió la bifurcación de las carótidas, que es el sitio en donde se encuentran los ganglios cervicales superiores. Dichos ganglios fueron removidos de la bifurcación y colocados en una caja de Petri con solución Hank's, sobre hielo y con oxigenación constante. A cada ganglio se les retiró el tejido conectivo que los recubría y se les hizo de 8 a 10 cortes transversales. Después, fueron colocados en una solución Hank's con 20 U/mL de papaína e incubados a 37 °C, en baño maría, con agitación constante, durante 20 minutos. Una vez concluido este procedimiento, la solución con papaína fue sustituida por una solución Hank's con 1 mg/mL de colagenasa tipo I y 10 mg/mL de dispasa e incubados con agitación constante durante 40 min. En ocasiones, el tiempo de incubación para disociar a los ganglios con colagenasa no es suficiente, por lo que es necesario hacerlo manualmente con una pipeta de extremos romos con movimientos delicados. La reacción enzimática de la disociación de los

ganglios fue detenida con medio Leibovitz (L-15) más 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina estreptomicina. La muestra fue centrifugada a 100 g durante 8 minutos, retirando el sobrenadante y adicionando medio DMEM más 10% de suero fetal bovino y 1% de penicilina estreptomicina. Este último tratamiento a la muestra con DMEM fue repetido una vez más.

En cajas de Petri con 2 mL de medio DMEM fue colocado un anillo de poliestireno y adentro de éste una muestra de 50  $\mu$ L de las neuronas disociadas. La caja fue incubada a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>, durante seis horas previas a la microinyección.

## 6.2. Microinyección intranuclear de neuronas SCG

El método de microinyección se llevó a cabo utilizando un sistema compuesto por un microinyector (Eppendorf, Madison, WI, modelo 5242) y un micromanipulador (Eppendorf, Madison, WI, modelo 5171). Las neuronas del SCG fueron inyectadas con una solución de microinyección a una presión de 10 a 20 kPa durante 0.3 s. La solución de microinyección contenía el plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente mutada (YFP) fusionada con los distintos tipos de subunidades de las proteínas G ( $G\beta$ -YFP; 100 ng/ $\mu$ L;  $G\gamma_4$ ; 100 ng/ $\mu$ L), junto con 1 mg/mL de dextranfluoresceína (PM = 10,000 kDa). En algunos casos, para confirmar que el plásmido de fusión no alteraba las propiedades del dímero  $G\beta\gamma$ , algunas células fueron microinyectadas solo con el plásmido GFP (Proteína verde fluorescente, 100 ng/ $\mu$ L) y otras con el plásmido GFP, la subunidad  $G\beta$  (100 ng/ $\mu$ L) y la subunidad  $G\gamma$  (100 ng/ $\mu$ L). La expresión de todos los vectores fue dirigida por un promotor de citomegalovirus y los plásmidos fueron purificados con un kit comercial. El cDNA que codifica para la subunidad  $G\beta_1$  fue expresado en el plásmido pCDM8, el de la subunidad  $G\beta_3$  en el plásmido pCIS, el de la subunidad  $G\beta_5$  en el plásmido pcDNA I, la subunidad  $G\gamma_4$  en el plásmido pCI, la GFP en el plásmido pEGFP-N1 y la  $G\beta_1$ -GFP en plásmido pEYFPGb. Después de 18 a 24 horas de incubación las neuronas inyectadas con las subunidades  $G\beta_x\gamma_4$ , referidas como neuronas que sobreexpresaron la subunidad  $G\beta_x$ , fueron identificadas, por su color verde fluorescente, usando un microscopio invertido equipado con epifluorescencia (Axiovert 135; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Debido a que en todos los experimentos realizado en el presente trabajo siempre se inyectó a la subunidad  $G\gamma_4$  junto con la  $G\beta_x$ , solo mencionaremos de aquí en adelante a esta última.

### 6.3. Registro electrofisiológico

Las corrientes de los Cav2.2 en neuronas del SCG fueron registradas a temperatura ambiente (22-24 °C) por medio de la técnica de patch-clamp en configuración de célula entera, usando un amplificador EPC-9 (HEKA Instruments, Lambrecht/Pfalz, Germany). Los protocolos de voltaje fueron generados usando el software Patchmaster. La respuesta de la corriente registrada de los Cav2.2 fue digitalizada y almacenada usando el mismo software. Las pipetas de borosilicato (Kimax-51, Kimble Products, Toledo, Ohio, USA) fueron hechas con un estirador horizontal (P97, ) y llenadas con una solución interna ajustada a un pH de 7.2, cuya composición se muestra en la siguiente tabla:

<b>Solución interna</b>	
Compuesto	Concentración (mM)
CsCl	140
TEA-Cl	20
HEPES	10
BAPTA-Cs <sub>4</sub>	0.1
MgCl <sub>2</sub>	5
Na <sub>2</sub> ATP	5
Na <sub>2</sub> GTP	0.3
Leupeptina	0.1

La resistencia de las pipetas fue de 1.8 a 2 MΩ.

Durante el registro, las neuronas fueron perfundidas externamente (1-2 ml/min) con dos

soluciones; una que permitió el establecimiento del sello (solución de sello) ajustada a un pH de 7.4 y otra para registrar la corriente de  $Ba^{2+}$  a través de los  $Cav2.2$  (solución de registro) ajustada a un pH de 7.4. La composición de ambas soluciones se detalla a continuación.

<b>Solución de sello</b>	
Compuesto	Concentración (mM)
NaCl	63.6
TEA-Cl	103
MgCl <sub>2</sub>	2.9
Glucosa	8
HEPES	10
CaCl <sub>2</sub>	0.3
CdCl <sub>2</sub>	10

<b>Solución de registro</b>	
Compuesto	Concentración (mM)
TEA-Cl	165
BaCl <sub>2</sub>	2
HEPES	10
Glucosa	8
MgCl <sub>2</sub>	1
TTX	0.0002

Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Las corrientes de  $\text{Ba}^{2+}$  fueron muestreadas a 10 kHz y los transitorios capacitivos fueron eliminados por medio de la circuitería del EPC-9. Las resistencias en serie fueron compensadas >70% y no excedieron los  $10 \text{ M}\Omega$  ( $1.9 \pm 1.3 \text{ M}\Omega$ ).

#### 6.4. Análisis de los datos

El promedio de la capacitancia de las neuronas fue de  $74.56 \pm 1.3$  pF. Para cada célula, la densidad de la corriente se determinó midiendo su amplitud macroscópica y normalizándola con respecto a su capacitancia.

Para la caracterización electrofisiológica de la regulación de los Cav2.2 por el dímero G $\beta$  $\gamma$  se midió la amplitud de la corriente en el sexto milisegundo después de haber aplicado el pulso de voltaje despolarizante. La constante de tiempo del enlentecimiento cinético de la de activación se obtuvo al ajustar la corriente, durante los primeros 10 ms después de haber aplicado el pulso despolarizante, a una función exponencial simple:

$$I(t) = A e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)}$$

Donde  $I(t)$  es la densidad de la corriente,  $A$  es la fracción que forma el componente del enlentecimiento cinético y  $\tau$  representa la constante de tiempo. El índice de facilitación se calculó con el protocolo de prepulso de facilitación, el cual consiste en dos pulsos de voltaje idénticos (P1 y P2) a  $-8$  mV durante 7 ms, separados por un prepulso (PP) a  $-100$  mV durante 90 ms. La densidad de la corriente al pico del P2 se normalizó con respecto a la densidad de la corriente al pico del P1, denominando a este cociente: índice de facilitación (IF). La amplitud de la corriente, el enlentecimiento cinético y el índice de facilitación fueron los parámetros considerados para determinar que hubo una sobreexpresión adecuada del dímero G $\beta$  $\gamma$  en las neuronas del SCG por el método de microinyección. Solo las células microinyectadas que mostraron una reducción del 60% de su corriente, un enlentecimiento cinético mayor a 2 y un índice de facilitación mayor o igual a 3 fueron incluidas en el análisis de los datos.

El porcentaje de inactivación (inactivación %) fue calculado por medio de la siguiente ecuación:

$$I(t) = 1 - \frac{I_{500\text{ ms}}}{I_{7\text{ ms}}}$$

Donde  $I(t)$  es la amplitud de la corriente durante la aplicación del pulso,  $I_{7\text{ ms}}$  e  $I_{500\text{ ms}}$  son las amplitudes de las corrientes medidas a los 7 y a los 500 ms después de haber aplicado el pulso despolarizante. El decaimiento de la corriente fue ajustado a una función exponencial doble:

$$I(t) = A_r e^{-\frac{t}{\tau_r}} + A_l e^{-\frac{t}{\tau_l}} + Y_0$$

Donde la  $I(t)$  es la amplitud de la corriente,  $A$  es la fracción de la amplitud de los componentes de inactivación,  $Y_0$  es la corriente residual y,  $\tau_r$  y  $\tau_l$  son las constantes de tiempo rápida y lenta, respectivamente. La tasa de cambio de la amplitud de la corriente de  $\text{Ba}^{2+}$  ( $\Delta(I_{\text{Ba}^{2+}})$ ) fue obtenida como un cociente, tal como se describe en la siguiente ecuación:

$$\Delta(I_{\text{Ba}^{2+}}) = \frac{I_n - I_{n+1}}{I_n}$$

Donde  $I_n$  representan la medida de la densidad de la corriente al tiempo  $t$  e  $I_{n+1}$  a los 20 ms después, durante la aplicación del pulso despolarizante.

La curva de inactivación en estado estacionario fue obtenida a partir de la aplicación de dos pulsos idénticos a -8 mV con una duración de 7 ms (prepulso y postpulso) y entre estos pulsos un pulso variable de voltaje de -110 a 0 mV, con incrementos de 10 mV, durante 40 s (pulso condicionante). Los puntos experimentales de la curva de inactivación en estado estacionario fueron calculados a partir del cociente entre la corriente al pico del prepulso con respecto al postpulso. Los puntos experimentales fueron graficados con respecto al voltaje del pulso

condicionante y ajustados a una función de Boltzmann:

$$f = \frac{I_{max}}{1 + e^{\frac{V-V_m}{k}}}$$

Donde  $I_{max}$  es la fracción disponible de la corriente,  $V_m$  es el voltaje de la mitad de canales disponibles, y  $K$  es la dependencia del voltaje.

La recuperación de la inactivación se obtuvo usando un protocolo de doble pulso. Primero, se aplicó un pulso condicionante a  $-8$  mV durante 500 ms, seguido por un pulso a  $-100$  mV con duración variable desde 1 ms hasta 10 s, antes de aplicar un pulso de prueba a  $-8$  mV por 7 ms. La corriente al pico del pulso de prueba fue normalizada con la corriente al pico del pulso condicionante. Los puntos experimentales de la recuperación fueron graficados con respecto a la duración del interpulso.

La conductancia se calculó midiendo la amplitud de la corriente a 20 y 200 ms durante la aplicación de una serie de pulsos de voltaje, de acuerdo con la ecuación:

$$G(V) = \frac{I}{V_a - V_r}$$

Donde  $G(V)$  es la conductancia a cada uno de los voltajes,  $I$  es la amplitud de la corriente,  $V_a$  es el potencial de membrana aplicado durante el pulso despolarizante, y  $V_r$  es el potencial de inversión. La relación conductancia voltaje de los datos experimentales fue ajustada con una función de Boltzmann:

$$G(V) = G_{max} \left( 1 + e^{\frac{V_h - V}{k}} - 1 \right)$$

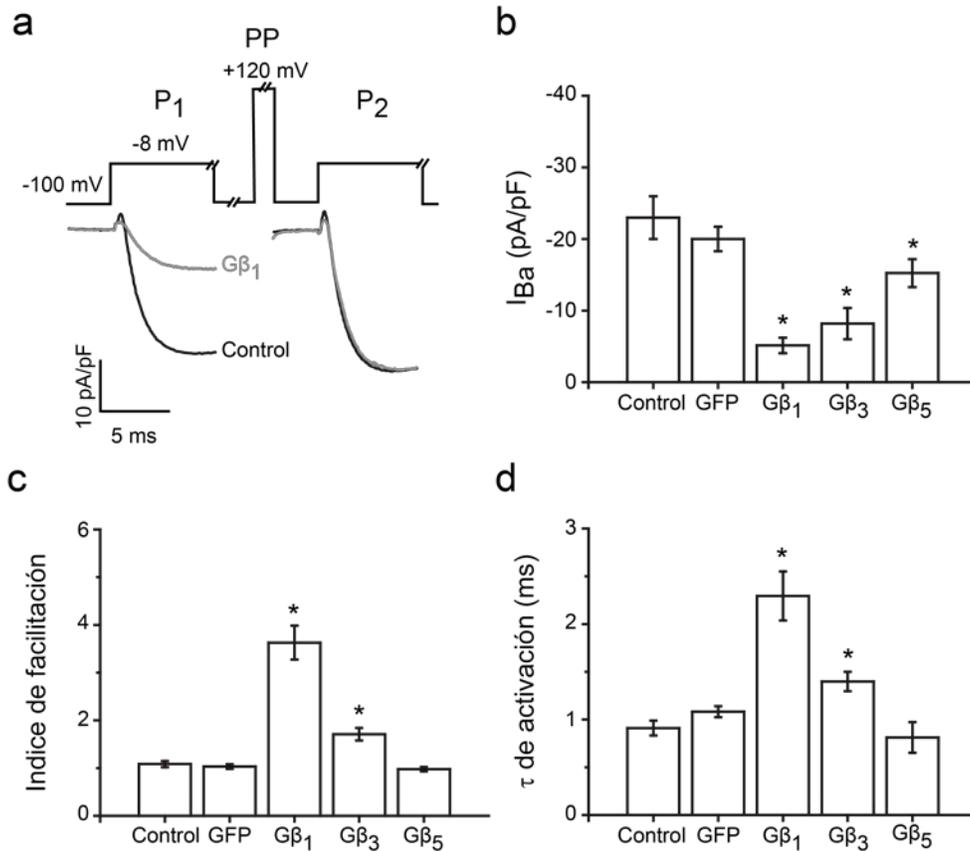
Donde  $G_{max}$  es la conductancia máxima,  $V_h$  es la activación media, y  $K$  es el factor pendiente.

## 7. Resultados

### 7.1. La inhibición de los Cav2.2 por la subunidad Gβ<sub>1</sub> es dependiente del voltaje, mientras que por la subunidad Gβ<sub>5</sub> es resistente al voltaje

La inhibición dependiente del voltaje de los Cav2.2 se lleva a cabo por la subunidad Gβγ (25, 46), siendo la subunidad Gβ la que interactúa directamente con la subunidad Cav2.2α (38). Hasta hoy, se han descrito cinco subtipos de subunidades Gβ (Gβ<sub>1-5</sub>). De acuerdo con Khan y colaboradores (2013), la similitud en la secuencia lineal de los aminoácidos (indicado entre paréntesis) de las subunidades, con respecto a la subunidad Gβ<sub>1</sub>, presenta el siguiente ordenamiento Gβ<sub>1</sub> > Gβ<sub>2</sub> (90%) = Gβ<sub>4</sub> (90%) > Gβ<sub>3</sub> (83%) >> Gβ<sub>5</sub> (52%) (48). Considerando lo anterior, se evaluaron las características electrofisiológicas de la regulación dependiente del voltaje de los Cav2.2 en neuronas que sobreexpresaron las subunidades Gβ<sub>1</sub>, Gβ<sub>3</sub> y Gβ<sub>5</sub>. Se aplicó un protocolo de doble pulso, el cual consiste en dos pulsos de voltaje idénticos a -8 mV durante 7 ms (P1 y P2) y entre éstos, un pulso de voltaje a +120 mV con una duración de 90 ms (PP), tal como se muestra en la Fig. 5. La sobreexpresión de las subunidades Gβ<sub>1</sub> o Gβ<sub>3</sub> reduce la densidad de la corriente con respecto a las neuronas sin inyectar, de aquí en adelante denominadas control, o con aquellas que solo sobreexpresaron la proteína GFP. La densidad de la corriente máxima en neuronas control ( $I_{\text{control}}$ ) fue de  $-23 \pm 2.98$  pA/pF, mientras que en las que expresaron GFP ( $I_{\text{GFP}}$ ) fue de  $-20 \pm 1.71$  pA/pF, la densidad de la  $I_{\text{G}\beta_1}$  fue de  $-5.14 \pm 1.08$  pA/pF y de la  $I_{\text{G}\beta_3}$  fue de  $-8.17 \pm 2.17$  pA/pF (Fig. 5a, b). Las subunidades Gβ<sub>1</sub> y Gβ<sub>3</sub> incrementaron el IF. El  $\text{IF}_{\text{control}}$  fue de  $1.08 \pm 0.06$ , el  $\text{IF}_{\text{GFP}}$  fue de  $1.03 \pm 0.05$ , el  $\text{IF}_{\text{G}\beta_1}$  fue de  $3.6 \pm 0.4$  y el  $\text{IF}_{\text{G}\beta_3}$  fue de  $1.71 \pm 0.13$

(Fig. 5c). Las subunidades  $G\beta_1$  y  $G\beta_3$  también produjeron un enlentecimiento cinético ( $\tau$ ). La



**Fig. 5 La inhibición de los Cav2.2 por la subunidad  $G\beta_1$  es dependiente del voltaje, mientras que la inhibición por la subunidad  $G\beta_5$  es independiente del voltaje.** (a) En la parte superior se muestra el protocolo a partir del cual fueron generados los trazos de de  $I_{Ba}^{2+}$  que se muestran en la parte inferior de la figura. En color gris se muestra el trazo de de  $I_{Ba}^{2+}$  de una neurona que sobreexpresó la subunidad  $G\beta_1$ , mientras que el trazo negro se muestra el registro de una neurona control. Resumen de (b) la densidad de la corriente ( $n = 7$ ), (c) el índice de facilitación y (d) la  $\tau$  de activación bajo las condiciones experimentales indicadas en cada panel (\* $p < 0.05$  vs. control).

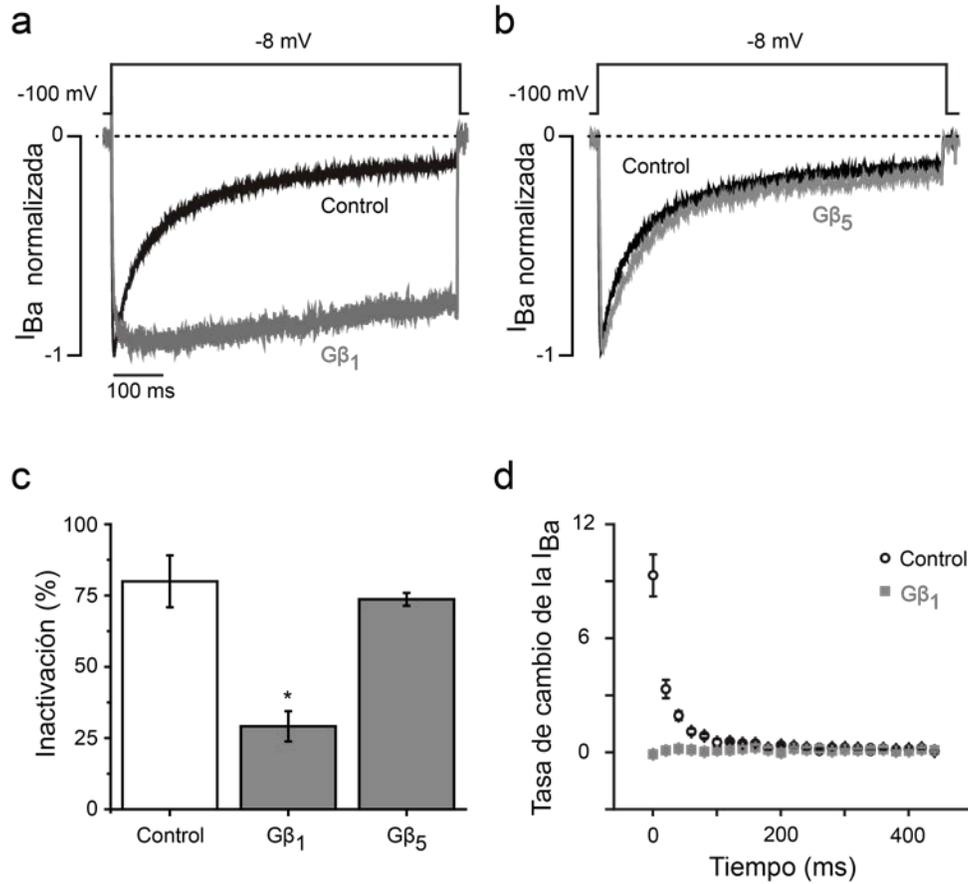
$\tau_{control}$  fue de  $0.9 \pm 0.08$  ms, la  $\tau_{GFP}$  fue de  $1.1 \pm 0.06$  ms, la  $\tau_{G\beta_1}$  fue de  $2.3 \pm 0.25$  ms y la  $\tau_{G\beta_3}$  fue de  $1.4 \pm 0.1$  ms (Fig. 5d). La subunidad  $G\beta_5$  solo redujo la densidad de la corriente ( $I_{G\beta_5} = -15.2 \pm 1.95$  pA/pF), en menor grado que la subunidad  $G\beta_1$  o  $G\beta_3$ , sin incrementar el índice de facilitación ( $IF_{G\beta_5} = 0.98 \pm 0.04$ ) ni el enlentecimiento cinético ( $\tau_{G\beta_5} = 0.8 \pm 0.16$  ms). De

acuerdo con estos resultados, la subunidad  $G\beta_1$  presenta una regulación predominantemente dependiente del voltaje, mientras que la subunidad  $G\beta_5$  presenta una regulación independiente del voltaje. Estos resultados concuerdan con hallazgos experimentales obtenidos por otros autores (38, 49, 50). Lo anterior sustenta que nuestros parámetros experimentales de inyección fueron adecuados para la sobreexpresión de cada una de las subunidades y que las subunidades  $G\beta_1$  y  $G\beta_5$  presentan dos mecanismos de regulación opuestos sobre los  $Ca_v2.2$ , lo cual nos proporciona la ventaja de conocer y profundizar más sobre el mecanismo que subyace en la regulación de la inactivación de estos canales por la subunidad  $G\beta$ .

## **7.2. El componente rápido de la inactivación de los Cav2.2 es inhibido por la subunidad G $\beta$ <sub>1</sub>, pero no por la subunidad G $\beta$ <sub>5</sub>**

El efecto antagónico en la regulación de los Cav2.2 por las subunidades G $\beta$ <sub>1</sub> y G $\beta$ <sub>5</sub> fue empleado para evaluar si estas subunidades afectaban la inactivación de los Cav2.2. Se aplicó un pulso despolarizante a  $-8$  mV durante 500 ms. Tal como se muestra en la Fig. 6, la inactivación de los Cav2.2 en neuronas sobreexpresadas con la subunidad G $\beta$ <sub>1</sub> se redujo en un  $62 \pm 3.25\%$  con respecto al control (control =  $80 \pm 9.1\%$ ; neuronas que sobreexpresaron la subunidad G $\beta$ <sub>1</sub> =  $30 \pm 6.3\%$ ; Fig. 6a y c). Mientras que en el caso de la sobreexpresión de la subunidad G $\beta$ <sub>5</sub> no hubo cambio en la inactivación (neuronas que sobreexpresaron la subunidad G $\beta$ <sub>5</sub> =  $73.7 \pm 2.3\%$ , Fig. 6b y c), mostrando que esta subunidad no regula la inactivación de los Cav2.2. Durante la aplicación del pulso de voltaje, los principales cambios inducidos por la subunidad G $\beta$ <sub>1</sub> ocurrieron al inicio del pulso de voltaje. Para corroborar esta observación se midió la tasa de cambio durante la inactivación. De modo interesante, la tasa de cambio en neuronas sobreexpresadas con la subunidad G $\beta$ <sub>1</sub> se mantuvo prácticamente lineal durante el decaimiento de la corriente, mientras que la inactivación de las neuronas control presenta un comportamiento bifásico, una fase rápida en los primeros 100 ms y posteriormente una fase lenta similar a las neuronas sobreexpresadas con la subunidad G $\beta$ <sub>1</sub> (Fig. 6d). Estos resultados muestran que la reducción de la inactivación por la subunidad G $\beta$ <sub>1</sub> se establece al principio del decaimiento de la corriente, sugiriendo que impide el desarrollo de un componente rápido en la inactivación de los Cav2.2. Para corroborar esta propuesta se procedió hacer un análisis cinético de la inactivación de los Cav2.2 en neuronas

sobreexpresadas con la subunidad  $G\beta_1$ .



**Fig. 6 La subunidad  $G\beta_1$  reduce la inactivación de los  $Ca_v2.2$ .** Trazos de  $I_{Ba}^{2+}$  de una neurona sobreexpresada con la subunidad  $G\beta_1$  (a) y con la subunidad  $G\beta_5$  (b) generados por el pulso de voltaje que se muestra en la parte superior en ambas secciones de la figura y comparados con un trazo de  $I_{Ba}^{2+}$  de una neurona control. (c) Resumen del porcentaje de la inactivación a 500 ms en neuronas control y sobreexpresadas con la subunidad  $G\beta_1$  y  $G\beta_5$  a 500 ms ( $n = 7$ ). (d) Tasa de cambio de la densidad de la de  $I_{Ba}^{2+}$  en neuronas control y expresadas con la subunidad  $G\beta_1$  durante 500 ms ( $n = 7$ ;  $*p < 0.05$  vs. control).

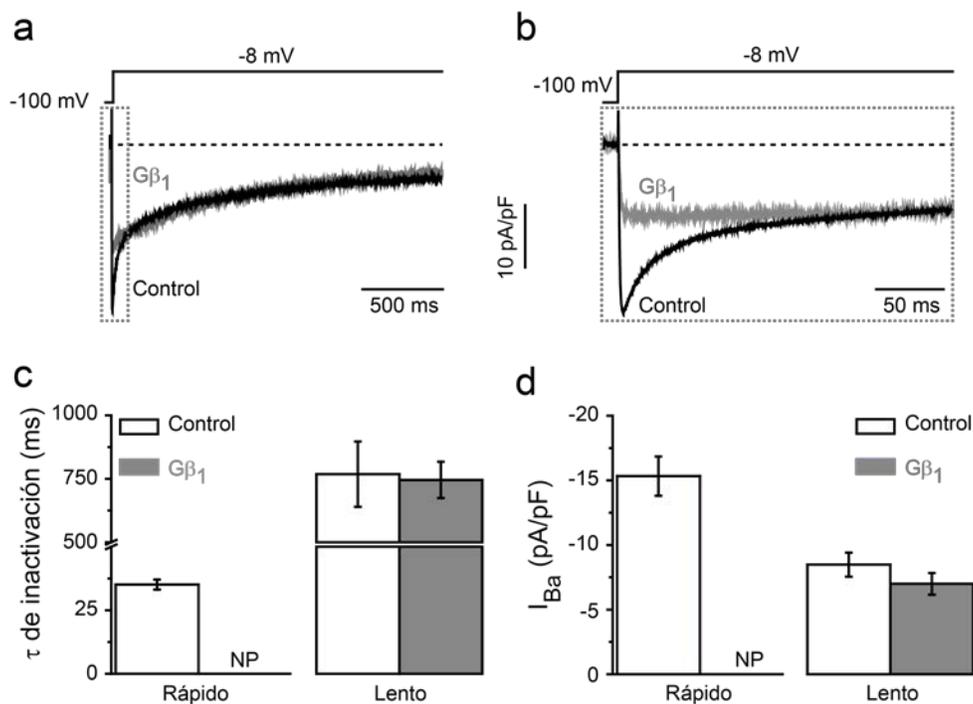
### **7.3. El componente rápido de la inactivación de los Cav2.2 es ocluido por la subunidad Gβ<sub>1</sub> a través de un mecanismo dependiente del voltaje**

Se ha sugerido que las proteínas G enlentecen la inactivación debido a un enlentecimiento cinético de la activación de los Cav2.2. Para investigar esta propuesta, se aplicó un pulso a -8 mV durante 2 s en neuronas sobreexpresadas con la subunidad Gβ<sub>1</sub>. Tal como se muestra en la Fig. 7a, los cambios inducidos por la subunidad Gβ<sub>1</sub> solo se observan durante los primeros 100 ms (Fig. 7b), sin ningún desplazamiento en la densidad de la corriente durante la aplicación del pulso de voltaje. Esto confirma que el enlentecimiento cinético inducido en la activación no retrasa la aparición de la inactivación de los Cav2.2, sugiriendo que la subunidad Gβ<sub>1</sub> solo afecta la inactivación rápida de los Cav2.2.

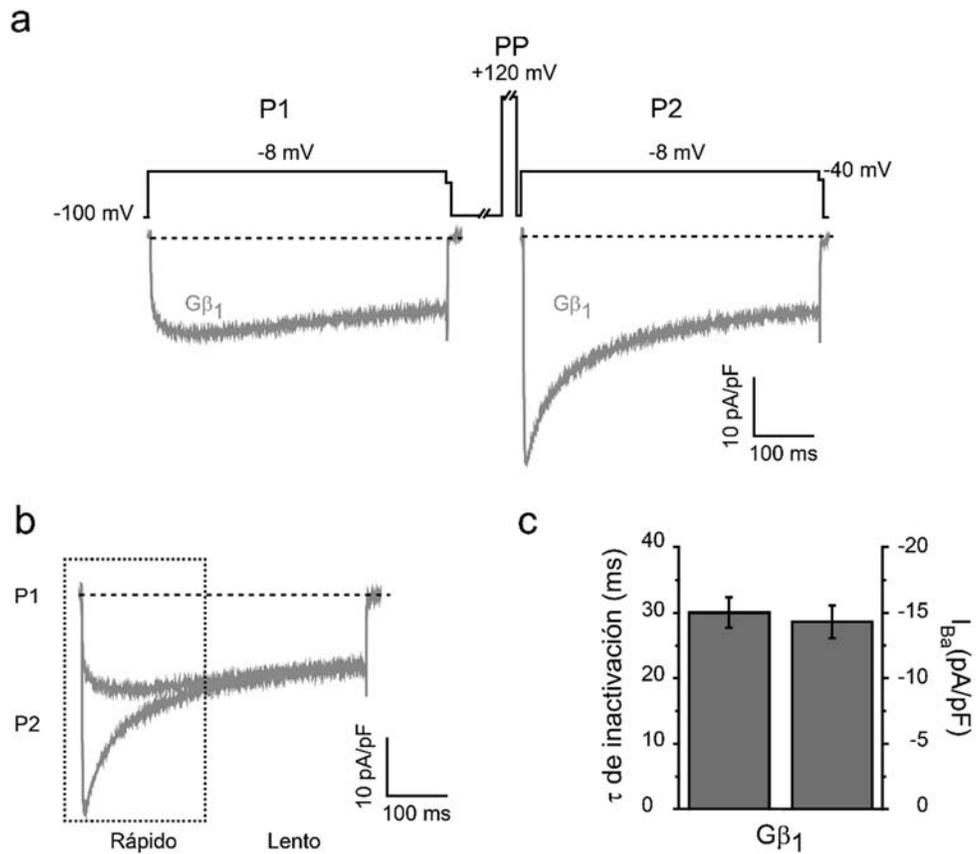
La inactivación de los Cav2.2 presenta un componente rápido y uno lento (12, 44). Para analizar a cada uno de los componentes se ajustó una función exponencial doble al decaimiento de la corriente de las neuronas control. La constante de tiempo del componente rápido en la inactivación fue de  $35 \pm 1.9$  ms, mientras que para el componente lento fue de  $768.16 \pm 128.6$  ms (Fig. 7c). La amplitud de la densidad corriente (A) fue de  $-15.3 \pm 1.5$  pA/pF para la inactivación del componente rápido y de  $-8.5 \pm 0.9$  pA/pF para la inactivación del componente lento (Fig. 7d). La misma función también se ajustó a la inactivación de neuronas que sobreexpresaron la subunidad Gβ<sub>1</sub>. Sin embargo, en este caso, el mejor ajuste del decaimiento de la corriente fue una función exponencial simple. La  $\tau$  de inactivación fue de  $745.8 \pm 71.5$  ms y la A fue de  $-7.0 \pm 0.8$  pA/pF (Fig. 7c, d). Los valores de la inactivación en neuronas sobreexpresadas con la subunidad Gβ<sub>1</sub> son similares a los valores del componente lento de la inactivación de neuronas control (Fig. 7c y d), lo cual sugiere que se

trata del mismo componente.

El  $Ca_v2.2$  es regulado por distintos tipos de proteínas, tal como las cinasas, que corresponden a una vía de señalización independiente de la regulación de la subunidad  $G\beta$  (48). Por ello, la ausencia del componente rápido en la inactivación de los  $Ca_v2.2$  podría deberse a un mecanismo ajeno a la subunidad  $G\beta$ . Para examinar esta posibilidad, se probó si un pulso fuertemente despolarizante, el cual es considerado como una herramienta para mostrar que la regulación dependiente del voltaje de los  $Ca_v2.2$  es llevada a cabo por la subunidad  $G\beta_1$  (10, 49), puede reestablecer el componente rápido en la inactivación (Fig. 8). En neuronas sobreexpresadas con la subunidad  $G\beta_1$ , el ajuste del decaimiento de la corriente pasó de ser monofásico (P1) a bifásico (P2), después de haber sido sometidas a un pulso fuertemente despolarizante (Fig. 8a). Los trazos de la corriente de P1 y P2 fueron sobrepuestos para indicar que el componente rápido en la inactivación es recuperado (Fig. 4b). Además, el decaimiento de la corriente de P2 fue ajustado a una función exponencial doble y los parámetros del componente rápido de la inactivación ( $A$  fue de  $-14.3 \pm 1.24$  pA/pF y  $\tau$  fue de  $30.02 \pm 2.4$  ms) son similares (Fig. 8c) a los parámetros reportados en las neuronas control (Fig. 7c y d). Estos resultados soportan la idea de que la subunidad  $G\beta_1$  impide la expresión del componente rápido en la inactivación.



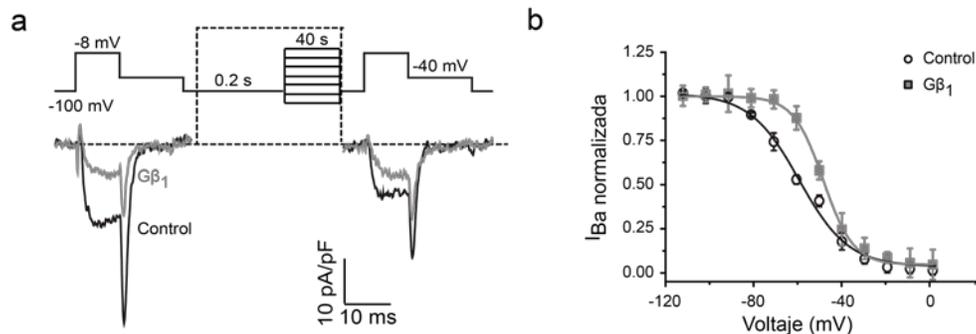
**Fig. 7 La inhibición de la inactivación rápida por la subunidad  $G\beta_1$  es dependiente del voltaje.** (a) Trazos de  $I_{Ba^{2+}}$  de neuronas control y sobreexpresadas con la subunidad  $G\beta_1$  generados por el protocolo de voltaje que se muestra en la parte superior de cada una de las figuras. (b) Exhibe los primeros 200 ms del panel a (indicado en el recuadro de líneas punteadas). (c) Resumen de la constante de tiempo ( $\tau$ ) de la inactivación de neuronas control y sobreexpresadas con la subunidad  $G\beta_1$  (n=7). (d) Resumen de la densidad de corriente máxima (A) de la inactivación rápida y lenta de neuronas control y sobreexpresadas con la subunidad  $G\beta_1$ , NP indica que no está presente.



**Fig. 8 El componente rápido de la inactivación de los Cav2.2 es recuperado por un pulso fuertemente despolarizante.** (a) Trazo de  $I_{Ba^{2+}}$  representativo de una neurona sobreexpresada con la subunidad  $G\beta_1$  generado por el protocolo que se muestra en la parte superior del panel. (b) Trazos de  $I_{Ba^{2+}}$  de la corriente del P1 y P2 de una neurona sobreexpresada con la subunidad  $G\beta_1$ . La sección con líneas punteadas indica la recuperación del componente rápido de la inactivación. (c) Resumen de los valores de la amplitud de la densidad corriente ( $A$ ) y de la constante de tiempo ( $\tau$ ) del componente recuperado en el P2 ( $n = 6$ ).

#### 7.4. La subunidad $G\beta_1$ regula la dependencia del voltaje de la inactivación de los $Ca_v2.2$ y reduce la fracción de los canales inactivados.

Previamente se sugirió que la regulación de los  $Ca_v2.2$  por la subunidad  $G\beta_1$  está relacionada con la dependencia del voltaje de la inactivación. Por lo que evaluamos la regulación de la inactivación en el estado estacionario en neuronas que sobreexpresaron la subunidad  $G\beta_1$ . En la Fig. 9a se muestra que en neuronas sobreexpresadas, los trazos generados a  $-8$  mV tienen una densidad de corriente similar antes y después de haber aplicado un interpulso a  $-70$  mV, mientras que en neuronas control esta amplitud es reducida en un 25%. Como una consecuencia de esta reducción, la curva de inactivación de neuronas sobreexpresadas con la subunidad  $G\beta_1$  se desplaza hacia voltajes más positivos ( $V_m = -58.07$  para neuronas control

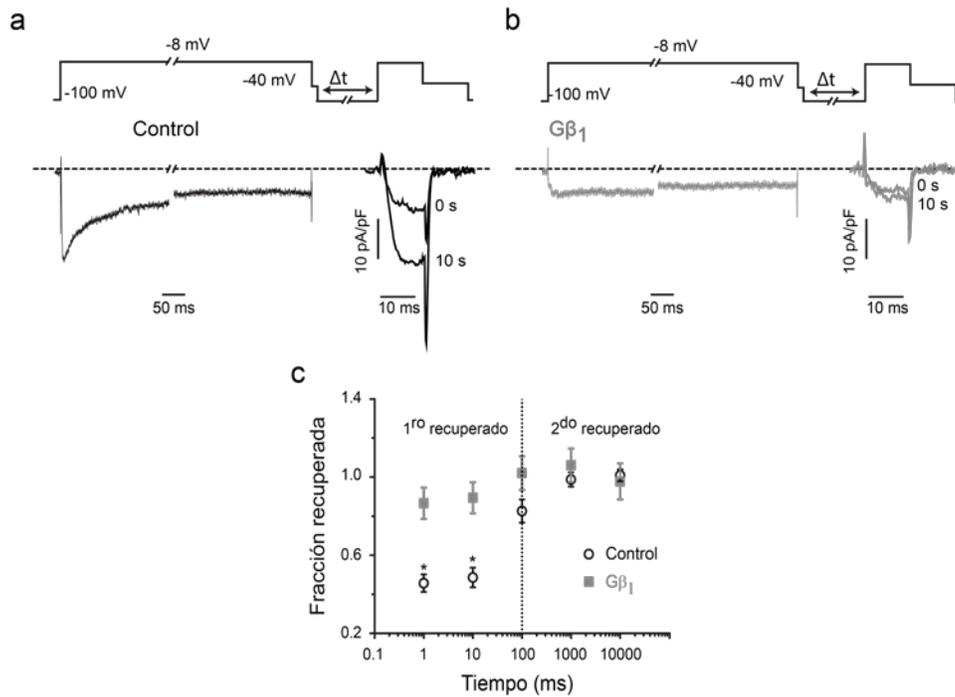


**Fig. 9 La subunidad  $G\beta_1$  regula la dependencia del voltaje de la inactivación de los  $Ca_v2.2$ .** (a) Trazos de de  $I_{Ba}^{2+}$  de neuronas control y sobreexpresadas con la subunidad  $G\beta_1$ . Los trazos fueron evocados a partir del protocolo que se muestra en la parte superior del panel. (b) Curva de inactivación en estado estacionario de neuronas control (círculos vacíos,  $n = 7$ ) y sobreexpresadas con la subunidad  $G\beta_1$  (cuadrados rellenos,  $n = 7$ ). La línea continua representa el ajuste a los puntos experimentales a una función de Boltzmann.

y  $V_m = -48.2$  mV para neuronas que sobreexpresadas). El desplazamiento de la curva de inactivación se observó en un rango del voltaje de  $-30$  a  $-70$  mV (Fig. 9b). Además, se evaluó

la curva de recuperación de la inactivación de los Cav2.2 en neuronas que sobreexpresaron la subunidad G $\beta$ <sub>1</sub> por medio de la aplicación de un protocolo de doble pulso, el cual consiste en aplicar un pulso despolarizante de larga duración (500 ms), durante el cual los canales entran en un estado inactivado, seguido de un pulso hiperpolarizante (-100 mV) con duración variable, a partir del cual los canales se recuperan gradualmente, y finalmente, un pulso despolarizante que determina la fracción de canales que se han recuperado de la inactivación (Fig. 10a, b). En la Fig. 10c, se muestra una comparación de la recuperación de la inactivación en neuronas sobreexpresadas y en neuronas control. Las neuronas que sobreexpresaron la subunidad G $\beta$ <sub>1</sub> mostraron una reducción en la fracción de los Cav2.2 recuperados durante los primeros 100 ms. De modo interesante, el curso temporal de la recuperación fue el mismo entre neuronas sobreexpresadas con la subunidad G $\beta$ <sub>1</sub> y las neuronas control (Fig. 10c). Estos datos muestran que en las neuronas sobreexpresadas con la subunidad G $\beta$ <sub>1</sub> se incrementó la

fracción de canales en estado inactivado.

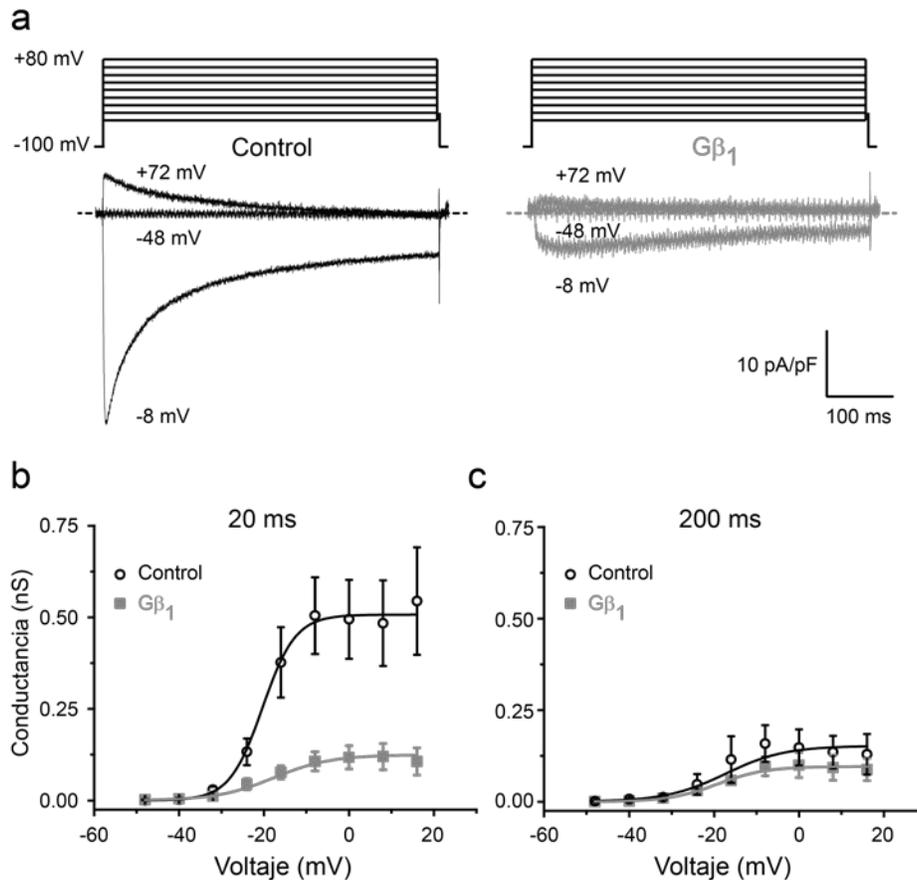


**Fig. 10 La subunidad  $G\beta_1$  reduce la fracción de canales inactivados.** Trazos de  $I_{Ba^{2+}}$  de neuronas (a) control y (b) sobreexpresadas con la subunidad  $G\beta_1$ . Los trazos fueron obtenidos con los protocolos que se muestran en la parte superior de cada panel. (c) Recuperación de la inactivación a  $-100$  mV en neuronas control ( $n = 3$ ) y sobreexpresadas con la subunidad  $G\beta_1$ . La línea punteada separa dos componentes de recuperación de la inactivación.

### 7.5. La subunidad $G\beta_1$ reduce la conductancia macroscópica de los $Cav_{2.2}$

Se ha reportado en los canales de sodio y potasio que la conductancia incrementa al eliminar la inactivación (51). Similarmente, nosotros observamos que la subunidad  $G\beta_1$  reduce la inactivación de los  $Cav_{2.2}$ . Por ello, se examinó si la ausencia del componente rápido de la inactivación modifica la conductancia de los  $Cav_{2.2}$ . La relación conductancia-voltaje fue calculada a 20 y 200 ms usando una serie de pulsos de  $-100$  hasta  $+80$  mV de 500 ms (Fig.

11a). A 20 ms, la conductancia máxima fue de  $0.5 \pm 0.024$  nS en neuronas control, mientras que la conductancia fue reducida a  $0.11 \pm 0.006$  nS en neuronas sobreexpresadas con la



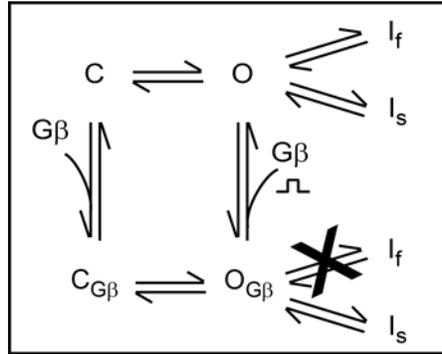
**Fig. 11 La subunidad Gβ<sub>1</sub> reduce la conductancia macroscópica de los Ca<sub>v</sub>2.2.** Trazos representativos de la de I<sub>Ba</sub><sup>2+</sup> a distintos voltajes de neuronas (a) control y (b) sobreexpresadas con la subunidad Gβ<sub>1</sub>. Los trazos de la I<sub>Ba</sub><sup>2+</sup> fueron generados con los protocolos que se muestran en la parte superior de cada panel. Las curvas de conductancia en neuronas control (círculos vacíos, n = 7) y sobreexpresadas con la subunidad Gβ<sub>1</sub> (cuadrados, n = 7) a 20 ms (c) y 200 ms (d). La línea continua indica el ajuste a una función de Boltzmann de los puntos experimentales.

subunidad Gβ<sub>1</sub> (Fig. 11b). Sin embargo, a 200 ms la conductancia máxima en neuronas control fue de  $0.12 \pm 0.018$  nS, la cual fue similar a la conductancia medida en neuronas sobreexpresadas con la subunidad Gβ<sub>1</sub> ( $0.09 \pm 0.006$  nS; Fig. 11c). Estos datos sugieren que una fracción sustancial de los Ca<sub>v</sub>2.2 se encuentran en un estado no conductor y de acuerdo

con nuestros resultados anteriores sustenta que la ausencia del componente rápido de la inactivación de los  $Ca_v2.2$  en neuronas sobreexpresadas con el dímero  $G\beta\gamma$  podría deberse al incremento de una fracción de canales en estado inactivado.

## 8. Discusión

En el presente trabajo de tesis se estudió el efecto del dímero  $G\beta\gamma$  sobre la inactivación



**Fig. 11 Esquema representativo de la regulación de la inactivación de los Cav2.2** C, es el estado cerrado; O, es el estado abierto; If, es el estado de inactivación rápida; Is, es el estado de inactivación lento;  $C_{G\beta}$ , es el estado cerrado regulado y  $O_{G\beta}$  es el estado regulado abierto.

de los Cav2.2 y nuestro principal hallazgo fue que la subunidad  $G\beta_1$  impide la inactivación rápida de la inactivación de los Cav2.2. En contraste con nuestra hipótesis, basada en la propuesta hecha por el grupo de De Waard, el cual sugiere que el dímero  $G\beta\gamma$  enlentece la inactivación de los Cav2.2 (13). Con base en esta propuesta, se aplicó un pulso despolarizante de larga duración, en neuronas sobreexpresadas con el dímero  $G\beta\gamma$ , suficiente para descartar que el enlentecimiento inducido en la activación no retrasa o enlentece los componentes de la activación de los Cav2.2. En este trabajo también descartamos la posibilidad de que el enlentecimiento de la activación enmascare el componente rápido de inactivación (31); ya que, el enlentecimiento cinético de la activación se desarrolla antes ( $\tau = 2.3$  ms) que el componente rápido de la inactivación ( $\tau = 35$  ms) de los Cav2.2.

La ausencia del componente rápido en la inactivación de neuronas sobreexpresadas con el dímero  $G\beta\gamma$  se puede explicar de acuerdo con la teoría propuesta por Bean (1989). De acuerdo con este autor, la regulación de los  $Cav2.2$  por las proteínas G lleva al canal de un estado no regulado (dispuesto) a uno regulado (reluctante) por las proteínas G. Ambos, estados presentan características biofísicas distintas que permite distinguirlos de forma experimental. Quizás, la diferencia biofísica más notable, ante la sobreexpresión del dímero  $G\beta\gamma$ , es el corrimiento de la curva de activación hacia voltajes despolarizantes (el umbral de activación  $>0$  mV). Curiosamente, la regulación de los  $Cav2.2$  por el dímero  $G\beta\gamma$  sucede principalmente a potenciales moderados (de 20 a +20 mV), evidenciando que los canales reluctantes están ausentes a estos voltajes y sugiriendo que los canales en estado dispuesto son regulados por el dímero  $G\beta\gamma$ . Hasta hoy en día, se ha sugerido que el dímero  $G\beta\gamma$  interactúa con el asa citoplasmática I y II (52, 53), el amino terminal NH<sub>2</sub> (54) y el carboxilo terminal (55) de la subunidad  $Cav2.2\alpha$ . La afinidad particular que el dímero  $G\beta\gamma$  presenta por cada uno de estos sitios es desconocido. Sin embargo, se ha sugerido que el asa I-II de la subunidad  $Cav2.2\alpha$  podría ser la causante de la inactivación rápida de los  $Cav2.2$ . De modo interesante, hay una interacción directa entre el dímero  $G\beta\gamma$  y el asa I-II de la subunidad  $Cav2.2\alpha$  que ha sido asociado con la reluctancia del canal. Por lo cual, el componente rápido ausente en la inactivación podría deberse a una fracción de la población que es atrapa por el dímero  $G\beta\gamma$ . La regulación de la inactivación de los  $Cav2.2$  por el dímero  $G\beta_1\gamma_4$  se resume en la Fig. 11. Los canales no regulados transitan de un estado cerrado a un estado abierto, seguidos por un estado de inactivación rápida o lenta. En la presencia del el dímero  $G\beta_1\gamma_4$ , el cual se une al canal en estado cerrado. Los canales regulados se activan, pero solo pueden

transitar al estado con lenta inactivación. Bajo estas condiciones, un pulso fuertemente despolarizante de voltaje desune el dímero  $G\beta_1\gamma_4$  del canal, permitiendo que el canal nuevamente pueda pasar a un estado con una rápida o una lenta inactivación. En el diagrama se muestra que la inactivación esta acoplada a la activación, tal como también se ha descrito en canales de sodio. En estos canales, la amplitud de la densidad de la corriente incrementa cuando se elimina la inactivación. Ya que estos dos procesos están acoplados (51). Similarmente, la inactivación y la activación están acoplados en los  $Cav2.2$  (56). Sin embargo, esto no concuerda con nuestros resultados. Ya que la ausencia del componente rápido en la inactivación de los  $Cav2.2$  sugiere que el dímero  $G\beta\gamma$  desacopla el componente rápido de la inactivación. Por lo que uno debería esperar un aumento en la amplitud de la densidad de la corriente. A diferencia de esto, se observó una disminución en la amplitud y en la conductancia en neuronas sobreexpresadas con el dímero  $G\beta_1\gamma_4$ . Estos resultados sugieren que la regulación del componente rápido de inactivación por el dímero  $G\beta_1\gamma_4$  no es debido a un desacoplamiento de la inactivación del estado abierto del canal. Por lo cual este efecto sería, exclusivamente, de estados cerrados, concordante con nuestros resultados. En registros de canal unitario, se ha mostrado que la activación de proteínas G por norepinefrina disminuye la probabilidad de encontrar registros de canal con rápida probabilidad de apertura (57) y como consecuencia una disminución en la conductancia macroscópica. Previos modelos han sugerido que el sensor de voltaje de los  $Cav2.2$  es atrapado por el dímero  $G\beta\gamma$  (58) desde estados cerrados (59), sugiriendo que la ausencia del componente rápido de inactivación en neuronas sobreexpresadas con el dímero  $G\beta_1\gamma_4$  surge a partir del atrapamiento del sensor de voltaje de los  $Cav2.2$  en estado cerrado. En consecuencia, el dímero  $G\beta_1\gamma_4$

impide la transición del estado cerrado del canal al estado abierto con inactivación rápida. Aunque nuestro modelo experimental ha sido utilizado para entender la regulación de los Cav2.2 por las proteínas G, este se limita a responder porqué el dímero  $G\beta_1\gamma_4$  preferentemente afecta la inactivación rápida. Es necesario realizar más experimentos para entender el mecanismo de regulación.

El rol fisiológico de la inhibición del componente rápido de la inactivación de los Cav2.2 por el dímero  $G\beta_1\gamma_4$  es desconocido. El proceso es complejo e involucra varios componentes. Aunque ratones deficientes con el gen que codifica para esta subunidad muestran defectos en el desarrollo del tubo neural y microcefalia (60), mostrando la importancia de la subunidad  $G\beta_1$  durante el desarrollo embrionario. Por otra parte, se ha mostrado que tanto la regulación de las subunidades de las proteínas G como la inactivación de los Cav2.2 disminuye las concentraciones de  $Ca^{2+}$  intracelular, el cual a su vez determina tanto la forma como la frecuencia de disparo de los potenciales de acción (61). Por ello, se ha sugerido que la regulación de la inactivación de los Cav2.2 por las subunidades  $G\beta$  está involucrada en la eficacia presináptica.

## 9. Referencias

1. Adams DJ, Berecki G. Mechanisms of conotoxin inhibition of N-type (Ca(v)2.2) calcium channels. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(7):1619-28.
2. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000;1(1):11-21.
3. Saris NE, Carafoli E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry (Mosc)*. 2005;70(2):187-94.
4. Stanika RI, Villanueva I, Kazanina G, Andrews SB, Pivovarova NB. Comparative impact of voltage-gated calcium channels and NMDA receptors on mitochondria-mediated neuronal injury. *J Neurosci*. 2012;32(19):6642-50.
5. Zamponi GW, Snutch TP. Advances in voltage-gated calcium channel structure, function and physiology. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(7):1521.
6. Currie KP. G protein modulation of CaV2 voltage-gated calcium channels. *Channels (Austin)*. 2010;4(6):497-509.
7. Zamponi GW. Determinants of G protein inhibition of presynaptic calcium channels. *Cell Biochem Biophys*. 2001;34(1):79-94.
8. Bean BP. Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature*. 1989;340(6229):153-6.
9. Marchetti C, Carbone E, Lux HD. Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflugers Arch*. 1986;406(2):104-11.
10. Elmslie KS, Zhou W, Jones SW. LHRH and GTP-gamma-S modify calcium current

activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron*. 1990;5(1):75-80.

11. Luebke JI, Dunlap K. Sensory neuron N-type calcium currents are inhibited by both voltage-dependent and -independent mechanisms. *Pflugers Arch*. 1994;428(5-6):499-507.
12. García-Ferreiro RE, Hernández-Ochoa EO, García DE. Modulation of N-type Ca<sup>2+</sup> channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons. *Pflugers Arch*. 2001;442(6):848-58.
13. Weiss N, Tadmouri A, Mikati M, Ronjat M, De Waard M. Importance of voltage-dependent inactivation in N-type calcium channel regulation by G-proteins. *Pflugers Arch*. 2007;454(1):115-29.
14. Zamponi GW. Regulation of presynaptic calcium channels by synaptic proteins. *J Pharmacol Sci*. 2003;92(2):79-83.
15. Dolphin AC. A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol*. 2006;147 Suppl 1:S56-62.
16. Arikath J, Campbell KP. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol*. 2003;13(3):298-307.
17. Jay SD, Ellis SB, McCue AF, Williams ME, Vedvick TS, Harpold MM, et al. Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science*. 1990;248(4954):490-2.
18. Cantí C, Bogdanov Y, Dolphin AC. Interaction between G proteins and accessory subunits in the regulation of 1B calcium channels in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*. 2000;527 Pt 3:419-32.
19. Chien AJ, Carr KM, Shirokov RE, Rios E, Hosey MM. Identification of palmitoylation sites within the L-type calcium channel beta2a subunit and effects on channel

function. *J Biol Chem*. 1996;271(43):26465-8.

20. Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, et al. The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron*. 2000;25(1):177-90.

21. Buraei Z, Yang J. Structure and function of the  $\beta$  subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(7):1530-40.

22. Berrow NS, Campbell V, Fitzgerald EM, Brickley K, Dolphin AC. Antisense depletion of beta-subunits modulates the biophysical and pharmacological properties of neuronal calcium channels. *J Physiol*. 1995;482 ( Pt 3):481-91.

23. Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, et al. The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca<sup>2+</sup>-channel gamma subunit. *Nat Genet*. 1998;19(4):340-7.

24. Rousset M, Cens T, Restituto S, Barrere C, Black JL, McEnery MW, et al. Functional roles of gamma2, gamma3 and gamma4, three new Ca<sup>2+</sup> channel subunits, in P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol*. 2001;532(Pt 3):583-93.

25. Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA. Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*. 1996;380(6571):258-62.

26. Chen J, DeVivo M, Dingus J, Harry A, Li J, Sui J, et al. A region of adenylyl cyclase 2 critical for regulation by G protein beta gamma subunits. *Science*. 1995;268(5214):1166-9.

27. Gamper N, Reznikov V, Yamada Y, Yang J, Shapiro MS. Phosphatidylinositol [correction] 4,5-bisphosphate signals underlie receptor-specific Gq/11-mediated modulation of N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci*. 2004;24(48):10980-92.

28. Chen H, Puhl HL, Niu SL, Mitchell DC, Ikeda SR. Expression of Rem2, an RGK family small GTPase, reduces N-type calcium current without affecting channel surface density. *J Neurosci.* 2005;25(42):9762-72.
29. Yokoyama CT, Sheng ZH, Catterall WA. Phosphorylation of the synaptic protein interaction site on N-type calcium channels inhibits interactions with SNARE proteins. *J Neurosci.* 1997;17(18):6929-38.
30. Stea A, Soong TW, Snutch TP. Determinants of PKC-dependent modulation of a family of neuronal calcium channels. *Neuron.* 1995;15(4):929-40.
31. McDavid S, Currie KP. G-proteins modulate cumulative inactivation of N-type (Cav2.2) calcium channels. *J Neurosci.* 2006;26(51):13373-83.
32. Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* 2005;85(4):1159-204.
33. Tedford HW, Zamponi GW. Direct G protein modulation of Cav2 calcium channels. *Pharmacol Rev.* 2006;58(4):837-62.
34. Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang XY. Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol.* 2016;428(19):3850-68.
35. Dunlap K, Fischbach GD. Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurones. *J Physiol.* 1981;317:519-35.
36. Dunlap K, Fischbach GD. Neurotransmitters decrease the calcium component of sensory neurone action potentials. *Nature.* 1978;276(5690):837-9.
37. Hille B. Modulation of ion-channel function by G-protein-coupled receptors. *Trends Neurosci.* 1994;17(12):531-6.

38. Garcia DE, Li B, Garcia-Ferreiro RE, Hernandez-Ochoa EO, Yan K, Gautam N, et al. G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci*. 1998;18(22):9163-70.
39. Patil PG, de Leon M, Reed RR, Dubel S, Snutch TP, Yue DT. Elementary events underlying voltage-dependent G-protein inhibition of N-type calcium channels. *Biophys J*. 1996;71(5):2509-21.
40. Vivas O, Arenas I, García DE. Voltage-independent inhibition of Ca(V)<sub>2.2</sub> channels is delimited to a specific region of the membrane potential in rat SCG neurons. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2012;44(6):544-9.
41. Ulbricht W. Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiol Rev*. 2005;85(4):1271-301.
42. Ben-Johny M, Dick IE, Sang L, Limpitikul WB, Kang PW, Niu J, et al. Towards a Unified Theory of Calmodulin Regulation (Calmodulation) of Voltage-Gated Calcium and Sodium Channels. *Curr Mol Pharmacol*. 2015;8(2):188-205.
43. Bean BP. Sodium channel inactivation in the crayfish giant axon. Must channels open before inactivating? *Biophys J*. 1981;35(3):595-614.
44. Goo YS, Lim W, Elmslie KS. Ca<sup>2+</sup> enhances U-type inactivation of N-type (CaV<sub>2.2</sub>) calcium current in rat sympathetic neurons. *Journal of neurophysiology*. 2006;96(3):1075-83.
45. Patil PG, Brody DL, Yue DT. Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron*. 1998;20(5):1027-38.
46. Ikeda SR. Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature*. 1996;380(6571):255-8.

47. Delmas P, Brown DA, Dayrell M, Abogadie FC, Caulfield MP, Buckley NJ. On the role of endogenous G-protein beta gamma subunits in N-type Ca<sup>2+</sup> current inhibition by neurotransmitters in rat sympathetic neurones. *J Physiol.* 1998;506 ( Pt 2):319-29.
48. Khan SM, Sleno R, Gora S, Zylbergold P, Laverdure JP, Labbé JC, et al. The expanding roles of Gβγ subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacol Rev.* 2013;65(2):545-77.
49. Ruiz-Velasco V, Ikeda SR. Multiple G-protein betagamma combinations produce voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels in rat superior cervical ganglion neurons. *J Neurosci.* 2000;20(6):2183-91.
50. Hernández-Castellanos JM, Vivas O, Garduño J, De la Cruz L, Arenas I, Elías-Viñas D, et al. Gβ<sub>2</sub> mimics activation kinetic slowing of CaV2.2 channels by noradrenaline in rat sympathetic neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;445(1):250-4.
51. Armstrong CM, Bezanilla F. Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol.* 1977;70(5):567-90.
52. Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW. Multiple structural elements in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels support their inhibition by G proteins. *Neuron.* 1996;17(5):991-1003.
53. Page KM, Cantí C, Stephens GJ, Berrow NS, Dolphin AC. Identification of the amino terminus of neuronal Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunits alpha1B and alpha1E as an essential determinant of G-protein modulation. *J Neurosci.* 1998;18(13):4815-24.
54. Cantí C, Page KM, Stephens GJ, Dolphin AC. Identification of residues in the N terminus of alpha1B critical for inhibition of the voltage-dependent calcium channel by Gbeta gamma. *J Neurosci.* 1999;19(16):6855-64.

55. García DE, Li B, García-Ferreiro RE, Hernández-Ochoa EO, Yan K, Gautam N, et al. G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci*. 1998;18(22):9163-70.
56. Jones LP, DeMaria CD, Yue DT. N-type calcium channel inactivation probed by gating-current analysis. *Biophys J*. 1999;76(5):2530-52.
57. Delcour AH, Tsien RW. Altered prevalence of gating modes in neurotransmitter inhibition of N-type calcium channels. *Science*. 1993;259(5097):980-4.
58. Zhong H, Li B, Scheuer T, Catterall WA. Control of gating mode by a single amino acid residue in transmembrane segment IS3 of the N-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(8):4705-9.
59. Colecraft HM, Patil PG, Yue DT. Differential occurrence of reluctant openings in G-protein-inhibited N- and P/Q-type calcium channels. *J Gen Physiol*. 2000;115(2):175-92.
60. Okae H, Iwakura Y. Neural tube defects and impaired neural progenitor cell proliferation in Gbeta1-deficient mice. *Dev Dyn*. 2010;239(4):1089-101.
61. Park D, Dunlap K. Dynamic regulation of calcium influx by G-proteins, action potential waveform, and neuronal firing frequency. *J Neurosci*. 1998;18(17):6757-66.

## 10. Material Anexo

# Fast Inactivation of $\text{Ca}_v2.2$ Channels Is Prevented by the $\text{G}\beta_1$ Subunit in Rat Sympathetic Neurons

Arturo Reyes-Vaca<sup>1</sup> · Lizbeth de la Cruz<sup>1</sup> · Julieta Garduño<sup>1</sup> · Isabel Arenas<sup>1</sup> · David E. García<sup>1</sup> 

Received: 29 June 2017 / Accepted: 10 October 2017  
© Springer Science+Business Media, LLC 2017

**Abstract** Voltage-dependent regulation of  $\text{Ca}_v2.2$  channels by G-proteins is performed by the  $\beta$  ( $\text{G}\beta$ ) subunit. Most studies of regulation by G-proteins have focused on channel activation; however, little is known regarding channel inactivation. This study investigated inactivation of  $\text{Ca}_v2.2$  channels in superior cervical ganglion neurons that overexpressed  $\text{G}\beta$  subunits.  $\text{Ca}_v2.2$  currents were recorded by whole-cell patch clamping configuration. We found that the  $\text{G}\beta_1$  subunit reduced inactivation, while  $\text{G}\beta_5$  subunit did not alter at all inactivation kinetics compared to control recordings.  $\text{Ca}_v2.2$  current decay in control neurons consisted of both fast and slow inactivation; however,  $\text{G}\beta_1$ -overexpressing neurons displayed only the slow inactivation. Fast inactivation was restored by a strong depolarization of  $\text{G}\beta_1$ -overexpressing neurons, therefore, through a voltage-dependent mechanism. The  $\text{G}\beta_1$  subunit shifted the voltage dependence of inactivation to more positive voltages and reduced the fraction of  $\text{Ca}_v2.2$  channels resting in the inactivated state. These results support that the  $\text{G}\beta_1$  subunit inhibits the fast inactivation of  $\text{Ca}_v2.2$  channels in SCG neurons. They explain the long-observed sustained  $\text{Ca}^{2+}$  current under G-protein modulation.

**Keywords**  $\text{G}\beta$  subunits · Inactivation ·  $\text{Ca}_v2.2$  channels · Rat SCG neurons

## Introduction

N-type voltage-gated calcium ( $\text{Ca}_v2.2$ ) channels are widely expressed in many types of neurons (Adams and Berecki 2013). Calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) influx through these channels is implicated in several physiological processes, such as neurotransmitter and hormone release, neurite outgrowth, gene transcription, and activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent proteins (Zundorf and Reiser 2011). A regulatory mechanism of  $\text{Ca}_v2.2$  channels solidly established in neurons is performed by  $\text{G}\beta\gamma$  subunits (Herlitze et al. 1996; Ikeda 1996), which are the  $\text{G}\beta$  subunit responsible for modulation (García et al. 1998). During a depolarizing pulse,  $\text{Ca}_v2.2$  channels are activated and current increases in a time-dependent fashion. Afterwards, the current decays (Zamponi 2001), indicating channel inactivation. Many studies have investigated regulation of activated channels through  $\text{G}\beta$  subunits and described voltage-dependent and voltage-independent pathways (Currie 2010; de la Cruz et al. 2016; Dolphin 2003). Numerous experimental strategies have been employed to investigate the interplay between signaling pathways. These include slowing activation kinetics (Marchetti et al. 1986), shifting activation thresholds to more positive potentials (Bean 1989), and recovery by a strong depolarizing prepulse (Elmslie et al. 1990). However, little is known whether or not channel inactivation is regulated by G-protein subunits.

G-protein activation by guanosine 5'-O-[ $\gamma$ -thio]triphosphate ( $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ) has been shown to almost entirely prevent inactivation of  $\text{Ca}_v2.2$  channels (García-Ferreiro et al. 2001). Inactivation has also been prevented by norepinephrine (Marchetti et al. 1986), a neurotransmitter that regulates  $\text{Ca}_v2.2$  channels through G-protein subunits (Delmas et al. 1998), which strongly suggests that a G-protein subunit is responsible for regulating  $\text{Ca}_v2.2$  inactivation. Alternatively, it has been suggested that  $\text{G}\beta$  subunit activation only slows inactivation (Weiss and De Waard 2007).

✉ David E. García  
erasmo@unam.mx

<sup>1</sup> Department of Physiology, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 04510 Mexico City, Mexico

Therefore, this study addressed whether a specific G $\beta$  subunit accounts for the regulation of the inactivation of Ca $_v$ 2.2 channels in rat sympathetic neurons.

## Materials and Methods

### Cell Culture and Nuclear Microinjection

Neurons from the superior cervical ganglia (SCG) of rats were isolated as previously described (García-Ferreiro et al. 2001). The animal breeding facility of the Universidad Nacional Autónoma de México School of Medicine provided rats, and these animals were handled according to the Mexican Official Norm for Use, Care and Reproduction of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999). Neurons were placed on polystyrene culture dishes pretreated with poly-L-lysine and incubated at 37 °C in 5% CO $_2$  for 6 h. After the 6-h incubation, nuclear microinjections were performed with an Eppendorf 5242 microinjector (injection pressure of 10–20 kPa for 0.3 s) and a 5171 micromanipulator (Eppendorf, Madison, WI). The injection solution contained cDNA encoding a green fluorescent protein (GFP) mutant fused to different types of G $\beta$  (G $\beta$ -GFP; 100 ng/ $\mu$ L) and G $\gamma_4$  subunits (G $\gamma_4$ ; 100 ng/ $\mu$ L). Expression plasmids were mixed with 1 mg/mL of dextran-fluorescein (MW = 10,000 KDa) as an injection marker. To confirm that the fused G $\beta$ -GFP did not alter the properties of the G $\beta_1$  subunit, some cells were transfected with the GFP plasmid (100 ng/ $\mu$ L) alone and other cells were transfected with GFP and G $\beta$  subunit (100 ng/ $\mu$ L) in separate plasmids (data not shown). cDNA encoding G $\beta_1$  subunits were cloned into a pCDM8 plasmid, G $\beta_5$  subunits were cloned into a pcDNA I plasmid, the G $\gamma_4$  subunit was cloned into a pCI plasmid, GFP was cloned into a pEGFP-N1 plasmid, and the G $\beta_1$ -GFP fusion plasmid was cloned into a pEYFPGb plasmid (Clontech). The expression of all vectors was driven by the cytomegalovirus promoter. Plasmids were purified with the use of commercial kits. After 18–24 h, G $\beta\gamma_4$ -injected neurons, referred to as G $\beta$ -overexpressing neurons, were identified by GFP fluorescence using an inverted microscope (Axiovert 135; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with epifluorescence optics.

### Electrophysiology and Analyses

Current recordings were obtained at room temperature (22–24 °C) by whole-cell patch-clamping using an EPC-9 amplifier. Voltage protocols were generated, and current responses were digitized and stored using Patchmaster software. Pipettes were pulled from borosilicate glass capillaries with a horizontal patch electrode puller and were filled with an internal solution containing (in mM): 140 CsCl, 20 tetraethylammonium (TEA)-Cl, 10 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 0.1 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid

(BAPTA)-tetracesium, 5 MgCl $_2$ , 5 Na $_2$ ATP, 0.3 Na $_2$  guanosine triphosphate (GTP), and 0.1 leupeptin. The pH was adjusted to 7.2 with CsOH. The electrical resistance of pipettes was 1.8–2.0 M $\Omega$ . Neurons were superfused (1–2 mL/min) with an external solution designed to isolate Ba $^{2+}$  currents (I $_{Ba}$ ) through Ca $_v$ 2.2 channels. The composition of the external solution was (in mM) 165 TEA-Cl, 2 BaCl $_2$ , 10 HEPES, 8 glucose, 1 MgCl $_2$ , and 0.0002 tetrodotoxin (TTX). The pH was adjusted to 7.4 with TEA-OH. I $_{Ba}$  recordings were sampled at 10 kHz, and capacitive transients were eliminated by averaging the current traces. The series resistances (1.9  $\pm$  1.3 M $\Omega$ , mean  $\pm$  SEM) were compensated to >70% and did not exceed 10 M $\Omega$ . Reagents were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

The mean cell capacitance was 74.56 pF with an SEM of  $\pm$  11.28 pF. For each cell, I $_{Ba}$  density was determined by dividing the whole-cell total current by the membrane capacitance. Peak current, kinetic slowing, steady-state and facilitation index of I $_{Ba}$  were measured as previously described (García et al. 1998). According to García and colleagues (1998), facilitation index is a reliable indicator that microinjection is successfully performed. Only G $\beta_1$ -overexpressing neurons with a facilitation index  $\geq$  3 and G $\beta_5$ -overexpressing neurons with an inhibition of the current  $\geq$  15% were included in the analysis. The percentage of inactivation (inactivation %; Fig. 2c) was calculated by the following equation:

$$I(t) = 1 - \frac{I_{500ms}}{I_{7ms}}$$

where  $I(t)$  is the current amplitude and  $I_{7ms}$  and  $I_{500ms}$  are the current density amplitudes at 7 and 500 ms of the depolarizing pulse, respectively. The rate of change for I $_{Ba}$  (Fig. 2d) was measured as the difference in current amplitudes measured every 20 ms during depolarizing pulses. Ca $_v$ 2.2 current decay (Figs. 3a and 4a) was fitted with the following two-variable exponential equation:

$$I(t) = A_{fast}e^{-\frac{t}{\tau_{fast}}} + A_{slow}e^{-\frac{t}{\tau_{slow}}} + Y_0$$

where  $I(t)$  is the current amplitude as a function of time  $t$  during depolarizing pulse,  $A$  is the current amplitude of the fast or the slow inactivation,  $\tau$  is time constant, and  $Y_0$  is the residual current. The data points of steady-state curve inactivation (Fig. 5b) were obtained from steady-state current evoked by depolarization pulse to  $-8$  mV and normalized ( $f$ ) with an identical pulse preceding the conditional pulse, as shown in Fig. 5a. The conditioning pulse of 40 s increased in steps of 10 mV, from  $-110$  to 0 mV. The data was plotted with respect to the voltage of conditioning pulses and fitted according to the following Boltzmann equation:

$$f = \frac{I_{max}}{1 + e^{-\frac{V-V_{0.5}}{k}}}$$

where  $I_{max}$  is the limiting fractional availability of the current,  $V_{0.5}$  is the voltage of half availability, and  $k$  is the voltage

dependence of distribution. A double pulse protocol (Fig. 5c, d) was used to measure the recovery from inactivation. The first pulse was 500 ms at  $-8$  mV followed by  $-100$  mV for variable durations (from 1 to 10,000 ms) followed by the test pulse of 7 ms at  $-8$  mV. The peak current of the test pulse was normalized to the peak current of the conditioning pulse and then plotted to the time of recovery.

All data are shown as mean  $\pm$  SEM. Statistical significance was determined by *t* tests where *p* values  $< 0.05$  were considered significant.

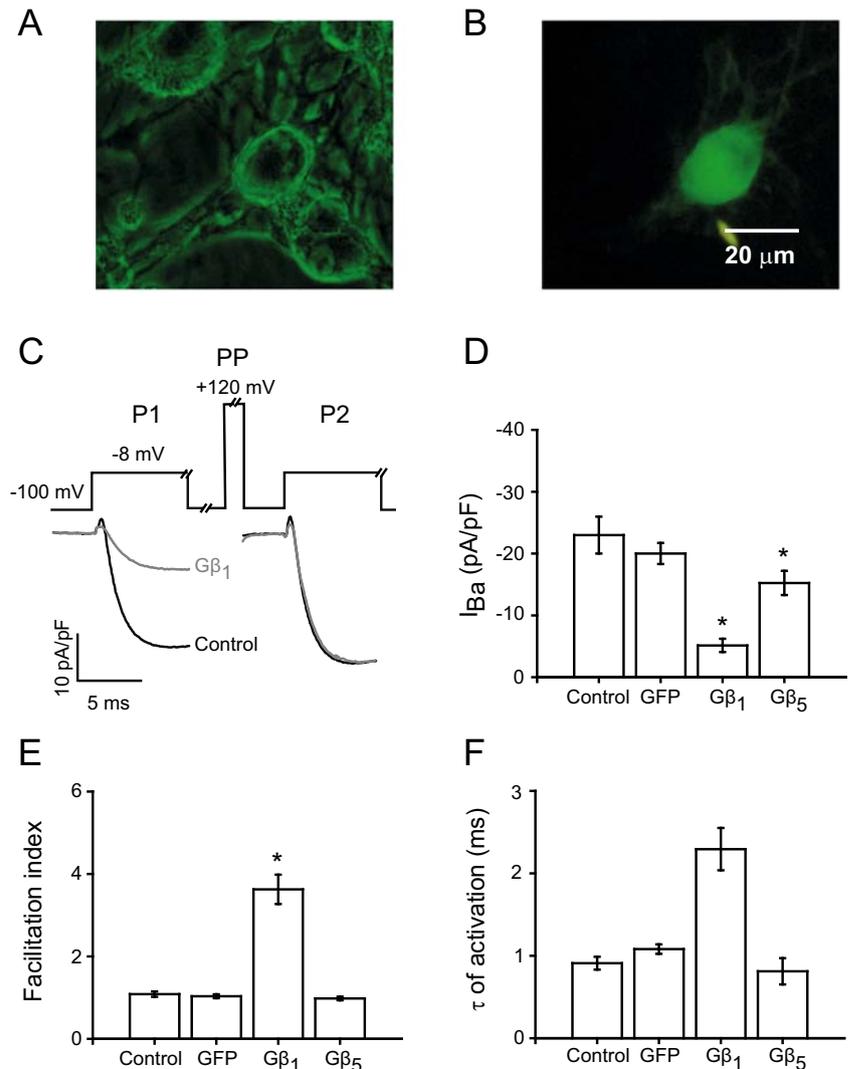
## Results

### Ca<sub>v</sub>2.2 Channel Regulation Depends on the Specific G $\beta$ Subunit Isoform Overexpressed

Protein–protein interactions have been proposed to define specific effects of G-protein  $\beta$  subunits on calcium channels

(Hernandez-Castellanos et al. 2014). Furthermore, it has been suggested that specific effector regions on the G $\beta$  subunits of the G proteins may account for calcium channel responses (Ford et al. 1998). The question then arises whether functional effects are not to solely due to level of expression rather than difference in the isoform employed. Therefore, we examined the specificity of G $\beta_1$  subunit on Ca<sub>v</sub>2.2 channel regulation. We compared the hallmarks of the voltage-dependent Ca<sub>v</sub>2.2 channel regulation by G $\beta_1$  versus G $\beta_5$  subunit, as the latest shows the lowest degree of similarity in linear sequence, using a prepulse protocol (Fig. 1c). G $\beta$ -overexpressing neurons were identified by GFP fluorescence coupled to each G $\beta$  subunit (Fig. 1a, b). G $\beta_1$  subunit reduces  $I_{Ba}$  amplitude ( $I_{control} = -23 \pm 2.98$ ,  $I_{GFP} = -20 \pm 1.71$ , and  $I_{G\beta_1} = -5.14 \pm 1.08$  pA/pF; Fig. 1c, d), increases the facilitation index ( $IF_{control} = 1.08 \pm 0.06$ ,  $IF_{GFP} = 1.03 \pm 0.05$ , and  $IF_{G\beta_1} = 3.6 \pm 0.4$ ; Fig. 1e), and slows the activation phase of  $I_{Ba}$  ( $\tau_{control} = 0.9 \pm 0.8$ ,  $\tau_{GFP} = 1.1 \pm 0.06$ , and  $\tau_{G\beta_1} = 2.3 \pm 0.25$  ms; Fig. 1f). G $\beta_5$  subunit reduces  $I_{Ba}$  amplitude in a lesser extent without altering

**Fig. 1** Electrophysiological characterization of Ca<sub>v</sub>2.2 channel regulation by G $\beta_1$  versus G $\beta_5$  subunits. Images of G $\beta_1$ -overexpressing neurons under **a** bright field and **b** blue light. Images were taken 24 h after nuclear microinjection. **c** Superimposed  $I_{Ba}$  traces from a control and a G $\beta_1$ -overexpressed neuron evoked by a pair of 7-ms depolarizing pulses to  $-8$  mV (P1 and P2) from a holding potential of  $-100$  mV, separated by a prepulse (PP) of  $+120$  mV during 90 ms (top of the panel). Bar graph summary of **d**  $I_{Ba}$  amplitude ( $n = 7$ ), **e** facilitation index ( $n = 7$ ), and **f** tau of activation ( $n = 7$ ) under conditions indicated in each panel. (\**p*  $< 0.05$  vs. control)



the facilitation index or a kinetic slowing ( $I_{G\beta 5} = -15.2 \pm 1.95$  pA/pF,  $IF_{G\beta 5} = 0.98 \pm 0.04$ , and  $\tau_{G\beta 5} = 0.8 \pm 0.16$  ms). We also observed that  $G\beta_1$  subunit inhibits  $Ca_v2.2$  channels by a predominant voltage dependence regulation, while  $G\beta_5$  subunit regulates  $Ca_v2.2$  channels in a voltage-independent manner. Similar findings have been reported by others (Garcia et al. 1998; Hernandez-Castellanos et al. 2014; Khan et al. 2013), showing that  $Ca_v2.2$  channel regulation by G-protein subunits specifically depends on the  $G\beta$  subunit type.

### **$Ca_v2.2$ Inactivation Is Reduced by $G\beta_1$ Subunit through a Time-Dependent Mechanism and Not by the $G\beta_5$ Subunit**

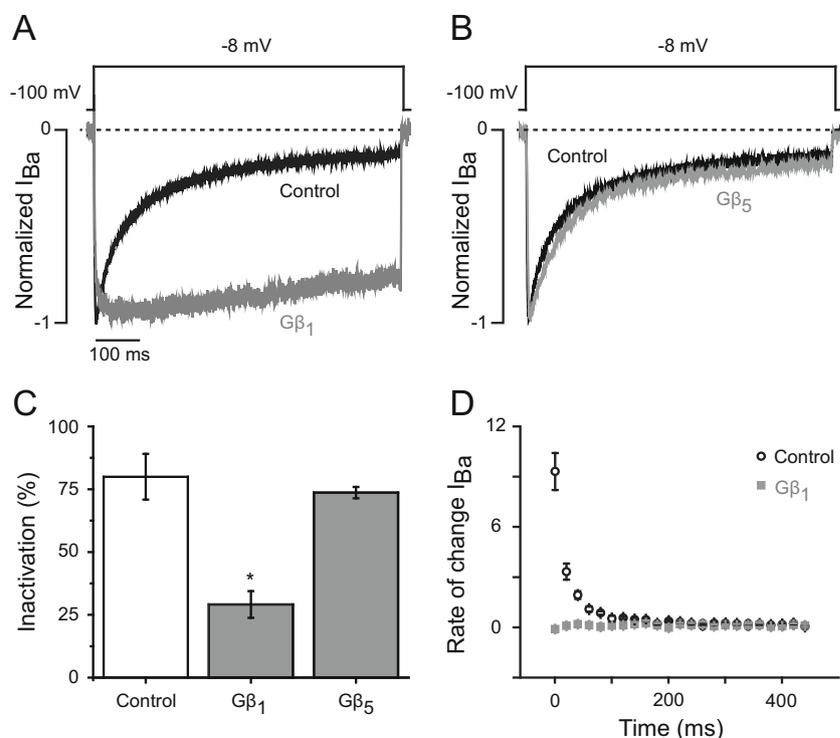
We have previously shown that  $G\beta_1$  and  $G\beta_5$  subunits have a strong and a weak voltage dependence regulation, respectively (Fig. 1). Taking these subunits with opposite activities, we assessed next whether  $Ca_v2.2$  inactivation is affected by  $G\beta_1$  or  $G\beta_5$  subunits. Figure 2 compares  $Ca_v2.2$  current decay in control,  $G\beta_1$ -overexpressing neurons, and  $G\beta_5$ -overexpressing neurons. As shown in the figure, the  $G\beta_1$  subunit reduces  $Ca_v2.2$  inactivation by  $62 \pm 3.25\%$  at 500 ms (control =  $80 \pm 9.1\%$ ;  $G\beta_1$ -overexpressing neurons =  $30 \pm 6.3\%$ ; Fig. 2a, c). On the other hand, the  $G\beta_5$  subunit does not significantly reduce  $Ca_v2.2$  inactivation at 500 ms ( $G\beta_5$ -overexpressing neurons =  $73.7 \pm 2.3\%$ ; Fig. 2c). Furthermore, the rate of  $I_{Ba}$  change is reduced by the  $G\beta_1$  subunit during the first

100 ms (Fig. 2d), while the  $G\beta_1$  subunit does not significantly reduce inactivation afterwards. The  $G\beta_5$  subunit does not significantly alter the time course of  $I_{Ba}$  (Fig. 2b). These results suggest that  $G\beta_1$  subunit reduces the  $Ca_v2.2$  channel inactivation through a voltage- and time-dependent mechanism. Thereafter, this data prompted us to evaluate, first, the time course of  $Ca_v2.2$  current decay and, later, the voltage dependence of inactivation in  $G\beta_1$ -overexpressing neurons.

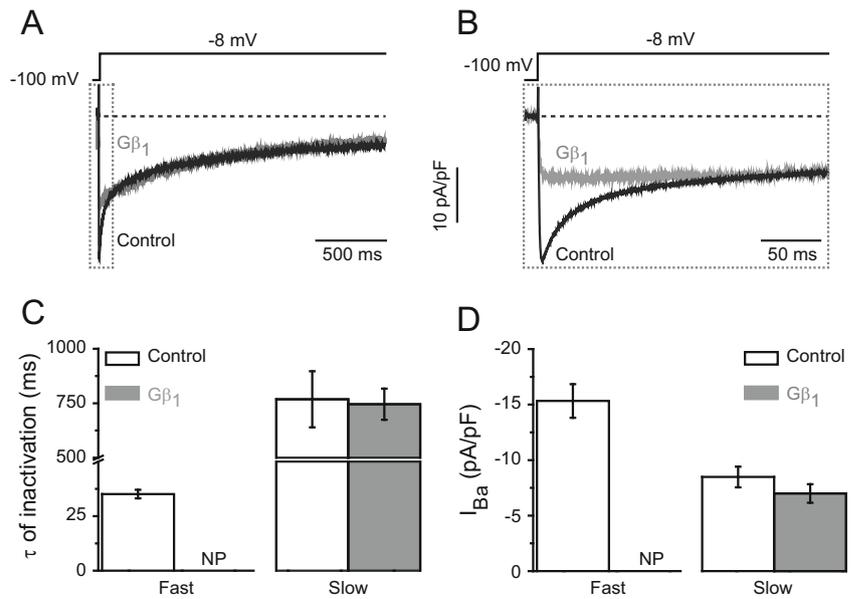
### **Fast Inactivation of $Ca_v2.2$ Channel-Current Is Prevented by the $G\beta_1$ Subunit**

Although previous studies have shown that in the absence of G-protein regulation,  $Ca_v2.2$  inactivation has both a fast inactivation and a slow inactivation (Garcia-Ferreiro et al. 2001; Yasuda et al. 2004), whether or not the  $G\beta_1$  subunit regulates these components remains unclear. Thus, the initial experiment was applied along depolarizing pulse (2 s) to examine the possibility that fast and/or slow  $Ca_v2.2$  inactivation is slowed. As seen in Fig. 3a,  $I_{Ba}$  amplitudes were similar in the control and in the  $G\beta_1$ -overexpressing neurons 100 ms post-activation (Fig. 3a, b), indicating that the  $G\beta_1$  subunit affects the fast inactivation. To assess this effect, kinetic parameters of  $Ca_v2.2$  current decay were examined.  $Ca_v2.2$  inactivation in control neurons was best fit with a two-variable exponential equation. The exponential time constant of the fast inactivation was  $35 \pm 1.9$  ms, whereas it was  $768.16 \pm 128.6$  ms for the slow inactivation (Fig. 3c). The

**Fig. 2** The  $G\beta_1$  subunit reduces  $Ca_v2.2$  inactivation. Normalized  $I_{Ba}$  traces from control, **a**  $G\beta_1$ -overexpressing neurons, and **b**  $G\beta_5$ -overexpressing neurons evoked by a 500-ms depolarizing pulse to  $-8$  mV from a holding potential of  $-100$  mV (top of the panel). **c** Summary of the percentage of  $Ca_v2.2$  inactivation in control,  $G\beta_1$ -overexpressing neurons, and  $G\beta_5$ -overexpressing neurons ( $n = 7$ ) at 500 ms. **d** Rate of change of  $I_{Ba}$  amplitude in control and  $G\beta_1$ -overexpressed neurons, sampling occurred at 20-ms intervals during a 500-ms depolarizing pulse ( $*p < 0.05$  vs. control)



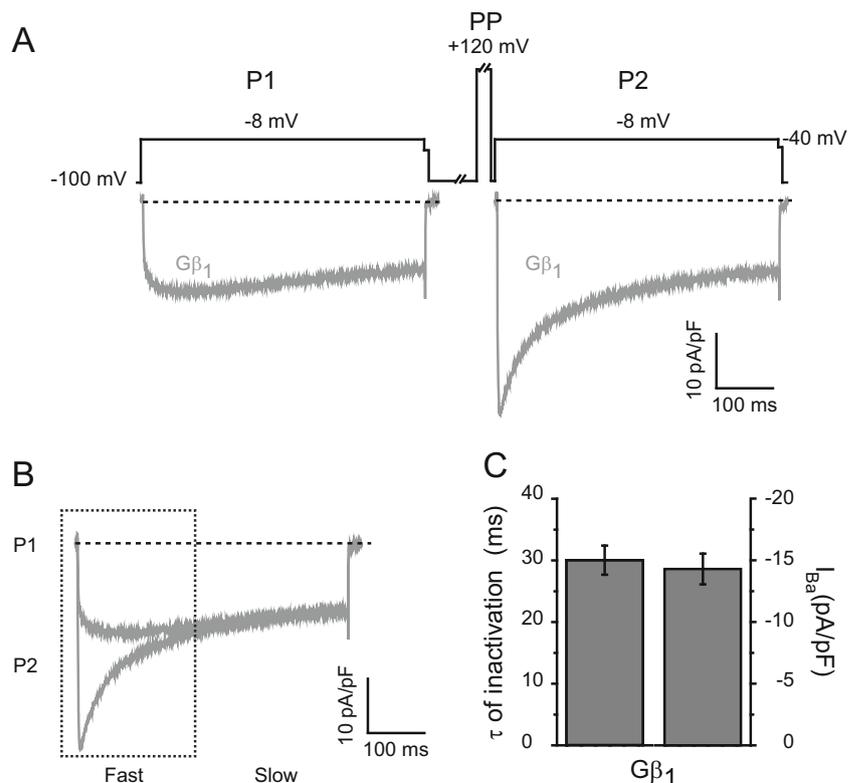
**Fig. 3** The  $G\beta_1$  inhibition of  $Ca_v2.2$  fast inactivation is voltage dependent. **a**  $I_{Ba}$  traces in control and  $G\beta_1$ -overexpressing neurons evoked by the protocol indicated at the top. **b** Shows the first 200 ms of **a** (dashed line box). **c** Summary of time constants ( $\tau$ ) for inactivation in control and  $G\beta_1$ -overexpressing neurons ( $n = 7$ ). **d** Summary of maximal amplitude ( $A$ ) during fast and slow inactivation in control and  $G\beta_1$ -overexpressing neurons ( $n = 7$ ), NP = not present



current amplitude ( $A$ ) was  $-15.3 \pm 1.5$  pA/pF for the fast inactivation and  $-8.5 \pm 0.9$  pA/pF for the slow inactivation (Fig. 3d). The best fit for current decay in  $G\beta_1$ -overexpressing neurons was a single-variable exponential function.  $\tau$  of inactivation was  $745.8 \pm 71.5$  ms, and  $A$  was  $-7.0 \pm 0.8$  pA/pF (Fig. 3c, d). The inactivation values in  $G\beta_1$ -overexpressing neurons were not significantly different from the slow inactivation in control neurons (Fig. 3c, d). Thus, in the  $G\beta_1$ -overexpressing neurons, only the slow inactivation can be observed.

The absence of the fast inactivation of  $Ca_v2.2$  channels by  $G\beta_1$  subunit could be due to independent G-proteins mechanism. To examine this possibility, we next tested whether a strong depolarizing pulse, which is considered a tool to prove voltage-dependent regulation of  $Ca_v2.2$  channels by G-proteins (Diaz-Cardenas et al. 2008; Ruiz-Velasco and Ikeda 2000), could restore this fast inactivation in  $G\beta_1$ -overexpressing neurons. As shown in Fig. 4a,  $Ca_v2.2$  current decay in  $G\beta_1$ -overexpressing neurons went from monophasic (slow

**Fig. 4** Restoration of the fast inactivation in  $G\beta_1$ -overexpressing neurons. **a** Representative  $I_{Ba}$  trace evoked by a pair of 500-ms depolarizing pulse to  $-8$  mV (P1 and P2), separated by a 90 ms of a strong depolarizing pulse (PP) to  $+120$  mV in a  $G\beta_1$ -overexpressing neuron. **b** Superimposed  $I_{Ba}$  traces for P1 and P2 in a  $G\beta_1$ -overexpressing neuron. The dashed-line box indicates recovery of the fast inactivation. **c** Summary of  $A$  and  $\tau$  values for the fast inactivation of  $Ca_v2.2$  channels obtained from P2 ( $n = 6$ )



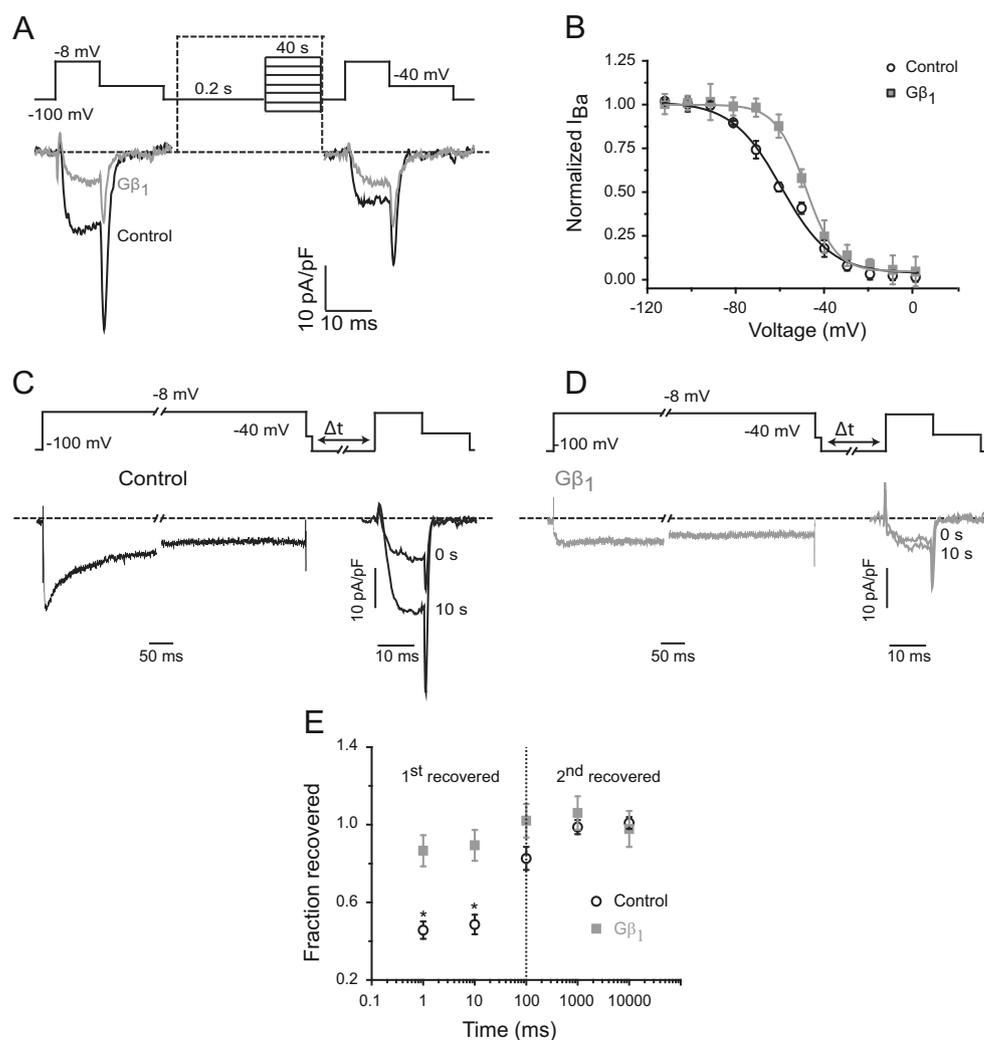
only, P1) to bi-phasic (slow and fast, P2) upon a strong depolarization. Traces of  $I_{Ba}$  in P1 and P2 were overlapped to indicate that the fast inactivation was recovered (Fig. 4b). In addition, P2 was fitted with a two-variable exponential function to compare the fast and slow inactivation to the control. The exponential parameters ( $A$  and  $\tau$ ) representing the slow inactivation were not significantly different. The  $A$  ( $-14.3 \pm 1.24$  pA/pF) and  $\tau$  ( $30.02 \pm 2.4$  ms) of the recovered fast inactivation (Fig. 4c) were similar to those of control neurons (Fig. 3c, d), supporting the hypothesis that the  $G\beta_1$  subunit inhibits fast inactivation in  $G\beta_1$ -overexpressing neurons.

### $G\beta_1$ Subunit Regulates Voltage Dependence of $Ca_v2.2$ Inactivation and Reduces the Fraction of Inactivated Channels

We have previously suggested that  $G\beta_1$  subunit effects are related to the voltage dependence of  $Ca_v2.2$  inactivation (Figs. 2 and 4a). Thus, we evaluated steady-state inactivation

in  $G\beta_1$ -overexpressing neurons.  $Ca_v2.2$  inactivation voltage dependence is reduced by the  $G\beta_1$  subunit. In Fig. 5a,  $I_{Ba}$  traces evoked at  $-8$  mV show that the  $I_{Ba}$  amplitude before and after the pulse are nearly the same. However, in control neurons, this amplitude is reduced by 25%. As a consequence of this reduction, the steady-state inactivation shifts the curve to more positive potentials ( $V_m = -58.07 \pm 2.1$  for control neurons and  $V_m = -48.2 \pm 3.3$  mV for  $G\beta_1$ -overexpressing neurons; Fig. 5b). In addition, we also assessed the recovery of the  $Ca_v2.2$  channels from inactivation in  $G\beta_1$ -overexpressing neurons by means of a double pulse protocol. The long depolarizing pulse (500 ms) leads the channels to the inactivated state, and the hyperpolarizing pulse recovers the inactivated channels with pulses of variable duration. Finally, a depolarizing pulse determines the fraction of channels that are open. As seen in Fig. 5c, d, a comparison of the recoveries from inactivation in  $G\beta_1$ -overexpressing neurons and control neurons was performed.  $G\beta_1$ -overexpressing neurons displayed a significant reduction in the fraction of recovered  $Ca_v2.2$  channels compared to the control neurons during the

**Fig. 5** The  $G\beta_1$  subunit regulates the voltage dependence of  $Ca_v2.2$  inactivation and reduces the fraction of inactivated- $Ca_v2.2$  channels. **a**  $I_{Ba}$  traces in control and  $G\beta_1$ -overexpressing neurons evoked by a pair of 7-ms depolarizing pulse to  $-8$  mV, separated by a series of depolarizing steps (40 s in duration each) from  $-110$  to  $0$  mV at  $10$  mV increments (indicated at the top of the panel). **b** Steady-state curve of inactivation in control (open circle,  $n = 7$ ) and  $G\beta_1$ -overexpressing (filled square,  $n = 5$ ) neurons. The continuous line represents the fits to a Boltzmann equation.  $I_{Ba}$  traces in **c** control and **d**  $G\beta_1$ -overexpressing neurons evoked by a prepulse for 500 ms to  $-8$  mV followed by 7 ms of a test pulse to the same voltage. Between of these two pulses, a pulse to  $-100$  mV at different times was applied (top of the panel). **e** Recovery from inactivation at  $-100$  mV in control (open circle,  $n = 3$ ) and  $G\beta_1$ -overexpressing (filled square,  $n = 3$ ) neurons. The dotted line indicated the separation between from the first and second components of recovery ( $*p < 0.05$  vs. control)



first 100 ms. Interestingly, the time course of recovery was the same between  $G\beta_1$ -overexpressing and control neurons (Fig. 5e). This data shows that  $G\beta_1$ -overexpressing neurons increase a fraction of the  $Ca_v2.2$  channels in a non-conducting state, suggesting that this channel population corresponds to the fast inactivation of  $Ca_v2.2$  channels.

## Discussion

These results show that the  $G\beta_1$  subunit inhibits the fast inactivation of  $Ca_v2.2$  currents.  $Ca_v2.2$  channels in  $G\beta_1$ -overexpressing neurons displayed only the slow inactivation, while  $G\beta_5$ -overexpressing neurons exhibited both slow and fast inactivation. A strong depolarizing prepulse restored fast inactivation of  $G\beta_1$ -overexpressing neurons through a voltage-dependent mechanism. It has been shown that  $G\beta$  subunits directly bind the  $\alpha$  subunits of the  $Ca_v2.2$  channel (Colecraft et al. 2000), and it has been suggested that a strong depolarization unbinds the subunit (Elmslie et al. 1990). Therefore, recovery of the fast component through a strong depolarization may be explained by the release of  $G\beta_1$  subunits from  $Ca_v2.2$  channels.

In sodium channels, it is thought that inactivation is coupled to activation (Armstrong and Bezanilla 1977). Similarly,  $Ca_v2.2$  inactivation is also thought to be coupled to activation (Jones et al. 1999). However,  $Ca_v2.2$  channels are distinct from sodium channels because occluding the fast inactivation by  $G\beta_1$  subunit overexpression does not increase  $I_{Ba}$  during the depolarizing pulse, but instead reduces the amplitude of  $I_{Ba}$ . This suggests a reduction in macroscopic conductance through  $Ca_v2.2$  channels. It was previously reported that G-protein activation by norepinephrine lowered the fast-open probability (Delcour and Tsien 1993) and decreased conductance (Carabelli et al. 1996). This strongly suggests that the  $G\beta_1$  subunit decreases the fraction of  $Ca_v2.2$  channels with a high fast-open probability and with a fast inactivation rather than a slow inactivation of  $Ca_v2.2$  channels by the  $G\beta$  subunit (Weiss and De Waard 2007). It remains unknown why  $G\beta_1$  subunits preferentially affect the fast inactivation, and future studies will explore this.

Interestingly, the effect on fast inactivation by the  $G\beta_1$  subunit is voltage-dependent. Previous modeling suggests that the voltage sensor of the channel is trapped by  $G\beta$  subunits (Zhong et al. 2001). Moreover, G-protein subunits preferentially bind  $Ca_v2.2$  channels in a closed state (Colecraft et al. 2000). We propose that the absence of the fast inactivation in  $G\beta_1$ -overexpressing neurons arises from the  $G\beta_1$  subunit trapping the voltage sensor, while in the closed state by impeding the transition to the fast inactivating state.

It has been long tested that norepinephrine elicits specific responses on  $Ca_v2.2$  channels in SCG neurons through the activation of GPCRs (Delmas et al. 1998; Hernandez-

Castellanos et al. 2014; Ikeda 1996; Koh and Hille 1997). This is a pertussis toxin-sensitive membrane-delimited Go/Gi-mediated and voltage-dependent mechanism (Herlitz et al. 1996; Ikeda 1996). As most of these experiments have been done in SCGs, a classical sympathetic neurons preparation, the more likely first messenger modulating  $Ca_v2.2$  channels through a GPCR by  $G\beta$  subunit is norepinephrine. Under physiological conditions, regulation of the fast inactivation by  $G\beta_1$  subunits may impact the  $Ca^{2+}$  influx, which modulates neuronal firing rates (Mazzanti et al. 1992). Thus, this type of regulation may govern spatial and temporal physiological processes underlying neurotransmitter release.

**Acknowledgements** This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) grant 255635 and UNAM-DGAPA-PAPIIT grants IN218016, IA206317, and IV100116. Arturo Reyes-Vaca is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship (#363238) from CONACyT. DG is an Alexander von Humboldt Fellow, Germany. We thank Manuel Hernández and Guillermo Luna for their technical help, Ing. Gustavo Díaz for software support, and Dr. Enrique Pinzón for his excellent care of the rats.

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of Interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Adams DJ, Berecki G (2013) Mechanisms of conotoxin inhibition of N-type ( $Ca_v2.2$ ) calcium channels. *Biochim Biophys Acta* 1828: 1619–1628
- Armstrong CM, Bezanilla F (1977) Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol* 70:567–590
- Bean BP (1989) Neurotransmitter inhibition of neuronal calcium currents by changes in channel voltage dependence. *Nature* 340:153–156
- Carabelli V, Lovallo M, Magnelli V, Zucker H, Carbone E (1996) Voltage-dependent modulation of single N-type  $Ca^{2+}$  channel kinetics by receptor agonists in IMR32 cells. *Biophys J* 70:2144–2154
- Colecraft HM, Patil PG, Yue DT (2000) Differential occurrence of reluctant openings in G-protein-inhibited N- and P/Q-type calcium channels. *J Gen Physiol* 115:175–192
- Currie KP (2010) G protein modulation of  $Ca_v2$  voltage-gated calcium channels. *Channels (Austin)* 4:497–509
- de la Cruz L, Puente EI, Reyes-Vaca A, Arenas I, Garduno J, Bravo-Martinez J, Garcia DE (2016) PIP2 in pancreatic beta-cells regulates voltage-gated calcium channels by a voltage-independent pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 311:C630–C640
- Delcour AH, Tsien RW (1993) Altered prevalence of gating modes in neurotransmitter inhibition of N-type calcium channels. *Science* 259:980–984
- Delmas P, Brown DA, Dayrell M, Abogadie FC, Caulfield MP, Buckley NJ (1998) On the role of endogenous G-protein beta gamma subunits in N-type  $Ca^{2+}$  current inhibition by neurotransmitters in rat sympathetic neurons. *J Physiol* 506(Pt 2):319–329
- Diaz-Cardenas AF, Arenas I, Garcia DE (2008) PMA counteracts G protein actions on  $Ca_v2.2$  channels in rat sympathetic neurons. *Arch Biochem Biophys* 473:1–7

- Dolphin AC (2003) G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev* 55:607–627
- Elmslie KS, Zhou W, Jones SW (1990) LHRH and GTP-gamma-S modify calcium current activation in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* 5:75–80
- Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE (1998) Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors. *Science* 280:1271–1274
- Garcia-Ferreiro RE, Hernandez-Ochoa EO, Garcia DE (2001) Modulation of N-type Ca<sup>2+</sup> channel current kinetics by PMA in rat sympathetic neurons. *Pflugers Arch* 442:848–858
- Garcia DE, Li B, Garcia-Ferreiro RE, Hernandez-Ochoa EO, Yan K, Gautam N, Catterall WA, Mackie K, Hille B (1998) G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels. *J Neurosci* 18:9163–9170
- Herlitze S, Garcia DE, Mackie K, Hille B, Scheuer T, Catterall WA (1996) Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:258–262
- Hernandez-Castellanos JM, Vivas O, Garduno J, De la Cruz L, Arenas I, Elias-Vinas D, Mackie K, Garcia DE (2014) Gbeta(2) mimics activation kinetic slowing of CaV2.2 channels by noradrenaline in rat sympathetic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 445:250–254
- Ikeda SR (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:255–258
- Jones LP, DeMaria CD, Yue DT (1999) N-type calcium channel inactivation probed by gating-current analysis. *Biophys J* 76:2530–2552
- Khan SM, Sleno R, Gora S, Zylbergold P, Laverdure JP, Labbe JC, Miller GJ, Hebert TE (2013) The expanding roles of Gbetagamma subunits in G protein-coupled receptor signaling and drug action. *Pharmacol Rev* 65:545–577
- Koh DS, Hille B (1997) Modulation by neurotransmitters of catecholamine secretion from sympathetic ganglion neurons detected by amperometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1506–1511
- Marchetti C, Carbone E, Lux HD (1986) Effects of dopamine and noradrenaline on Ca channels of cultured sensory and sympathetic neurons of chick. *Pflugers Arch* 406:104–111
- Mazzanti M, Galli A, Ferroni A (1992) Effect of firing rate on the calcium permeability in adult neurons during spontaneous action potentials. *Biophys J* 63:926–934
- Ruiz-Velasco V, Ikeda SR (2000) Multiple G-protein betagamma combinations produce voltage-dependent inhibition of N-type calcium channels in rat superior cervical ganglion neurons. *J Neurosci* 20:2183–2191
- Weiss N, De Waard M (2007) Introducing an alternative biophysical method to analyze direct G protein regulation of voltage-dependent calcium channels. *J Neurosci Methods* 160:26–36
- Yasuda T, Lewis RJ, Adams DJ (2004) Overexpressed Ca(v)beta3 inhibits N-type (Cav2.2) calcium channel currents through a hyperpolarizing shift of ultra-slow and closed-state inactivation. *J Gen Physiol* 123:401–416
- Zamponi GW (2001) Determinants of G protein inhibition of presynaptic calcium channels. *Cell Biochem Biophys* 34:79–94
- Zhong H, Li B, Scheuer T, Catterall WA (2001) Control of gating mode by a single amino acid residue in transmembrane segment IS3 of the N-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4705–4709
- Zundorf G, Reiser G (2011) Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid Redox Signal* 14:1275–1288