



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**PAPEL DEL ASA I-II DE LOS CANALES LVA: REGULACIÓN POR
SUBUNIDADES β Y DEPENDENCIA AL VOLTAJE**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ROGELIO ARTEAGA TLECUITL

DIRECTOR DE TESIS
DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM
COMITÉ TUTOR
DR. DIEGO RICARDO FELIX GRIJALVA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, CINVESTAV
DR. DAVID ERASMO GARCÍA DÍAZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., SEPTIEMBRE DE 2019.



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.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	- 2 -
ABSTRACT.....	- 4 -
INTRODUCCIÓN.....	- 6 -
CANALES DE CALCIO ACTIVADOS POR VOLTAJE.....	- 9 -
PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LOS CANALES Ca_v	- 13 -
<i>Freno de la compuerta de los canales Ca_v3</i>	- 18 -
JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	- 20 -
HIPÓTESIS.....	- 22 -
OBJETIVOS.....	- 23 -
METODOLOGÍA.....	- 25 -
I. CONSTRUCCIÓN DE LOS CANALES FUSIONADOS Y MUTANTES.....	- 25 -
<i>Subunidades α_1 y β fusionadas a proteínas fluorescentes</i>	- 25 -
<i>Canales LVA mutantes del freno de la compuerta</i>	- 26 -
II. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS CANALES LVA.....	- 30 -
III. CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIÓN.....	- 30 -
IV. REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO.....	- 32 -
<i>Soluciones de registro</i>	- 36 -
<i>Análisis de datos</i>	- 36 -
V. INMUNOPRECIPITACIÓN.....	- 38 -
VI. MICROSCOPIA CONFOCAL.....	- 40 -
RESULTADOS.....	- 42 -
LA DENSIDAD DE CORRIENTE DE LOS CANALES LVA AUMENTA DEBIDO A LA PRESENCIA DE LA SUBUNIDAD $\beta 1B$	- 42 -
LA CO-EXPRESIÓN CON LA SUBUNIDAD $\beta 1B$ AUMENTA LA EXPRESIÓN DE LOS CANALES LVA EN LA MEMBRANA CELULAR.....	- 50 -
EL CANAL $Ca_v3.3$ NO INTERACTÚA FÍSICAMENTE CON LA SUBUNIDAD $\beta 1B$	- 54 -
EL ASA QUE UNE LOS DOMINIOS I Y II ES CRUCIAL PARA EL <i>GATING</i> DE LOS CANALES LVA.....	- 56 -
CONSERVACIÓN DEL PUENTE SALINO DEL FRENO DE LA COMPUERTA EN DIVERSOS TAXA ANIMALES Y SU CONTRIBUCIÓN A LA ACTIVACIÓN DE BAJO UMBRAL DE LOS CANALES LVA.....	- 62 -
DISCUSIÓN.....	- 68 -
CONCLUSIONES.....	- 77 -
REFERENCIAS.....	- 78 -

RESUMEN

Los canales de calcio activados por voltaje (canales Ca_v) son fundamentales para el influjo del calcio a las células, preservando así la homeostasis celular. En particular, los canales Ca_v de bajo umbral de activación (LVA o tipo T), se caracterizan por conferir propiedades marcapaso a la excitabilidad celular de neuronas, y células cardíacas y endocrinas. Además, la disfunción de los canales tipo T se ha implicado en patologías como epilepsia, dolor neuropático, desordenes neuropsiquiátricos, fibrilación atrial, insuficiencia cardíaca congénita y cáncer, entre otras. No obstante, la relación entre la estructura y funcionamiento de los canales LVA, así como su modulación por otras proteínas no ha sido completamente estudiada.

En el presente trabajo investigamos si la actividad funcional de los canales LVA es regulada por las subunidades β de los canales Ca_v de alto umbral de activación (HVA) y si ello implica una interacción física entre ambas proteínas. Nuestros resultados demuestran que los canales LVA son regulados por la subunidad $\beta 1b$ de los canales HVA mediante un incremento de canales en la membrana plasmática de células HEK-293 transfectadas con ambas proteínas. No obstante, experimentos de inmunoprecipitación no mostraron interacción entre estas proteínas, lo cual fue confirmado por la baja señal de FRET detectada en estas células. En conclusión, la modulación de los canales LVA por la subunidad $\beta 1b$ de los canales HVA no parece requerir de una interacción física entre estas dos proteínas o si existe, esta es de baja afinidad.

Por otro lado, previamente hemos reportado que el asa que une los Dominios I y II de la subunidad α_1 de los canales LVA funciona como un freno de la compuerta (de la activación e inactivación dependiente del voltaje) del canal, cuya relevancia ha sido

evidenciada en algunos tipos de epilepsia. Aquí, realizando experimentos de biología molecular para generar mutantes y quimeras de canales LVA y HVA, reportamos que la disrupción del puente salino que mantiene la estructura del freno de la compuerta no modificó sustancialmente su estructura; sin embargo, el funcionamiento de los tres canales LVA se alteró de manera significativa induciendo una activación e inactivación a voltajes más negativos que los observados en los canales silvestres. El efecto más drástico se observó al reemplazar el asa I-II completa del canal LVA por la del HVA, lo cual generó un canal “super LVA” cuya dependencia al voltaje se desplazó hacia voltajes mas negativos (20-30 mV) con respecto al canal LVA. Con base en estos resultados, proponemos que el asa I-II se mueve hacia el asa S4-S5 en el Dominio I de la subunidad α_1 de los canales LVA, facilitando la interacción de aminoácidos con cargas eléctricas opuestas en estas regiones intracelulares, lo que da lugar a la peculiar dependencia al voltaje de los canales LVA, es decir, de bajo umbral de activación. Por lo tanto, una de las perspectivas del presente trabajo consiste en realizar experimentos de estructura-función en los canales Cav3 en los que se investigue la contribución de las argininas (y residuos contiguos) del asa IS4-IS5 en la dependencia al voltaje de la activación e inactivación de los canales Cav3.

ABSTRACT

Voltage-activated calcium channels (Cav channels) are essential for the influx of calcium into cells, thus preserving cell homeostasis. In particular, Cav channels with low-threshold activation (LVA or T-type) are characterized by conferring pacemaker properties to the cell excitability of neurons, cardiac and endocrine cells. In addition, dysfunction of T-type channels has been implicated in pathologies such as epilepsy, neuropathic pain, neuropsychiatric disorders, atrial fibrillation, congenital heart failure and cancer. However, the relationship between structure and functioning of the LVA channels, as well as their modulation by other proteins has not been fully studied.

In the present work we investigate whether the functional activity of the LVA channels is regulated by the auxiliary β -subunits of the high-voltage-activated (HVA) Cav channels and if this implies a physical interaction between both proteins. Our results demonstrate that LVA channels are regulated by the $\beta 1b$ subunit of HVA channels by increasing the number of channels in the plasma membrane of HEK-293 cells transfected with both proteins. However, immunoprecipitation experiments showed no interaction between these proteins, which was confirmed by the low FRET signal detected in these cells. In conclusion, the modulation of the LVA channels by $\beta 1b$ subunit does not seem to require a physical interaction between these two proteins or if it exists, it is of low affinity.

On the other hand, we have previously reported that the loop that links domains I and II of α_1 subunit of LVA channels functions as a gating brake (for the voltage dependent activation and inactivation) of the channel, whose relevance has been evidenced in some types of epilepsy. Making molecular biology experiments to generate mutants and chimeras of LVA and HVA channels, we report that the disruption of the salt bridge

of the gating brake did not modify its structure; however, the function of the three LVA channels was significantly altered by inducing activation and inactivation to more negative voltages than those observed in the wild-type channels. The most drastic effect was observed when replacing the complete I-II loop of the LVA channel with that of the HVA, which generated a “super LVA” channel whose voltage dependence shifted towards more negative voltages (20-30 mV) with respect to the LVA channel. Based on these results, we propose that I-II loop moves towards IS4-IS5 linker of α_1 subunit in LVA channels, facilitating the interaction of amino acids with opposite electrical charges in these intracellular regions, giving rise to the peculiar dependence on the voltage of the LVA channels, that is, of low-threshold activation. Therefore, one of the perspectives of the present work consists in carrying out structure-function experiments in the Cav3 channels to investigate the contribution of arginines of the IS4-IS5 linker in the voltage dependence of the activation and inactivation of the Cav3 channels.

INTRODUCCIÓN

La excitabilidad celular es la propiedad que poseen las células para generar y transmitir señales eléctricas e involucra invariablemente el movimiento de iones a través de la membrana plasmática. Los principales iones que participan en este fenómeno son el sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}) y cloruro (Cl^-). Los iones son moléculas inmiscibles en los lípidos de la membrana y para atravesarla requieren de mecanismos específicos de transporte, de los que los más importantes son los poros o canales iónicos que atraviesan la bicapa lipídica. Dichas estructuras son complejos multiproteicos que permiten el paso selectivo de los iones mencionados arriba (Hille, 2001).

Fueron Alan Hodgkin y Andrew Huxley (que en 1963 recibieron el Premio Nobel de Fisiología y Medicina) los que demostraron que los canales iónicos (Hodgkin y Huxley, 1952) permiten el flujo pasivo de los iones a favor de su gradiente de concentración químico y eléctrico. No obstante que las contribuciones de Hodgkin y Huxley significaron los cimientos para el entendimiento de la excitabilidad celular y los mecanismos que la subyacen, fue hasta la segunda mitad de la década de 1970 cuando se dilucidó la naturaleza molecular de los canales iónicos (Henderson y Wang, 1972; Weill *et al.*, 1974; Agnew *et al.*, 1978; Raftery *et al.*, 1980). Posteriormente, con la aplicación de técnicas de biología molecular y más recientemente, de cristalografía, se obtuvo información más clara y definida de la estructura de los canales iónicos (Armstrong, 2007).

La visión actual de los canales iónicos los considera moléculas excitables de las membranas biológicas que responden de manera específica a determinados estímulos. Algunos de estos estímulos incluyen la deformación mecánica de la membrana celular, unión de neurotransmisores o cambio en el potencial de membrana.

No obstante, los canales iónicos no son simples poros acuosos conductores, sino que, además, desarrollan 3 funciones fundamentales:

1) Permiten el flujo de iones a una velocidad muy superior a la de cualquier otro sistema biológico (10^8 iones s^{-1} , frente a 10^3 iones s^{-1} que mueve un transportador o una ATPasa con función de bomba iónica). El flujo de iones que atraviesa cada canal puede medirse como una corriente eléctrica (10^{-12} - 10^{-10} A) que es capaz de producir rápidos cambios en el potencial de membrana.

2) En respuesta a diversos estímulos, los componentes moleculares del canal son capaces de adoptar diversos estados o conformaciones estructurales. Los canales activados por cambios de voltaje presentan, al menos, un estado conductor (abierto o activo) y dos no conductores (inactivo y de reposo o cerrado). El estado abierto permite el paso de iones. A nivel del potencial de reposo celular, la probabilidad de apertura de algunos canales es mínima, es decir, que sólo un reducido número de canales puede abrirse al azar. La despolarización celular (i.e., cuando el potencial de membrana se lleva a un valor más positivo) produce la activación del canal al aumentar la probabilidad de apertura del mismo, pero si la despolarización es mantenida, la probabilidad de apertura disminuye como consecuencia del proceso de inactivación iniciado simultáneamente por el proceso de activación; así el canal pasa al estado inactivado desde el cual ya no puede volver a abrirse. Para que el canal vuelva a abrirse es necesario que regrese al estado de reposo. Este paso del estado inactivo al de reposo, se denomina reactivación del canal y se produce durante la repolarización celular. Por tanto, la magnitud de la corriente que cruza la membrana depende de la densidad de canales, de la conductancia del canal (constante eléctrica asociada a la magnitud de la corriente que fluye a través del canal) abierto y de cuánto tiempo el canal permanece en el estado abierto.

3) Presentan selectividad iónica, en el caso particular de los canales de K^+ , son al menos, 10,000 veces más permeables al K^+ que al Na^+ (Hille, 2001). En general, el poro de los canales activados por voltaje es altamente selectivo para un determinado ión, mientras que los activados por otros estímulos presentan menor selectividad y pueden, en muchos casos, permitir el flujo de aniones o cationes.

Seguramente los canales iónicos aparecieron muy temprano en la historia de la vida, ya que se han encontrado en bacterias y protozoarios, además se especula que han evolucionado a partir de un ancestro común y que han estado sujetos a presiones evolutivas alcanzando mayor precisión y velocidad en el señalamiento en animales con sistemas nerviosos bien desarrollados (Franciolini y Petris, 1989; Hille, 2001).

Los canales iónicos pueden ser agrupados de forma general en dos grandes clases, los canales activados por ligando (p. ej., hormonas y neurotransmisores) y los canales activados por voltaje. Estos últimos responden a cambios en el potencial de membrana (V_m), modulan el potencial de membrana y la permeabilidad iónica en la mayoría de las células excitables (Catterall, 1988; Strong *et al.*, 1993). En el presente trabajo se utilizará el termino “canales activados por voltaje” para referirse a los canales activados por cambios en el V_m . Debido a las similitudes que los caracterizan y que comparten entre ellos, los canales activados por voltaje se integran en una superfamilia conformada por los canales de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} (Catterall, 1988; Jan y Jan, 1990; Hille, 2001) (**Fig. 1**).

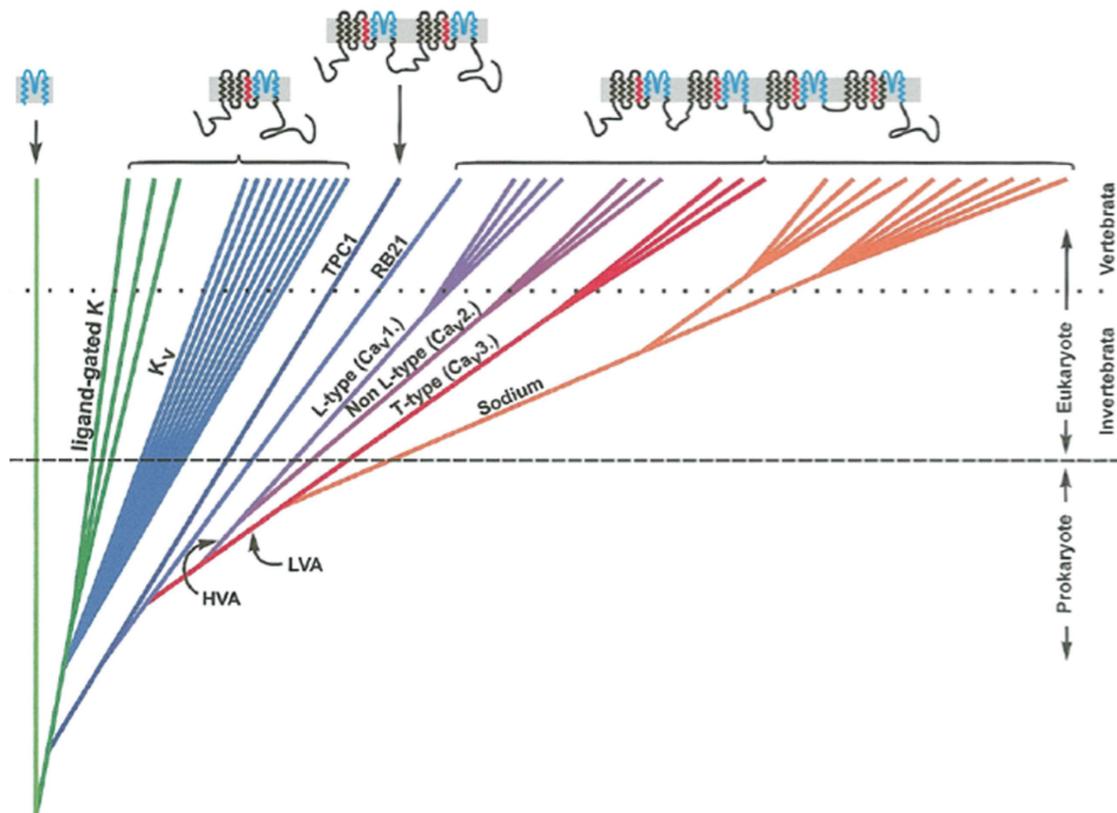


Figura 1. Diagrama esquemático de las relaciones evolutivas entre los principales grupos de la superfamilia de canales iónicos. La línea del tiempo imaginaria es de izquierda a derecha, con las estructuras de los canales más elementales indicados por la línea verde de la extrema izquierda y las mas complejas hacia la derecha del árbol. En la parte superior de la figura se muestra la estructura de los canales, de izquierda a derecha un canal de fuga de K^+ compuesto por dos hélices transmembranales y un poro (azul); un canal con seis segmentos transmembranales (6TM) con un único sensor de voltaje (rojo) y un canal 4X6TM con cuatro sensores de voltaje (Zakon, 2012).

CANALES DE CALCIO ACTIVADOS POR VOLTAJE

Los canales de calcio activados por voltaje (canales Cav) juegan un papel fundamental en el influjo de calcio a las células. La elevación de las concentraciones intracelulares de calcio contribuye a la regulación de diferentes procesos fisiológicos incluyendo la excitabilidad celular, la contracción muscular y la secreción de hormonas y neurotransmisores (Berridge, 2005). La primera clasificación de los canales Cav tomó en consideración el voltaje que se requiere para activarlos. De acuerdo a los estudios

electrofisiológicos realizados en la década de 1980-1990, se logró identificar dos grandes clases de canales de calcio, los de bajo umbral de activación o LVA y los de alto umbral de activación o HVA (Carbone y Lux, 1984; Matteson y Armstrong, 1986; Bean, 1989). Los canales LVA se activan a potenciales de membrana cercanos a -60 mV, mientras que los HVA se activan a voltajes menos negativos, entre -30 y -20 mV. Además de su bajo umbral de activación, los canales LVA también se caracterizan por su rápida inactivación durante una despolarización sostenida, su lenta desactivación o cierre del canal, y una conductancia unitaria de aproximadamente 8 pico Siemens (pS). Por su parte, los canales HVA se inactivan más lentamente, se cierran muy rápido y tienen una conductancia unitaria tres veces más grande que los LVA (Bean, 1985; Nowycky *et al.*, 1985; Matteson y Armstrong, 1986).

Los diversos tipos de corrientes de calcio pueden ser distinguidos de forma individual por sus propiedades biofísicas, así como por su sensibilidad a diferentes toxinas y fármacos (Catterall, 2000). Los canales HVA generan corrientes tipo L (de larga duración), tipo N (identificadas originalmente en neuronas), las corrientes tipo P (registradas por primera vez en neuronas de Purkinje), las corrientes tipo Q (caracterizadas en células granulares del cerebelo), y finalmente, las corrientes tipo R, que se refiere a la corriente de calcio remanente después haber bloqueado el resto de canales HVA. Por su parte, los canales LVA generan únicamente corrientes tipo T (transitorias).

Combinando estudios de clonación, expresión de canales recombinantes y farmacología, a la fecha se ha logrado la identificación de diez genes que codifican para subunidades α_1 de canales Ca_v . Siete de tales subunidades generan corrientes tipo HVA (Tsien *et al.*, 1995), mientras que los restantes tres genes codifican para subunidades α_1 que dan origen a corrientes tipo LVA (Perez-Reyes, 2003). La

correspondencia entre subunidad α_1 y tipo de canal Cav , así como su más reciente nomenclatura se presenta en la **Fig. 2**. Como se puede concluir a partir de la información de dicha figura, existen diferentes nomenclaturas para nombrar un mismo tipo de canal de calcio dependiente de voltaje. Con la idea de unificar criterios para la clasificación de los canales de calcio, se recurrió a la nomenclatura ya utilizada previamente en otras familias de canales activados por voltaje (Jan y Jan, 1990; Ertel *et al.*, 2000; Goldin *et al.*, 2000). El primer término de la nomenclatura se refiere al ion permeante (Ca^{2+} , en este caso), seguido del estímulo principal para la apertura o cierre del canal, que en este caso es el voltaje (indicado como subíndice). Finalmente, dos números separados por un punto: el primero indica la familia de proteínas, mientras que el segundo número identifica a la isoforma particular. Por ejemplo, el canal $Cav3.2$ identifica al canal de calcio dependiente de voltaje tipo T, codificado por la subunidad α_1H .

Los canales LVA también conocidos como canales tipo T o $Cav3$ se expresan en diferentes tejidos incluyendo el sistema nervioso (Talley *et al.*, 1999; Molineux *et al.*, 2006) corazón (Bohn *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 2002; Cribbs, 2010) músculo liso y esquelético (Chen *et al.*, 2003; Cribbs 2006), espermatozoides (Darszon *et al.*, 2006) y algunos órganos endocrinos (Yang y Berggren, 2005; Braun *et al.*, 2008). Muestran propiedades funcionales únicas, están disponibles para su apertura desde potenciales de membrana muy negativos cercanos al potencial de reposo celular, por lo que son ideales para regular la excitabilidad de neuronas y otros tipos celulares bajo condiciones fisiológicas. Una característica típica de estos canales es la “corriente de ventana” que se observa principalmente en neuronas con un potencial de reposo celular relativamente hiperpolarizado, donde las curvas de activación e inactivación se empalman en un rango de voltajes, resultando en una ventana de voltajes en los que

los canales se encuentran abiertos y permiten el flujo pasivo de calcio al interior celular (Hirano *et al.*, 1989; Crunelli *et al.*, 2005). Los canales LVA también son responsables de las espigas de calcio de bajo umbral en una variedad de neuronas del sistema nervioso central (Cheong y Shin, 2013). Además, la disfunción de los canales tipo T se ha implicado en diferentes condiciones patológicas como epilepsia, dolor neuropático, desordenes neuropsiquiátricos, fibrilación atrial, insuficiencia cardíaca congénita y cáncer (Kim *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Bourinet *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2007; Cribbs, 2010; Uslaner *et al.*, 2012; Gangarossa *et al.*, 2014; Weaver *et al.*, 2015; Antal y Martin-Carballo, 2019).

La participación crucial de los canales de calcio tipo T en la fisiología del humano se enfatiza por la existencia de varias canalopatías, las cuales son desordenes causados o exacerbados por mutaciones en los genes que codifican para estos canales. Las manifestaciones clínicas de tales desordenes son debidas principalmente a la disfunción de las propiedades biofísicas y del tránsito de los canales a la membrana plasmática, lo cual puede conducir a una ganancia o pérdida de función del canal. Dentro de las canalopatías más conocidas se encuentran la epilepsia idiopática generalizada, desordenes de autismo, dolor crónico, y aldosteronismo primario, todas estas asociadas a mutaciones en el gen que codifica para el canal Cav3.2 (*CACNA1H*); mientras que para Cav3.1 (*CACNA1G*) se han descrito varias mutaciones presentes en ataxia cerebelar y en Cav3.3 (*CACNA1I*) se han observado mutaciones en pacientes con esquizofrenia (para una revisión ver Weiss y Zamponi, 2019).

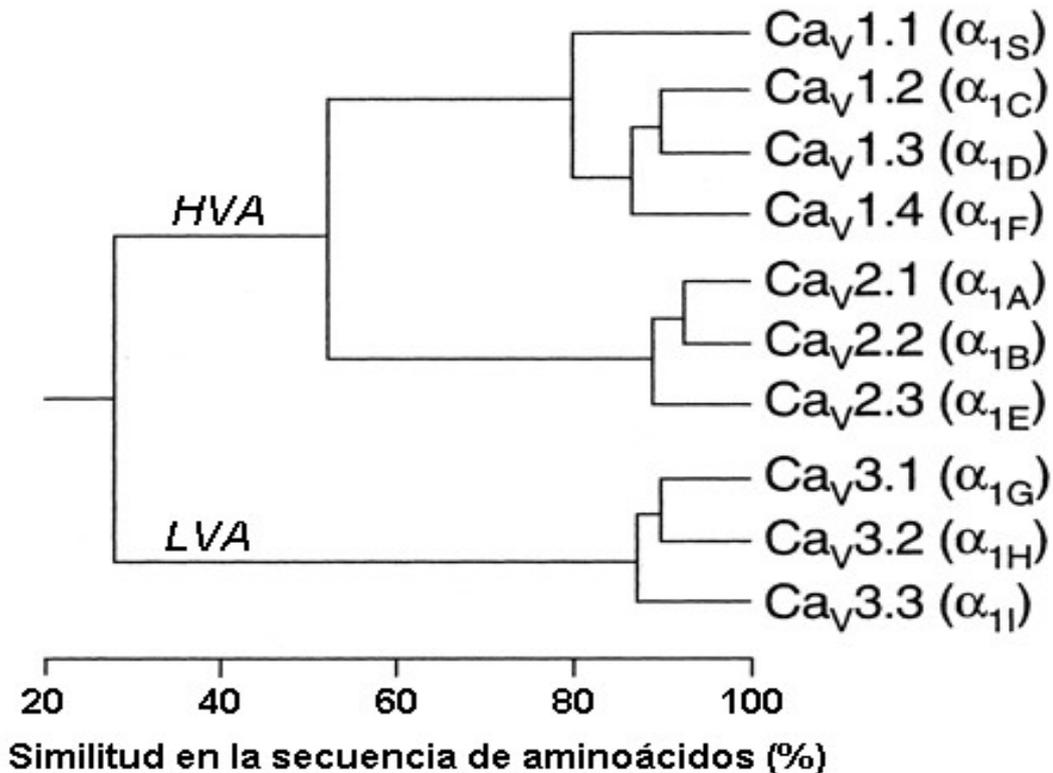


Figura 2. Filogenia de las subunidades α_1 de los canales de calcio activados por voltaje. La comparación de las secuencias se basó en los aminoácidos (aa) de los segmentos transmembranales y del poro (aproximadamente 350 residuos). El análisis arrojó como resultado tres familias claramente separadas (Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3) con aproximadamente un 80% de identidad entre los miembros de cada familia. La identidad entre las secuencias de aminoácidos de las familias Ca_v1 y Ca_v2 fue de 52%, mientras que Ca_v3 presentó solo el 28% de identidad con las otras dos familias (Modificado de Ertel *et al.*, 2000).

PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE LOS CANALES Ca_v

El poro de conducción de ambos grupos de canales (HVA y LVA) está formado por la subunidad principal, α_1 , la cual detecta los cambios en el potencial de membrana e incluye sitios de interacción con fármacos que modulan la actividad del canal. La subunidad α_1 está compuesta por cuatro dominios homólogos (I a IV), conectados por asas intracelulares y cada dominio integrado a su vez por seis segmentos transmembranales (S1 a S6) (Catterall, 2011). Del S1 al S4 de cada dominio se considera como el modulo del sensor de voltaje mientras que el S5 y S6 como el

modulo del poro de conducción (Catterall, 2010) (**Fig. 3A**). Cada segmento S4 de los canales Cav contiene entre cuatro y seis aminoácidos con carga positiva (arginina o lisina), lo cual le confiere la propiedad de detectar y responder a los cambios en el potencial de membrana.

Los canales LVA parecen requerir únicamente de la subunidad α_1 para generar corrientes como las que se registran generalmente de preparaciones biológicas (**Fig. 3B**; Perez-Reyes *et al.*, 1998; Klockner *et al.*, 1999). Los canales HVA por el contrario son complejos multiproteicos formados por la subunidad α_1 y varias subunidades auxiliares nombradas β , $\alpha_2\delta$ y γ , mismas que modulan la actividad de dichos canales (**Fig. 3C y 3D**) (Arikkath y Campbell, 2003; Simms y Zamponi, 2014; Wu *et al.*, 2016). En particular las subunidades β modulan a los canales HVA mediante incrementos en la expresión de los canales en la membrana celular (Josephson *et al.*, 1996; Kamp *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1998; Yasuda *et al.*, 2004) y modificando la dependencia al voltaje y cinética de la corriente (Jones *et al.*, 1998; Arikkath y Campbell, 2003; Simms y Zamponi, 2014). La interacción de las subunidades α_1 y β se lleva a cabo a través de una secuencia de 9 aminoácidos altamente conservada en todos los canales HVA pero no en los LVA conocida como *Alpha Interaction Domain* (AID; **Fig. 4B**) localizada en el asa intracelular que une a los dominios I y II de la subunidad principal, y una estructura en forma de bolsa en la subunidad auxiliar, conocida como *Alpha Binding Pocket* (ABP; **Fig. 4A**), esta es una interacción de alta afinidad, con un K_d entre 2 y 54 nM (DeWaard *et al.*, 1995; DeWaard *et al.*, 1996; Canti *et al.*, 2001).

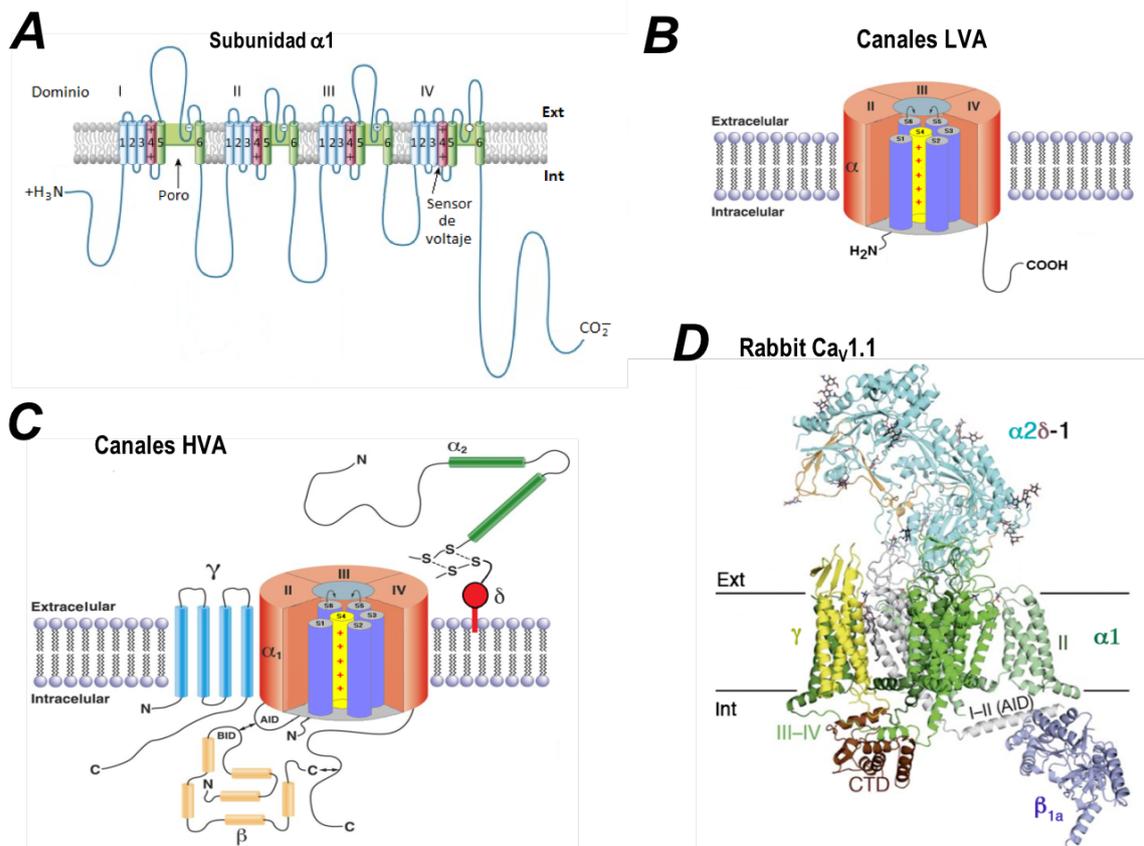
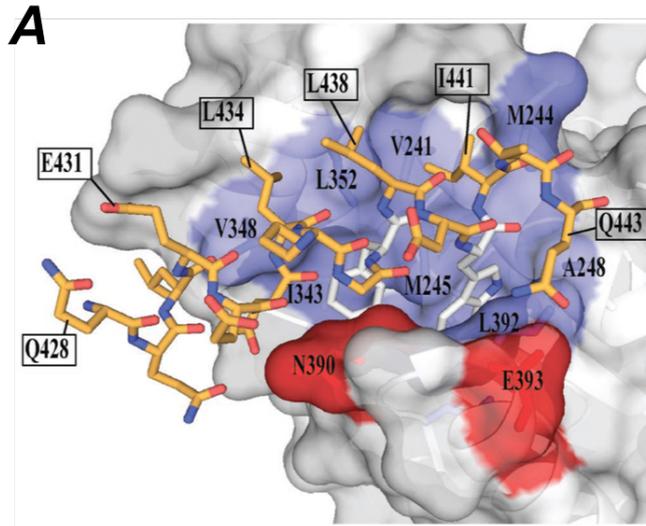


Figura 3. Arquitectura de los canales Cav. **A)** Representación esquemática de la estructura primaria de la subunidad α_1 de los canales de calcio. La subunidad α_1 , la única que es común a los canales LVA y HVA, es una proteína de ~270 kDa que consiste de cuatro dominios homólogos (I al IV), y cada uno de ellos presenta seis segmentos transmembranales (S1 a S6) y un asa del poro (P) entre el S5 y S6. El segmento S4 se caracteriza por poseer varios aminoácidos con carga positiva, que le permiten detectar los cambios en el voltaje transmembranal, por lo que recibe el nombre de sensor de voltaje. **B y C)** Topología propuesta para el patrón de ensamblaje de un canal LVA y un HVA, respectivamente. Las evidencias experimentales sugieren que los canales LVA consisten únicamente de la subunidad principal α_1 . Por su lado, los canales HVA incluyen además diferentes subunidades accesorias: β , $\alpha_2\delta$, y γ . El poro central se forma por el plegamiento de los cuatro dominios que conforman la subunidad α_1 . En estos esquemas el sensor de voltaje (S4) se presenta aislado del ambiente lipídico de la membrana por el resto de la proteína de la subunidad α_1 . Las subunidades α_1 y β interactúan en un sitio denominado AID en el asa que une los dominios I y II de la subunidad α_1 (Modificado de Randall y Benham, 1999). **D)** Estructura del canal de calcio de músculo esquelético de conejo ($\text{Ca}_v1.1$) obtenida por Criomicroscopía Electrónica (Cryo-EM; Wu *et al.*, 2016). Las subunidades están indicadas en colores, así como la región AID. CTD, dominio carboxilo terminal de la subunidad α_1 . Nótese que el dominio de anclaje de la subunidad δ (café claro) está distanciada de su supuesta posición en la membrana celular en esta estructura de Cryo-EM, probablemente porque está interactuando con el detergente y no con la membrana celular, la cual no está presente en la preparación de Cryo-EM.

También han sido implicados sitios de interacción de baja afinidad en el amino y carboxilo terminal de los canales HVA (Walker *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2000; Stephens *et al.*, 2000; Cornet *et al.*, 2002). En contraste, se ha sugerido que los canales LVA no son modulados por las subunidades auxiliares (Lacinova *et al.*, 1995; Leuranguer *et al.*, 1998; Arias *et al.*, 2005). Las corrientes nativas muestran un comportamiento electrofisiológico bastante similar al de los canales recombinantes expresados sin subunidades auxiliares (Perez-Reyes *et al.*, 1998; Klockner *et al.*, 1999) en sistemas heterólogos y la composición por subunidad se desconoce debido a la estrategia con la cual fueron clonados (estrategia *in silico*) (Cribbs *et al.*, 1998; Perez-Reyes *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999; Gomora *et al.*, 2002). Sin embargo, algunos estudios respaldan la idea que las subunidades auxiliares pueden regular a los canales LVA (Dolphin *et al.*, 1999; Dubel *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2004; Thomsom *et al.*, 2011). Más reciente se ha sugerido una asociación de baja afinidad entre péptidos sintéticos correspondientes a la parte proximal del asa I-II de Cav3.3 y subunidades β (Bae *et al.*, 2010).

Uno de los objetivos del presente trabajo consistió precisamente en investigar sistemáticamente si la actividad funcional de los canales LVA es regulada por las subunidades β de los canales HVA y si dicha regulación puede ser explicada por una interacción física entre las proteínas completas de los canales LVA y las subunidades β en cuestión.



B

- * * *

Ca_v1.1 QQLDEDLRGYMSWITQGE

Ca_v1.2 QQLEEDLKG YLDWITQAE

Ca_v1.3 QQLEEDLKG YLDWITQAE

Ca_v1.4 QQMEEDLRG YLDWITQAE

Ca_v2.1 QQIERELNGYMEWISKAE

Ca_v2.2 QQIERELNGYLEWIFKAE

Ca_v2.3 QQIERELNGYRAWIDKAE

 QQ-E--L-GY--WI---E

Ca_v3.1 GSCYEELLKYL VYILRKA

Ca_v3.2 GSCYEELLK YVGHIFRAV

Ca_v3.3 GDCYEEIFQYVCHILRKA

 hhhhhhhhhhhhhhhh

 _____héllice 2_____

Figura 4. Interacción entre el AID y el ABP y alineamiento del AID para los canales Cav.

A) Representación de superficie del dominio ABP de la subunidad β2a unida a la región AID (ilustrada como cilindros anaranjados). La Tirosina 437 y el triptófano 440 se ilustran en color blanco; se puede observar que estos aminoácidos son los que penetran más en el ABP. Los residuos que participan en interacciones hidrofóbicas se marcan con azul y los que forman puentes de hidrógeno con rojo (Tomada de Van Petegem *et al.*, 2004). **B)** Alineamiento de los aminoácidos que constituyen la región del AID en los canales HVA (subfamilias Cav1 y Cav2). Los 9 residuos conservados en todos los canales HVA se presentan en la línea que separa el alineamiento con el de los canales LVA (subfamilia Cav3). En estos últimos solo se conservan tres residuos de los 9 y uno más mantiene la misma carga (indicados con los asteriscos y un guion, respectivamente). En la parte inferior del alineamiento se muestra la predicción de estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos para los canales Cav3 con el algoritmo SOPMA (ver Métodos; la letra **h** indica estructura en hélice). Nótese que la posible región del AID en los canales Cav3 se sobre lapa con la hélice 2 del freno de la compuerta distintivo de estos canales (véase el siguiente apartado).

Freno de la compuerta de los canales Cav3

El asa intracelular que une a los dominios I y II de los canales de calcio HVA es una región relevante para la regulación de estos ya que es blanco de proteínas G, proteínas cinasas y subunidades auxiliares (Catterall, 2000). Nuestro grupo de investigación en conjunto con el grupo del Dr. Edward Perez-Reyes de la Universidad de Virginia, hemos mostrado que el asa correspondiente en los canales LVA funciona como un punto regulador intrínseco para la dependencia al voltaje de la activación e inactivación a través de una estructura denominada freno de la compuerta de activación-inactivación (del inglés *gating brake*) (Arias-Olguín *et al.*, 2008). Para los fines del presente trabajo, en adelante esta estructura será referida exclusivamente como **freno de la compuerta** (en el entendido de que dicha estructura influye en el movimiento de las estructuras del canal asociadas con la dependencia al voltaje de la activación e inactivación). El freno de la compuerta comprende los primeros 65 aminoácidos que se ubican justo después del extremo intracelular del S6 del Dominio I y presenta una estructura secundaria bien definida, dos hélices alfa unidas por una estructura aleatoria (Arias-Olguín *et al.*, 2008; Perez-Reyes, 2010) (**Fig. 5**).

Esta región es crucial para que los canales LVA presenten una activación e inactivación (*gating*), así como otras propiedades biofísicas distintivas de estos canales. Cuando la estructura de cualquiera de las dos hélices es alterada o incluso cuando la estructura aleatoria que las une se sustituye por una estructura más estable como una hélice, la activación e inactivación que caracteriza los canales LVA se modifica drásticamente, llevándose a cabo a potenciales de membrana hiper-negativos (Baumgart *et al.*, 2008). La relevancia del freno de la compuerta se ha puesto de manifiesto en algunos tipos de epilepsia debidas a mutaciones puntuales en dicha región del canal (Chen *et al.*, 2003; Vitko *et al.*, 2007; Eckle *et al.*, 2014). Interesantemente, se ha propuesto la formación de una interacción electrostática, un

puente salino entre dos aminoácidos con carga eléctrica opuesta, uno negativo (ácido glutámico) en la hélice 1 y uno positivo (arginina) en la hélice 2. Dicha interacción se ha propuesto para el canal $Ca_v3.2$, sin embargo, no es claro si ésta se conserva en los tres canales LVA y menos evidente es su papel a nivel estructural o funcional, por lo que una segunda meta del presente trabajo es estudiar la relevancia estructura-función que el presunto puente salino representa para el freno de la compuerta en todos los canales LVA.

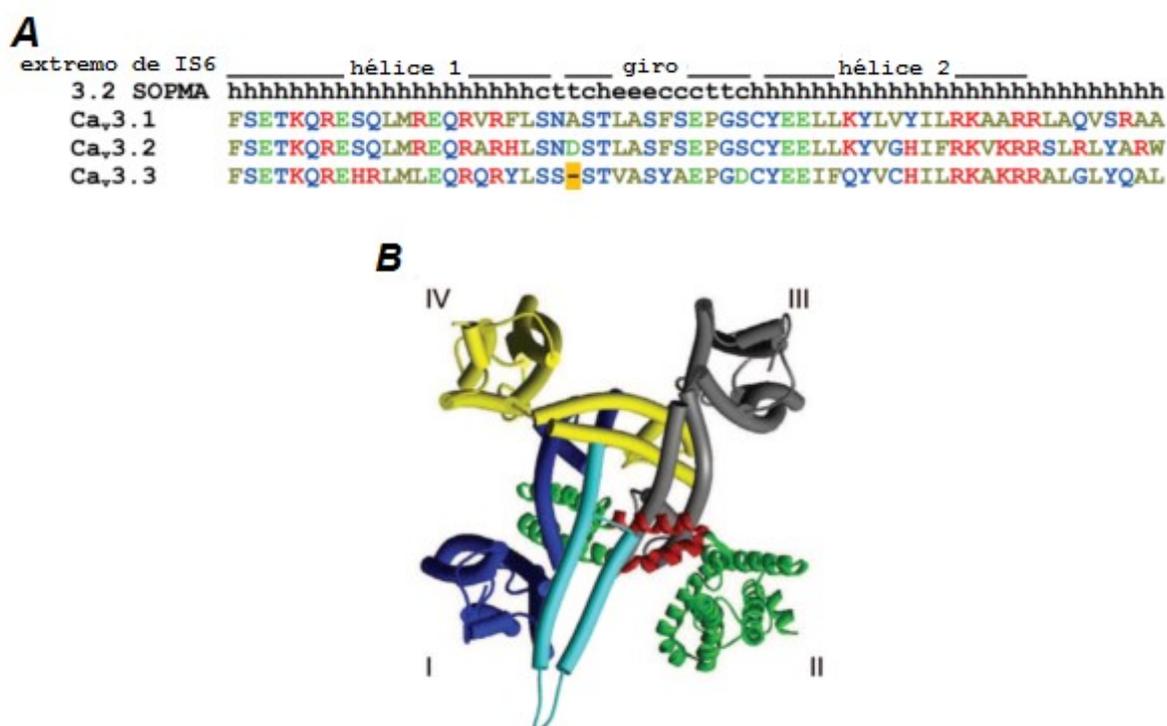


Figura 5. Secuencia y modelo de la estructura del freno de la compuerta de los canales LVA. A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los tres canales Ca_v3 de humano. La predicción de la estructura secundaria con el algoritmo SOPMA se muestra en la parte superior del alineamiento. Cada letra simboliza un estado estructural, donde **h** = hélice alfa, **c** = espiral al azar, **t** = giro beta, **e** = hebra extendida. **B)** Modelo tridimensional propuesto del freno de la compuerta (azul claro) superpuesto en la estructura cristalográfica de la construcción quimérica $K_v1.2$ - $K_v2.1$ (azul, amarillo, gris, verde y rojo). La vista es desde el interior de la célula de frente a la membrana, se sugieren contactos entre las hélices del freno de la compuerta con las regiones de la proteína del canal quimérico de potasio equivalentes a los Dominos I y II de la subunidad α_1 de los canales LVA (Modificado de Perez-Reyes, 2010).

Otra característica estructural de los canales LVA o Ca_v3 es que, además de los cuatro residuos cargados positivamente en el S4 del Dominio I (IS4), contienen dos argininas extras en el asa que une los segmentos S4 y S5 (asa IS4-IS5). Con los datos publicados de la estructura atómica del canal $Ca_v1.1$ (Wu *et al.*, 2016) es posible predecir que esta región pudiera interactuar físicamente con otras regiones intracelulares como el asa I-II, la cual es la región intracelular de mayor tamaño y movilidad (Perez-Reyes, 2010). Esta posibilidad ha sido inferida por el trabajo de Sanchez-Sandoval y cols. (2018), en el que al transferir el IS4 del canal $Ca_v3.3$ en el del $Ca_v1.2$ se observó que el canal quimérico se inactiva a voltajes sustancialmente más negativos de lo normal, una característica semejante a la observada cuando los canales LVA pierden su regulación intrínseca por afectaciones en el freno de la compuerta (Arias-Olguin *et al.*, 1998).

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El estudio de los canales LVA o Ca_v3 con un abordaje de estructura-función como el presente son de sustancial relevancia ya que por un lado, estos canales se expresan ampliamente en el organismo, encontrándose en el sistema nervioso, corazón, riñones, páncreas, músculo esquelético, espermatozoides, arterias, venas, pulmones, útero, vejiga y colon entre otros tejidos (Perez-Reyes, 2003); y por otro lado muestran propiedades funcionales únicas, entre ellas que se encuentran disponibles para abrirse desde potenciales de membrana muy negativos, cercanos al potencial de reposo de varios tipos celulares, por lo que representan elementos cruciales para la regulación de la excitabilidad celular en los tejidos mencionados bajo condiciones fisiológicas. Una característica relevante de estos canales es la presencia de la corriente de ventana, observada principalmente en neuronas con potencial de membrana relativamente hiperpolarizado, donde la dependencia al voltaje de

activación e inactivación se empalman en un estrecho intervalo de voltajes que permite la activación estocástica de dichos canales, permitiendo la entrada de calcio a las células de manera espontánea, así como pequeñas despolarizaciones del potencial de membrana que pueden originar el disparo de potenciales de acción (Huguenard y Prince, 1992; Perez-Reyes, 1998, Cribbs *et al.* 2000; Crunelli *et al.*, 2005;). Los canales LVA originan las espigas de calcio de bajo umbral (Cheong y Shin, 2013) en una variedad de células, con lo cual pueden ser responsables de los marcapasos celulares en los tejidos donde se expresan. Como es de esperarse debido a su amplia distribución e importantes funciones se ha implicado el mal funcionamiento de estos canales en diversas patologías como epilepsia, dolor neuropático, desordenes neuropsiquiátricos, fibrilación atrial y cáncer (Kim *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Bourinet *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2007; Cribbs, 2010; Uslaner *et al.*, 2012; Gangarossa *et al.*, 2014; Weaver *et al.*, 2015). Por lo anterior, el avance en el conocimiento de la modulación de los canales Cav3 por subunidades β , así como la regulación de su funcionamiento por la estructura del asa I-II de la subunidad α_1 permitirá un mejor entendimiento de la fisiología de los canales Cav3, así como de las enfermedades en las que han sido involucrados.

HIPÓTESIS

Con base en los antecedentes mostrados anteriormente se formularon las siguientes hipótesis de investigación:

- 1.** Las subunidades α_1 de los canales LVA serán reguladas por las subunidades β mediada por una interacción física entre ambas proteínas.
- 2.** El canal quimérico IC_{LI-II} exhibirá una dependencia al voltaje de la activación e inactivación a voltajes más negativos comparada con el canal LVA $Ca_v3.3$ silvestre.
- 3.** El puente salino que une ambas hélices del freno de la compuerta de activación e inactivación de los canales LVA será crucial para la preservación estructural y funcional del mencionado freno.

OBJETIVOS

Los objetivos generales del presente trabajo de investigación son los siguientes:

1. Evaluar los cambios en la corriente de los canales LVA generados por la presencia de las subunidades β de los canales de calcio activados por voltaje.
2. Determinar si las proteínas correspondientes a las subunidades α_1 de los tres canales LVA interactúan físicamente con alguna de las proteínas correspondientes a las subunidades β de los canales de calcio HVA.
3. Investigar la relevancia estructural y funcional del puente salino situado en el freno de la compuerta.

Para cumplir con las metas anteriores se propusieron los siguientes objetivos particulares:

- 1.1. Expresar los canales LVA en un sistema heterólogo idóneo para evaluar por medio de la técnica de *patch-clamp* sus propiedades electrofisiológicas, entre estas, la densidad de corriente, dependencia al voltaje de activación e inactivación, así como las características cinéticas de tales procesos y de la desactivación de dichos canales en ausencia y en presencia de las subunidades β de los canales HVA.
- 2.1. Investigar si la presencia de las subunidades β (o alguna de ellas en particular) modifica la distribución celular de los canales LVA, evaluando la colocalización de estos canales con la membrana celular por medio de microscopía confocal.
- 2.2 Determinar si existe FRET entre los canales LVA y las subunidades β (o alguna de ellas en particular); considerando este fenómeno como una medida de asociación física entre ambas proteínas.

2.3. Evaluar si existe un acoplamiento físico entre los canales LVA y la subunidad β en cuestión, estudiando la co-inmunoprecipitación entre estas dos proteínas por medio de *western blot*.

3.1. Generar una batería de canales LVA mutantes tanto *in silico* como *in vitro* con sustituciones de los aminoácidos cargados negativamente por alanina, indispensables para la formación del puente salino entre las hélices alfa del freno de la compuerta de los canales LVA y evaluar el efecto de estas sustituciones en su estructura y función.

3.2. Explorar la conservación del freno de la compuerta y el puente salino en los canales LVA de diferentes *taxa* animales, mediante la generación de alineamientos de la secuencia del asa I-II.

3.3. Evaluar la relevancia que tiene el asa I-II de los canales LVA en la dependencia al voltaje de activación e inactivación, mediante la construcción de un canal $Ca_v3.3$ quimérico en el cual se sustituya la mencionada asa por la del canal HVA $Ca_v1.2$.

METODOLOGÍA

La metodología empleada en este trabajo se divide en seis apartados: I) construcción de los canales fusionados y mutantes, II) predicción de la estructura de los canales LVA, III) cultivo celular y transfección, IV) registro electrofisiológico, V) inmunoprecipitación y VI) microscopía confocal. A continuación, se describe cada uno de estos apartados.

I. CONSTRUCCIÓN DE LOS CANALES FUSIONADOS Y MUTANTES

Se construyeron mutantes de las diferentes subunidades α_1 y β de los Ca_v que posteriormente se emplearon para estudiar su función y/o interacción por medio de electrofisiología, microscopía confocal y *western blot*. En la **Tabla 1** se presentan las subunidades silvestres y mutantes empleadas en este trabajo, así como los oligonucleótidos utilizados para su desarrollo. Todas las construcciones mutantes fueron verificadas mediante secuenciación automatizada en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Subunidades α_1 y β fusionadas a proteínas fluorescentes.

Las subunidades usadas en los experimentos de microscopía confocal fueron fusionadas a proteínas fluorescentes. Por un lado, la subunidad α_1 de $\text{Ca}_v1.2$ se fusionó a la proteína verde fluorescente (GFP) y la subunidad $\beta1b$ a la proteína azul fluorescente (BFP). Los vectores de ambas proteínas se obtuvieron de la marca Invitrogen (pRSET/EmGFP y pRSET/EmGBFP; ambos donados amablemente por el Dr. Gustavo Martínez, Instituto Nacional de Psiquiatría). Por otro lado, la GFP empleada para fusionar a las subunidades α_1 los canales $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{Ca}_v3.3$ fue la de Clontech (pEGFP-C1, donada amablemente por el Dr. Edward Perez-Reyes, University of Virginia).

Mediante mutagénesis dirigida (oligonucleótidos 1-F y 1-R) se insertaron sitios de reconocimiento para la enzima BamHI en los extremos amino y carboxilo de la secuencia de nucleótidos de la BFP; posteriormente la secuencia de la BFP (flanqueada por los sitios BamHI) se clonó en este mismo sitio de restricción del vector β 1b-pcDNA3 (donación del Dr. Terrance Snutch, University of British Columbia), asegurando que el marco de lectura no se desplazara, con lo cual la BFP quedó fusionada al amino terminal de la subunidad β 1b. Adicionalmente, esta misma subunidad auxiliar fue etiquetada en el carboxilo terminal con la secuencia de aminoácidos YPYDVPDYA (oligonucleótidos 2-F y 2R), correspondientes al epítipo de la hemaglutinina del virus de influenza (HA), con la finalidad de ser utilizada en experimentos de inmunoprecipitación y *western blot*. Para fusionar la GFP en el amino terminal del canal Cav1.2, se insertaron sitios de reconocimiento para la enzima EcoRI en los extremos de la secuencia de nucleótidos del cDNA que codifica para la proteína fluorescente (oligonucleótidos 1-F y 3-R), posteriormente esta construcción se subclonó en el sitio EcoRI del vector Cav1.2-pcDNA6 (Donado por la Dra. Diane Lipscombe, Brown University), garantizando que el marco de lectura no se desplazara. Mientras que la secuencia de nucleótidos de los canales Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3 fue clonada en el sitio KpnI del vector pEGFP-C1 lo que resultó en canales fusionados al carboxilo terminal de la GFP.

Canales LVA mutantes del freno de la compuerta

En la construcción de los canales LVA mutantes donde se cambió el ácido glutámico (Glu o E) por la alanina (Ala o A) con la finalidad de estudiar la relevancia estructural y funcional del puente salino (iónico) formado entre ambas hélices alfa del freno de la compuerta (asa I-II; ver **Fig. 4**), se ocuparon plásmidos de tamaño menor al original (más de 13 kb) en los cuales se generaron las mutaciones mediante PCR con la estrategia de QuikChange (Agilent Technologies), la cual permite insertar una

mutación específica en cualquier plásmido y no requiere de vectores especializados, sitios de restricción únicos o múltiples transformaciones. Para llevar a cabo este tipo de ensayos se requiere de dos oligonucleótidos sintéticos (*primers*) que contengan la mutación que se desea insertar en el plásmido de interés. Los oligonucleótidos (cada uno complementario a la hebra opuesta de DNA, con una longitud de 25 - 45 bases y una $T_m \geq 78^\circ\text{C}$) se extienden durante ciclos de temperatura utilizando la DNA polimerasa *PfuUltra* (Agilent Technologies) u otra polimerasa de alta fidelidad. La incorporación de los oligonucleótidos genera al plásmido mutante, el cual se trata con la enzima Dpn I, que digiere al DNA templado parental (proveniente de una cepa de *Escherichia coli*), debido a su actividad de endonucleasa específica para el DNA metilado o hemimetilado. Como resultado de esta reacción se selecciona exclusivamente el DNA mutante recientemente sintetizado. Por último, el DNA mutante se transforma en células ultra competentes (One Shot® TOP10, Thermo Fisher Scientific). Las colonias de bacterias obtenidas se tamizan mediante secuenciación automatizada para identificar las mutantes positivas.

Para la construcción del canal mutante $\text{Ca}_v3.1\text{-E477A}$ se clonó el fragmento HindIII-NheI de $\text{Ca}_v3.1$ (1.5 kilo bases; kb) en los mismos sitios del sitio de clonación múltiple (*polylinker*) del vector pcDNA6. En esta construcción intermedia se realizó la reacción de PCR para sustituir el Glu477 por Ala (oligonucleótidos 4-F y 4-R), con la misma estrategia de QuikChange. El fragmento mutante se subclonó en el plásmido $\text{Ca}_v3.1\text{-pcDNA3}$ utilizando los mismos sitios de restricción (HindIII-NheI), obteniendo así el canal $\text{Ca}_v3.1\text{-E477A}$.

De manera similar, el canal mutante $\text{Ca}_v3.2\text{-E429A}$ se generó a partir de la clonación del fragmento EcoRI-EcoRI de 2.2 kb de $\text{Ca}_v3.2$ en pUC19, en cuya construcción intermedia se realizó la PCR con la que se sustituyó el Glu429 por Ala

(oligonucleótidos 5-F y 5-R). Posteriormente, se trasladó el fragmento Ascl-Ascl (1.6 kb) de la construcción mutante intermedia al plásmido Cav3.2-pcDNA3, obteniendo así la construcción final Cav3.2-E429A.

Para producir al canal mutante Cav3.3-E408A, se utilizó la construcción intermedia Cav3.3-AvCl-pBSIIKS(-) de 5.6 kb, que contiene el fragmento AvrII-ClaI de 2.6 kb clonado en los mismos sitios del vector pBluescript II KS (-) (Donado por el Dr. Félix Recillas, Instituto de Fisiología Celular, UNAM) previamente modificado para expresar el sitio AvrII en su polylinker. En dicha construcción intermedia se llevó a cabo la PCR para insertar la mutación del Glu por Ala (oligonucleótidos 6-F y 6-R). Posteriormente se trasladó el fragmento con la mutación (ClaI-AvrII, 2.6 kb) al plásmido Cav3.3-pcDNA3 para obtener al canal mutante completo Cav3.3-E408A.

El canal quimérico IC_{LI-II} se construyó trasladando el asa I-II del canal Cav1.2 al canal Cav3.3, para lo cual se insertaron los sitios de reconocimiento para las enzimas BsiWI y MfeI, justo al inicio y al final del asa I-II en ambos canales sin insertar mutaciones indeseadas o corrigiéndolas en su defecto y cuidando que no se desplazara el marco de lectura. Los sitios de restricción se produjeron mediante mutagénesis dirigida (oligonucleótidos del 7-F al 10-R) en vectores intermedios de tamaño menor a los canales completos, Cav3.3 (ClaI-AvrII)-pBluescript de 5.7 kb y Cav1.2 (ApaI-ApaI)-pBluescript de 5.4 kb. El asa I-II de Cav3.3 se intercambió por su homóloga de Cav1.2, obteniendo así la construcción intermedia IC_{LI-II}-pBluescript a partir de la cual se transfirió el fragmento ClaI-AvrII (que contiene el fragmento quimérico IC_{LI-II}) al plásmido Cav3.3-pcDNA3, para generar el canal quimérico completo Cav3.3-IC_{LI-II}.

Tabla 1. Subunidades silvestres, sus contrapartes mutantes y oligonucleótidos empleados para su construcción

Silvestre / Origen / GeneBank	Mutante	Oligonucleótidos
β 1b / <i>Oryctolagus cuniculus</i> / X61394	β 1b-BFP	1-F GATCGATGGGGATCCGAATTC 1-R AGAGGATCCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
	β 1b-HA	2-F ATCGATAAGCTTGATATCG 2-R GGGGAAGCTTTTCAGGCGTAGTCGGGGACGTCGTAGGGGTAGC GGATGTAGACGCCTTGTC
Ca_v 1.2 / <i>Mus musculus</i> / AY728090	Ca_v 1.2-GFP	1-F GATCGATGGGGATCCGAATTC 3-R AGAGAATTCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC
Ca_v 3.1 / <i>Homo sapiens</i> / AF190860	Ca_v 3.1-GFP	No aplica
	E477A	4-F GAGACCAAGCAGCGGGCCAGCCAGCTGATGCGG 4-R CCGCATCAGCTGACTGGCCCGCTGCTTCGTCTC
Ca_v 3.2 / <i>Homo sapiens</i> / AF051946	Ca_v 3.2-GFP	No aplica
	E429A	5-F GAGACGAAGCAGCGGGCCAGTCAGCTGATGCGG 5-R CCGCATCAGCTGACTGGCCCGCTGCTTCGTCTC
Ca_v 3.3 / <i>Homo sapiens</i> / AF393329	Ca_v 3.3-GFP	No aplica
	E408A	6-F GAGACCAAGCAACGGGCCCACCGGCTGATGCTG 6-R CAGCATCAGCCGGTGGGCCCCTTGCTTGCTCT
	IC _{L-II}	7-F GGTTCCTCGGTGTTTTGACGTACGAGTTTTCCAAAGAGAGGGAG 7-R CTCCTCTCTTTGGAAACTCGTACGTCAAAACACCGAGAACC 8-F GCAGCAGTTAAGTCCAATTGCTTCTACTGGCTCGTG 8-R CACGAGCCAGTAGAAGCAATTGGACTTAACTGCTGC 9-F CTCGTTGTCATAGCGTACGAGTTCTCGGAGACC 9-R GGTCTCCGAGAACTCGTACGCTATGACAACGAG 10-F CATCGTGGACAGCAATTGCTTCAACCGGGGCATC 10-R GATGCCCCGGTTGAAGCAATTGCTGTCCACGATG

F: primer sentido; R: primer antisentido. En el caso de β 1a *Rattus norvegicus* M25817; β 2a *Rattus norvegicus* M80545; β 3 *Rattus norvegicus* M88751; y β 4 *Rattus norvegicus* L02315, ningún primer fue diseñado.

II. PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LOS CANALES LVA.

Se desarrollaron modelos de la estructura secundaria y terciaria de la región proximal del asa I-II de los canales LVA, donde se encuentra el freno de la compuerta (**Fig. 5**). La predicción de la estructura secundaria se realizó empleando el algoritmo SOPMA (Geourjon y Deléage, 1995) disponible en el sitio https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html. La predicción de la estructura tridimensional del freno de la compuerta se desarrolló en el servidor de I-TASSER (Zhang, 2008) disponible en el sitio <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>. Se eligió el modelo atómico con los mejores parámetros estructurales (C-score y TM-score; para una revisión consultar Zhang y Skolnick, 2004) y se desplegó en el visualizador molecular PyMOL (Schrödinger).

III. CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIÓN.

Se empleó como sistema de expresión de los canales Cav y los canales Nav1.6 (NM_019266) a las células HEK-293. Debido a que esta línea celular inmortalizada, proveniente de riñón de embrión humano, no expresa corrientes de calcio endógenas, representa un excelente sistema de expresión heteróloga para estudiar canales de calcio y de sodio de manera aislada. Las células HEK-293 fueron crecidas en monocapa sobre cajas Petri de plástico de 100 mm de diámetro (BD Falcon) a 37°C en una atmósfera saturada de agua y compuesta de 95% de O₂ y 5% de CO₂. La composición del medio de cultivo fue la siguiente: 90% de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Todos los productos químicos para el cultivo y mantenimiento de las células se obtuvieron de GIBCO-Invitrogen. El cultivo celular

fue regenerado una o dos veces por semana, cuando la monocapa de células se encontraba alrededor del 90% de confluencia. Para ello, las células fueron despegadas con una solución que contenía 0.05% de tripsina y 0.53 mM EDTA en una solución balanceada de Hanks libre de calcio, y se disociaron mecánicamente mediante la utilización de pipetas serológicas de 10 ml. Las células fueron sembradas a una densidad aproximadamente 10-20 veces menor en una caja de Petri nueva. Esta misma suspensión celular permitió inocular cajas Petri de 35 mm de diámetro para realizar las múltiples transfecciones transitorias.

Las transfecciones destinadas para el registro electrofisiológico y ColP se realizaron con JetPEI® (Polyplus Transfection) mientras que las transfecciones para microscopia confocal se hicieron con PEI (protocolo descrito más adelante). El día previo a la transfección, se sembraron células HEK-293 en cajas Petri de 35 mm (para las cajas de 100 mm empleadas para ColP solo se escalaron las cantidades de cada reactivo) a una densidad de 0.25 a 1.0×10^6 células con 2 ml de medio DMEM, de tal forma que, al momento de la transfección, la monocapa de células presentará entre 60-70% de confluencia. Previo a la transfección *per se*, se cambió el medio DMEM completo que contenían las cajas de cultivo por 1 ml de DMEM no suplementado. Para cada experimento de transfección se prepararon dos soluciones, una de ellas compuesta por 3 µg de DNA (1.5 µg de la subunidad α_1 y 1.5 µg de la subunidad β) y 0.15 µg del plásmido de la GFP (no requerida para ColP), la cual sirve como marcador de las células que han sido transfectadas. El volumen final de esta solución se llevó a 100 µl con NaCl 150 mM. La segunda solución contenía 5 µl del agente transfectante y 95 µl de NaCl. Ambas soluciones se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Al transcurrir los 30 minutos, se agregó el complejo de transfección a las células. Estas se incubaron a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ durante 12

horas, posteriormente el complejo de transfección fue retirado y se agregaron 2 ml de medio DMEM completo. Las células se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones por 12 horas adicionales.

Las células transfectadas se despegaron a las 24 h después de iniciada la transfección y se sembraron en una caja de Petri de 35 mm que contenía de 6 a 8 cubreobjetos de vidrio cuadrados de 5 x 5 mm. Los registros electrofisiológicos se llevaron a cabo en las células contenidas en estas cajas, después de ser incubadas al menos 2 h. La caja con el resto de las células transfectadas se incubó con 1 ml de medio completo hasta el día siguiente, cuando se repitió el procedimiento anterior. Las células transfectadas de manera transitoria se utilizaron durante 3 días.

IV. REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO.

Para registrar la actividad electrofisiológica de los canales iónicos expresados en las células HEK-293, se utilizó la técnica *patch-clamp* (fijación de voltaje en microáreas de membrana) en la configuración de célula completa (Hamill *et al.*, 1981; Marty y Neher, 1995) a una temperatura de 20 a 23°C. Los registros se obtuvieron con la ayuda de un amplificador de *patch-clamp* Axopatch 200B, que se encontraba conectado directamente a una interfase Digidata 1322 A/D, misma que se encarga de convertir las señales analógicas provenientes de la célula en señales digitales para ser almacenadas en una computadora mediante el empleo del programa pClamp 9.02. Con este último se diseñaron y aplicaron los diferentes protocolos de voltaje que se utilizaron en el registro electrofisiológico. El amplificador, la interfase y el programa de adquisición de datos se obtuvieron de Molecular Devices. Todos los componentes anteriores, así como sus conexiones se muestran en la **Fig. 6**.

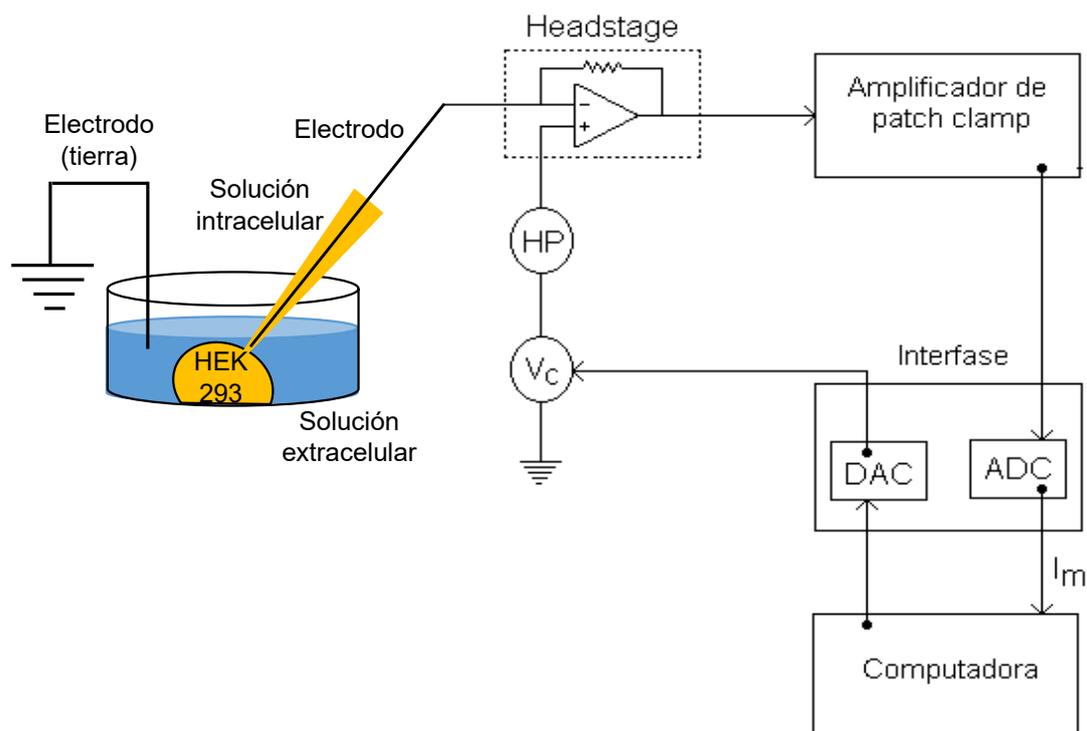


Figura 6. Esquema del registro electrofisiológico utilizado en los experimentos de fijación de voltaje. La corriente de Ca^{2+} se registró con la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa. El transductor (*headstage*) regula el voltaje del electrodo y mide la corriente membranar (I_m). Los pulsos comando (V_c) y el potencial de mantenimiento (HP) se generan en el convertidor digital-analógico (DAC) de la interfase. El amplificador permite reducir las espigas de corriente capacitiva asociadas a la instalación y corte de los pulsos. La señal de corriente inducida por V_c es digitalizada mediante el convertidor analógico-digital (ADC) de la interfase y capturada en el disco duro de la computadora, para su análisis posterior. La I_m se visualizó en el monitor de la computadora para vigilar la formación de un sello de alta resistencia entre la punta del electrodo y la membrana celular, así como para supervisar la cancelación analógica de las espigas capacitivas. Las células bajo estudio se encuentran en una cámara de registro perfundida constantemente por la solución externa de registro impulsada por gravedad. La cámara de registro se encuentra conectada mediante un electrodo de tierra a la entrada no inversora del amplificador operacional del cabezal o *headstage* del amplificador.

Antes de iniciar los registros electrofisiológicos, un cubreobjetos con células fue transferido de la incubadora a la cámara de registro ubicada sobre la platina de un microscopio óptico invertido modelo Eclipse TE300 (Nikon). La solución contenida en la cámara, denominada solución externa de registro (véase Soluciones de Registro

más adelante) fue recambiada constantemente por un sistema de perfusión impulsado por gravedad (**Fig. 6**) y controlado por una válvula de seis vías. El flujo fue de aproximadamente 1.0 ml por min. Las células fueron visualizadas con un objetivo de 40X. Los electrodos o pipetas de registro se fabricaron a partir de capilares de vidrio (TW150-3; WPI Inc.) con la ayuda de un estirador horizontal Modelo P-97 (Sutter Instrument Co.). Posteriormente, las puntas de estos fueron pulidas al calor con una microforja (MF-830, Narishige Co.) y llenados con la solución interna (véase Soluciones de Registro), misma que permitió medir la resistencia eléctrica de los electrodos. Los registros electrofisiológicos se realizaron con electrodos cuya resistencia osciló entre 1.8 y 3.5 M Ω .

La técnica de *patch-clamp* consiste en posicionar un electrodo (de resistencia adecuada) sobre la membrana plasmática de una célula hasta formar un gigasello (resistencia en el orden de $1 \times 10^9 \Omega$) en el área de contacto entre la punta del electrodo y la membrana celular. Acto seguido, se aplica un nivel estacionario de voltaje en la pipeta (HP; en los experimentos reportados en este trabajo dicho valor siempre fue -100 mV salvo excepciones en los que fue -110 y se menciona en el texto posteriormente) y mediante la aplicación de presión negativa, se rompe el sello de membrana incluido en la punta del electrodo para establecer la configuración de célula completa. A consecuencia de la adición de la capacitancia asociada a la membrana plasmática de la célula en estudio, se incrementan los transitorios capacitivos asociados a la instalación y terminación de pulsos de voltaje. Dichos transitorios son cancelados de forma analógica con el amplificador de *patch-clamp*. Una vez realizado este procedimiento en todas las células estudiadas, se procedió a la aplicación de protocolos de voltaje diseñados previamente para registrar las corrientes de calcio. La

forma y uso de cada uno de tales protocolos se describirán conforme se presenten los resultados correspondientes a lo largo del trabajo.

La calidad de los registros electrofisiológicos depende principalmente de dos parámetros: la capacitancia membranal (C_m) y la resistencia en serie (R_s). Esta última se define como la suma de la resistencia de acceso a la célula y la resistencia del electrodo. El producto $C_m R_s$ determina la constante de tiempo (τ) con la que suceden los cambios en el potencial de membrana (V_m) debidos a la aplicación de los pulsos de voltaje en el interior del electrodo. Con base en lo anterior y con el objetivo de garantizar una buena resolución temporal en el registro de las corrientes, en el presente trabajo sólo se utilizaron los datos de los experimentos en los que el producto de $C_m R_s$ no excedió los 60 μ s.

En la mayoría de los registros la resta de la corriente de fuga (corriente que se escapa a través del sello entre la punta del electrodo de registro y la membrana celular) se realizó *off line*, es decir, al momento de analizar los datos en la computadora y para ello se recurrió al algoritmo de resistencia pasiva del programa Clampfit contenido en el paquete de pClamp 9.02. En algunos casos las corrientes fueron registradas en dos canales, uno de ellos con la sustracción de la corriente de fuga *on line*, empleando el método P/-5, y el otro sin alterar la corriente con el objetivo de monitorear la estabilidad de la célula.

Todas las corrientes registradas fueron filtradas a 5 kHz excepto cuando se registraron las colas de corriente, en cuyo caso se usó el filtro de 10 kHz. Esto fue debido a la alta velocidad con la que se lleva a cabo el cierre de los canales LVA, siendo más conveniente que el espectro del filtro sea mayor, pues de este modo se mejora sustancialmente la información de la señal de corriente registrada. Las señales de

corriente fueron digitalizadas a diferentes intervalos de tiempo (10 - 100 μ s) por medio del convertidor analógico-digital de la interfase y finalmente almacenadas en el disco duro de la computadora para su posterior análisis.

Soluciones de registro

Las corrientes de calcio fueron registradas utilizando dos soluciones (cuyas concentraciones son expresadas en mM): solución externa, la cual se compone de: 175 cloruro de tetra-etil-amonio (TEA-Cl), 5 CaCl₂ y 10 HEPES con un pH de 7.4 ajustado con TEA-OH; y solución interna o solución de la pipeta de registro, cuya composición es: 130 CsCl, 10 EGTA, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 4 Mg-ATP, 0.3 Na₃GTP y 10 HEPES con un pH de 7.3 ajustado con CsOH.

Análisis de datos

Los registros electrofisiológicos fueron analizados y graficados utilizando los programas Clampfit del paquete pClamp 9.02 (Molecular Devices) y Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.). El potencial de inversión (voltaje al cual la corriente cambia su dirección de entrante a saliente) de la corriente se obtuvo del ajuste a la relación corriente-voltaje (I - V) con la ecuación de Boltzmann modificada:

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

donde I_{Ca} es la corriente al pico, I_{max} es la corriente máxima observada, V_m es el potencial de membrana, V_{inv} es el potencial de inversión, $V_{1/2}$ es el voltaje al cual se activa el 50% de la corriente máxima y k es la pendiente de la relación.

Para analizar la dependencia al voltaje de la activación de la corriente de calcio se calculó la conductancia de dos formas diferentes. La primera, mediante la ecuación de conductancia que toma en cuenta a la fuerza impulsora, y se representa por la ecuación siguiente:

$$G = I_{Ca} / (V_m - V_{inv}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde G es la conductancia, I_{Ca} es la corriente al pico, V_m es el valor de voltaje con el que se evocó la corriente, y V_{inv} es el potencial de inversión. A esta ecuación se le denominará en adelante conductancia cuerda. Los valores de conductancia fueron normalizados, graficados y ajustados con la ecuación de Boltzmann para obtener las curva conductancia-voltaje (G - V):

$$G = G_{max} / (1 + \exp ((V_{1/2} - V_m) / k)) \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde, nuevamente, G es la conductancia y G_{max} la conductancia máxima, V_m es el potencial de membrana, $V_{1/2}$ es el voltaje al cual el 50% de los canales se encuentran activados y k es la pendiente.

Los datos de inactivación en el estado estacionario de los canales LVA se ajustaron con una función de Boltzmann de la siguiente forma:

$$I_{Ca} = I_{max} / (1 + \exp ((V_m - V_{1/2}) / k)) \quad (\text{Ecuación 4})$$

con las mismas definiciones ya descritas para las ecuaciones anteriores.

Por otro lado, la cinética de las corrientes registradas a los diferentes voltajes fue analizada mediante ajustes con funciones biexponencial, donde la primera exponencial describe la fase de activación y la segunda, la inactivación de la corriente. Por su parte, el cierre de los canales o cinética de desactivación fue analizada con el ajuste de dos funciones exponenciales a las colas de corriente generadas al repolarizar la membrana. Los valores de amplitud y constante de tiempo de cada componente se utilizaron para calcular una constante de tiempo ponderada, la cual refleja adecuadamente la dependencia al voltaje de los componentes rápido y lento de las colas de corriente generadas por los canales tipo T (Gomora *et al.*, 2002). Los

valores de la constante de tiempo (τ) ponderada así obtenidos se compararon entre las diferentes condiciones experimentales. Los datos correspondientes a la recuperación de la inactivación se ajustaron con una función exponencial, a partir de la cual se obtuvo la constante de tiempo que describe el curso temporal con el que los canales de calcio abandonan el estado inactivado (τ_h).

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

V. INMUNOPRECIPITACIÓN.

Para estudiar la posible interacción física entre los canales LVA y la subunidad $\beta 1b$ se utilizó a las subunidades α_1 fusionadas a la GFP y la subunidad auxiliar etiquetada con HA en experimentos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) y *western blot*.

Ambas subunidades fueron expresadas por separado en células HEK-293, mediante transfecciones transitorias en cajas de 100 mm. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se extrajeron las proteínas totales empleando el *buffer* RIPA 7.6 pH (Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, IGEPAL CA-630 1%, desoxicolato de sodio 1% y SDS 1%) suplementado con el inhibidor de proteasas cOmplete (Roche). Al final de la extracción la muestra se sometió a digestión con DNaseI (NEB) y sonicación con la finalidad de romper las moléculas de DNA y con ello tener un mejor manejo de la misma. La proteína se cuantificó por el método de Bradford (Biorad). A partir de las muestras de proteína total se mezclaron 1 mg de la subunidad α_1 (Ca_v1.2-GFP o

Ca_v3.3-GFP), 1 mg de β1bHA con 50 µl de la matriz de afinidad anti-HA (Roche); la mezcla se sometió a agitación ligera a 4°C toda la noche para promover la interacción. Al día siguiente las proteínas se eluyeron de la matriz anti-HA mediante centrifugación, lavado astringente por tres ocasiones con *buffer* RIPA para desechar las interacciones inespecíficas y evitar así falsos positivos, así como la adición de 50µl de amortiguador Laemmli (SDS 6%, glicerol 15%, azul de bromofenol 0.3%, Tris pH 7.6 150 mM y beta-mercaptoetanol 4%) y, por último, desnaturalización a 95°C por 3 minutos para separar β1bHA de la matriz anti-HA, junto con las proteínas que interactúen físicamente con la subunidad auxiliar (Co-IP). Posterior a la elución se cargaron las muestras en geles de acrilamida al 7.5% (con gel concentrador al 4%) y se corrió la electroforesis hasta la separación clara de las proteínas (aproximadamente 1.5 h a 100 V). En los experimentos control se cargaron 15 µg de proteína total de los lisados celulares, así como 10 µl (de un total de 500 µl) de los sobrenadantes de los lavados de la Co-IP.

Las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF, Thermo Fisher) empleando una cámara de transferencia semi-seca (Trans-Blot®, Bio-Rad) durante 1.5 h a 20 V de potencia, posteriormente se analizaron dichas membranas mediante Western Blot previo tratamiento con leche sin grasa en polvo como agente bloqueante (Blotting-Grade Blocker, Bio-Rad) al 5% durante 1 hora, empleando los anticuerpos y concentraciones mostradas en la **Tabla 2**. El anticuerpo primario se incubó con agitación ligera a 4°C durante toda la noche a diferencia del anticuerpo secundario que fue incubado a temperatura ambiente durante 1 hora. El revelado de los inmunoblots se hizo con el kit de quimioluminiscencia de Thermo Scientific y los filmes se expusieron de 15 segundos a 2 minutos.

Tabla 2. Anticuerpos empleados en los ensayos de Western Blot.

Anticuerpo	Proteína que reconoce	Marca (No.Cat.)	Dilución	Tipo	Origen / blanco
anti-HA	β 1b-HA	Roche (11867431001)	1:5000	Primario	Cabra / Rata
anti-GFP	Cav1.2-GFP y Cav3.3-GFP	Santa Cruz Biotechnology (8334)	1:5000	Primario	Cabra / Conejo
anti- β actina	β actina (control de carga)	Dr. Manuel Hernández (CINVESTAV)	1:5000	Primario	Conejo / Humano
IgG-HRP	IgG	Santa Cruz Biotechnology (2030 y 2006)	1:10000	Secundario	Cabra / Rata Cabra/ Conejo

VI. MICROSCOPIA CONFOCAL.

En los experimentos de microscopia confocal se utilizaron los canales HVA y LVA fusionados a la GFP (**Tabla 1**), los cuales fueron expresados solos o en presencia de la subunidad β 1b-BFP. La transfección de las células HEK-293 se realizó en placas de 12 pozos con el agente transfectante PEI (Santa Cruz Biotechnology), empleando 1.25 μ g de DNA de cada una de las subunidades y 7.5 μ l del agente transfectante. Después de 48 h de iniciada la transfección, las células fueron sembradas en cubreobjetos de 25 mm de diámetro e incubadas por 12 h más antes de ser observadas bajo el microscopio confocal (Olympus Fv10i) equipado con un objetivo de inmersión 60 \times /1.35 UPLSAPO. Las longitudes de onda utilizadas fueron las siguientes: excitación, 405 nm para β 1b-BFP, 489 nm para los canales fusionados a la GFP y 559 nm para el marcador de membrana plasmática FM464 (Invitrogen). La adquisición de las imágenes se realizó en una ventana de 512 x 512 pixeles cada 9 s para cada fluoróforo. La colocalización de los fluoróforos al igual que el coeficiente de correlación de Pearson se calculó con el software Imaris 8.2 (Bitplane).

La transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) entre las subunidades α_1 fusionadas a la GFP y $\beta 1b$ -BFP se analizó con el software ImageJ (NIH) con el *plugin FRET analyzer*. Se utilizó el protocolo *sensitized emission* (SE) midiendo la emisión del aceptor como resultado de la excitación del donador. Para evitar la sobreestimación del FRET se evaluó el *bleed-trough* entre los dos canales de fluorescencia para el donador y aceptor. Después de restar el *bleed-trough* de la emisión del donador se calculó el FRET con la siguiente ecuación: $nF = F^{ex_D,em_A} - \alpha F^{ex_A,em_A} - \beta F^{ex_D,em_D}$. Usando una longitud de onda de excitación que estimula solo al donador, se obtuvo la emisión para los canales del aceptor (F^{ex_D,em_A}) y donador (F^{ex_D,em_D}). Posteriormente se midió la fluorescencia en el canal aceptor (F^{ex_A,em_A}) a una longitud de onda que solo excita al aceptor. La cantidad de *bleed-trough* del donante hacia el aceptor fue determinada por las mediciones exclusivas del donante, que proporciona la constante de calibración $\beta = F_D^{ex_D,em_A} / F_D^{ex_D,em_D}$. Midiendo solo el canal correspondiente al aceptor se obtuvo la constante $\alpha = F_A^{ex_D,em_A} / F_A^{ex_A,em_A}$. Para el procedimiento de calibración completo se recomienda revisar Zeug *et al.*, 2012.

RESULTADOS

LA DENSIDAD DE CORRIENTE DE LOS CANALES LVA AUMENTA DEBIDO A LA PRESENCIA DE LA SUBUNIDAD $\beta 1B$.

El primer objetivo del presente trabajo de tesis consistió en investigar si la corriente de los canales $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$ se modifica cuando son co-expresados con cada una de las diferentes subunidades β de los canales HVA ($\beta 1a$, $\beta 1b$, $\beta 2a$, $\beta 3$ y $\beta 4$) en células HEK-293. Las posibles modificaciones en las corrientes de calcio de los canales LVA se estudiaron mediante el empleo de la técnica de *patch-clamp* en la configuración de célula completa. La **Fig. 7A-C** muestra corrientes de calcio representativas registradas a -30 mV, de cada uno de los canales LVA expresados solos (trazos en color azul) y en presencia de la subunidad $\beta 1b$ (trazos en color rojo). En todos los casos las corrientes fueron de mayor amplitud cuando $\beta 1b$ se co-transfectó con la subunidad α_1 . El aumento en la amplitud de la corriente se observó en todo el rango de voltajes que generan corrientes entrantes sin ningún cambio significativo en la dependencia al voltaje de activación, como se puede observar en las curvas *I-V* mostradas en la **Fig. 7D-F**. Aunque todas las subunidades β incrementaron la densidad de corriente de al menos uno de los canales LVA, solo la subunidad $\beta 1b$ fue capaz de inducir aumentos consistentes en los tres canales LVA, sin embargo, solo en $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ las diferencias fueron significativas (**Fig. 8A-C**). En promedio, $\beta 1b$ provocó incrementos de 63 ± 18 , 57 ± 28 y 81 ± 16 % en la densidad de corriente de células HEK-293 transfectadas con $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$ respectivamente. Excepto por un discreto, pero significativo cambio de 4 mV hacia voltajes más negativos en el V_{50} de la dependencia al voltaje de activación de las corrientes de $Ca_v3.3$ (**Tabla 3**), no hubo otro cambio en la activación o inactivación

dependiente de voltaje de los canales LVA, así como tampoco en la cinética de activación, inactivación o recuperación de la inactivación, debido a la presencia de la subunidad $\beta 1b$ (Figs. 9-11).

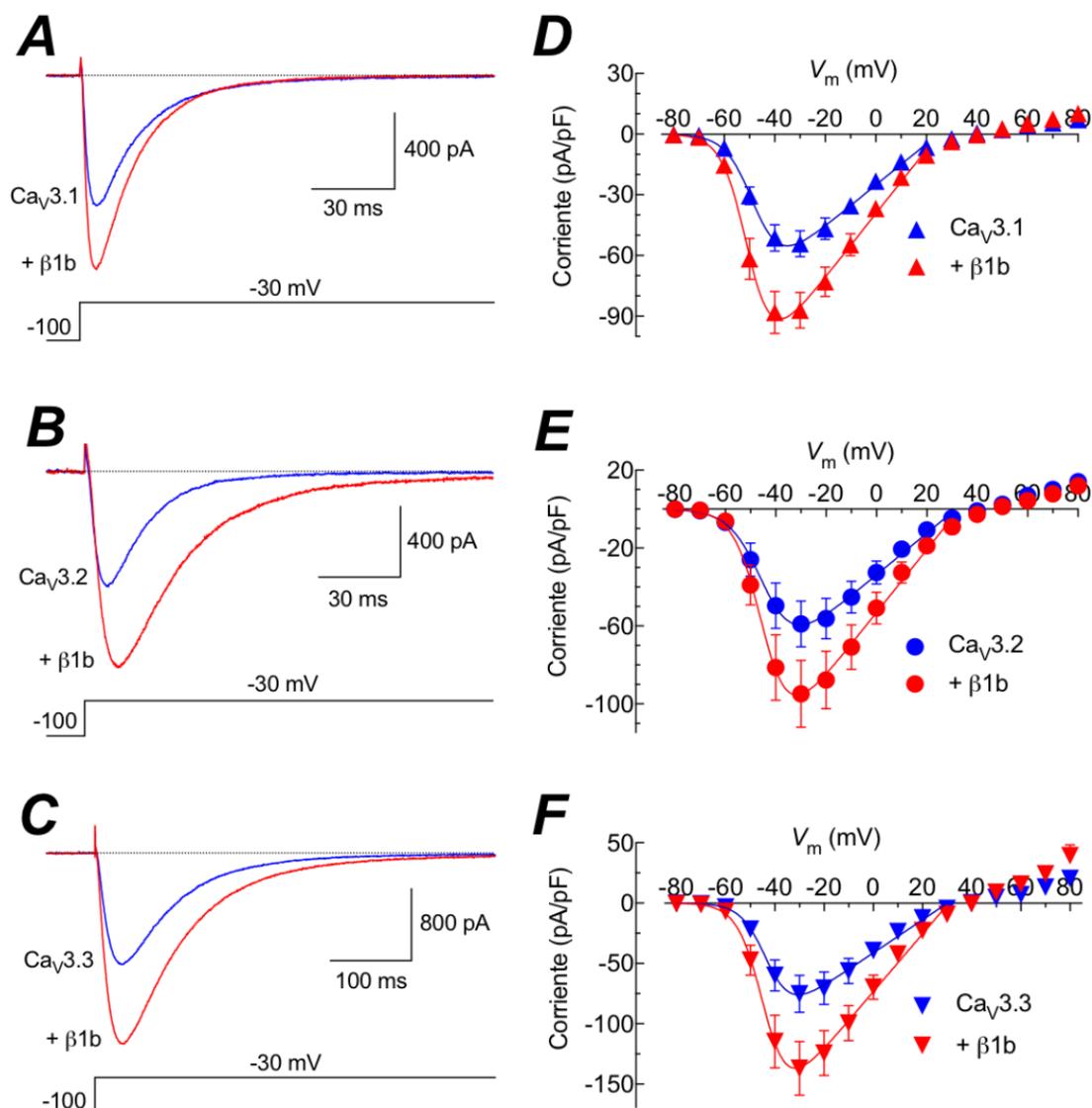


Figura 7. Relación corriente-voltaje de los canales LVA. A-C) Trazos de corriente de calcio representativos registrados a -30 mV en células HEK-293 transfectadas con los canales LVA ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$) solos y en presencia de la subunidad $\beta 1b$. Los experimentos de *patch-clamp* en configuración de célula completa se realizaron con un potencial de mantenimiento de -100 mV y 5 mM de Ca^{2+} como acarreador de carga. **D-F)** Curvas corriente-voltaje (*I-V*) para los tres canales LVA. Se muestran los datos promedio (\pm error estándar) de las corrientes al pico registradas a los voltajes indicados a partir de un HP de -100 mV. La amplitud de la corriente fue normalizada con la capacitancia membranal para obtener la densidad de corriente. Los datos experimentales fueron ajustados con una función de Boltzmann modificada (líneas continuas; ver Métodos). El número de células analizadas varió de 8 a 29. Los parámetros de tales ajustes se presentan en la **Tabla 3**.

Como control positivo se co-transfectó al canal HVA $Ca_v1.2$ con $\beta1b$; y de acuerdo a lo esperado (Yasuda *et al.*, 2004), esta subunidad auxiliar aumentó la densidad de corriente del canal HVA cerca de 400% (**Fig. 12A y B**). Por el contrario, la co-expresión de $\beta1b$ con el canal de sodio $Na_v1.6$ no indujo cambios significativos en las propiedades de la corriente de sodio (control negativo; **Fig. 12C y D**).

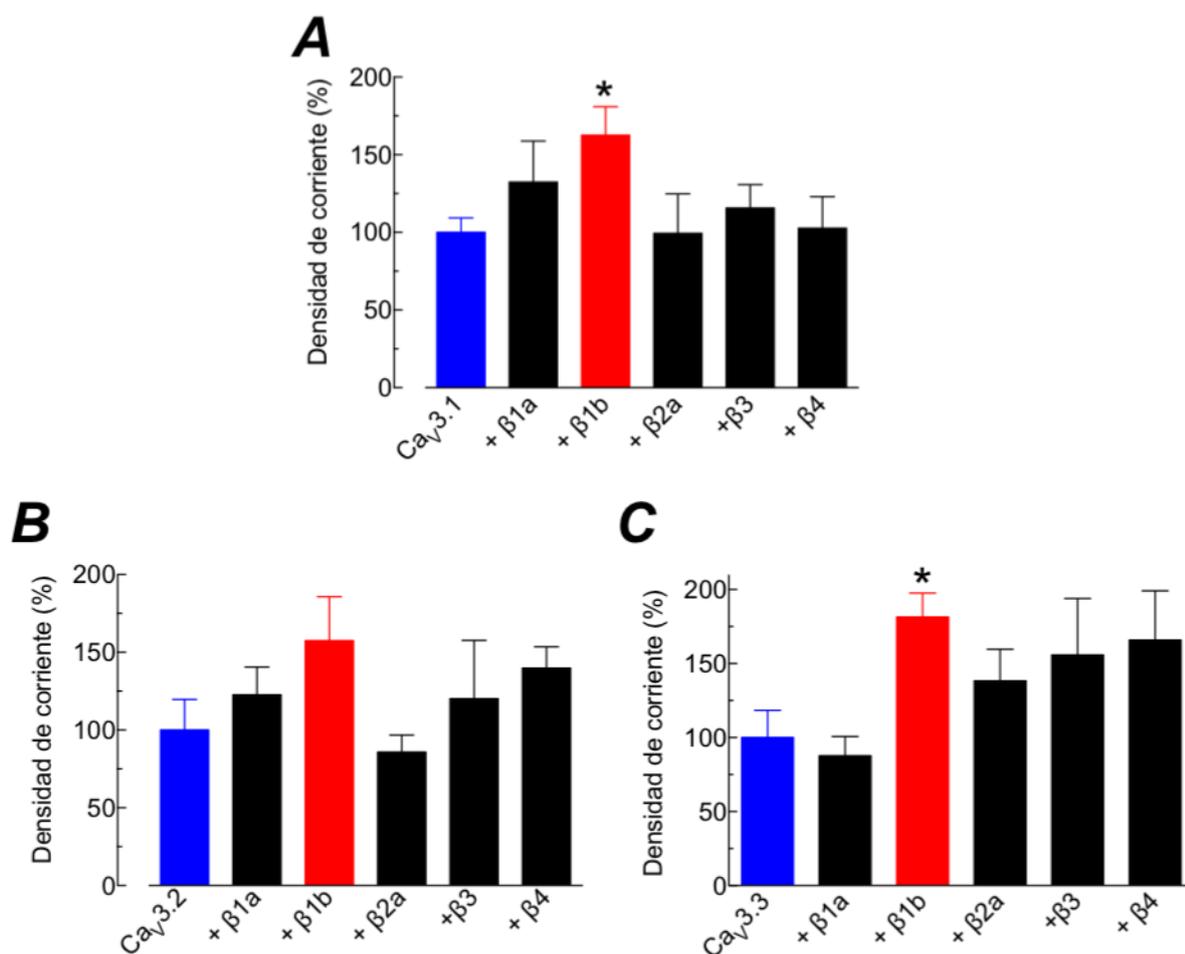


Figura 8. La subunidad $\beta1b$ incrementa la densidad de corriente de los canales LVA. A-C)

Densidad de corriente (promedio \pm error estándar) obtenida a -30 mV en células HEK-293 transfectadas con el canal LVA señalado en cada panel, solo y en presencia de las subunidades $\beta1a$, $\beta1b$, $\beta2a$, $\beta3$ y $\beta4$. Únicamente $\beta1b$ incrementa la densidad de corriente de manera significativa de los 3 canales LVA. Los datos fueron normalizados con la densidad de corriente obtenida con los canales expresados sin la subunidad auxiliar. *Significancia estadística usando una ANOVA seguida de una prueba de Dunnett ($P < 0.05$). El número de células analizadas varió de 5 a 29.

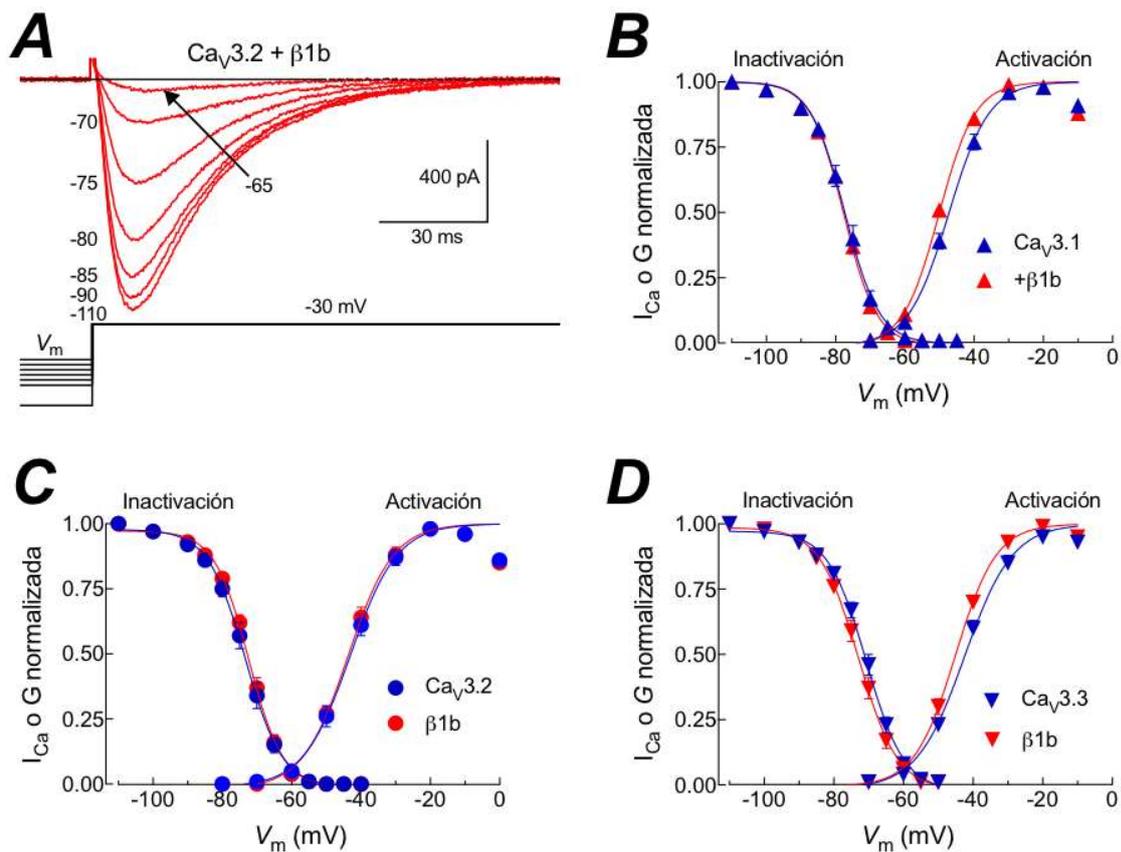


Figura 9. La dependencia al voltaje de la activación e inactivación de los canales LVA no es modificada por $\beta 1b$. **A)** Familia de corrientes de calcio obtenida de una célula HEK-293 co-transfectada con el canal $Ca_v3.2$ y la subunidad $\beta 1b$. Las corrientes se evocaron en respuesta a despolarizaciones de 200 ms a -30 mV, después de la aplicación de prepulsos inactivantes de 10 s a los valores de V_m indicados. Para mayor claridad sólo se muestran los últimos 20 ms de los prepulsos y los primeros 130 ms del pulso de prueba a -30 mV, como se indica en el protocolo. **B-D)** Curvas de inactivación en estado estacionario, así como la relación conductancia - voltaje para los tres canales LVA solos y en presencia de la subunidad auxiliar $\beta 1b$. Los datos correspondientes a la inactivación son el promedio de la amplitud de la corriente de calcio a -30 mV normalizada respecto al valor de corriente máxima y graficada en función del valor de V_m del prepulso. Las líneas continuas son el ajuste con la función de Boltzmann (Ecuación 4, ver Métodos). Los valores de conductancia cuerda se obtuvieron con la ecuación 2 (ver Métodos) a partir de los mismos datos que en la **Fig. 7**; estos se normalizaron, promediaron y graficaron en función del voltaje respectivo. Las líneas continuas son los ajustes con la ecuación de Boltzmann (Ecuación 3) cuyos parámetros se presentan en la **Tabla 3**. El número de células estudiadas varió de 8 a 29.

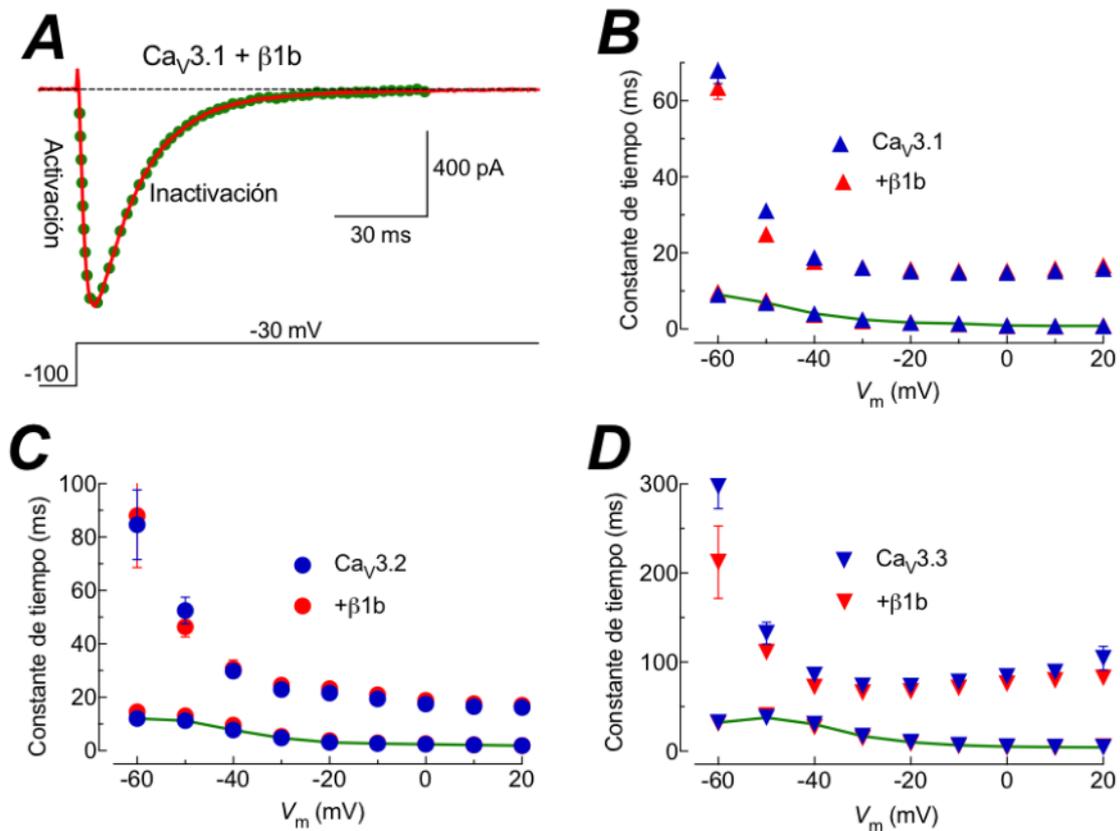


Figura 10. La cinética de activación e inactivación de los canales LVA no es afectada por la subunidad auxiliar $\beta1b$. **A)** Trazo de corriente de calcio registrada a -30 mV en una célula HEK-293 transfectada con el canal $Ca_v3.1$. La línea gruesa discontinua indica el ajuste del registro de corriente con una función exponencial de dos componentes que describe la fase de activación y de inactivación. **B-D)** Constantes de tiempo de activación (parte inferior) e inactivación (parte superior) para cada uno de los canales LVA indicados. Las constantes de tiempo se obtuvieron de los ajustes como se muestra en **A**, a los voltajes indicados en el eje de las abscisas. Los datos son el promedio \pm error estándar. El número de células analizadas varió de 8 a 29. Los valores respectivos a -30 mV se muestran en la **Tabla 3**.

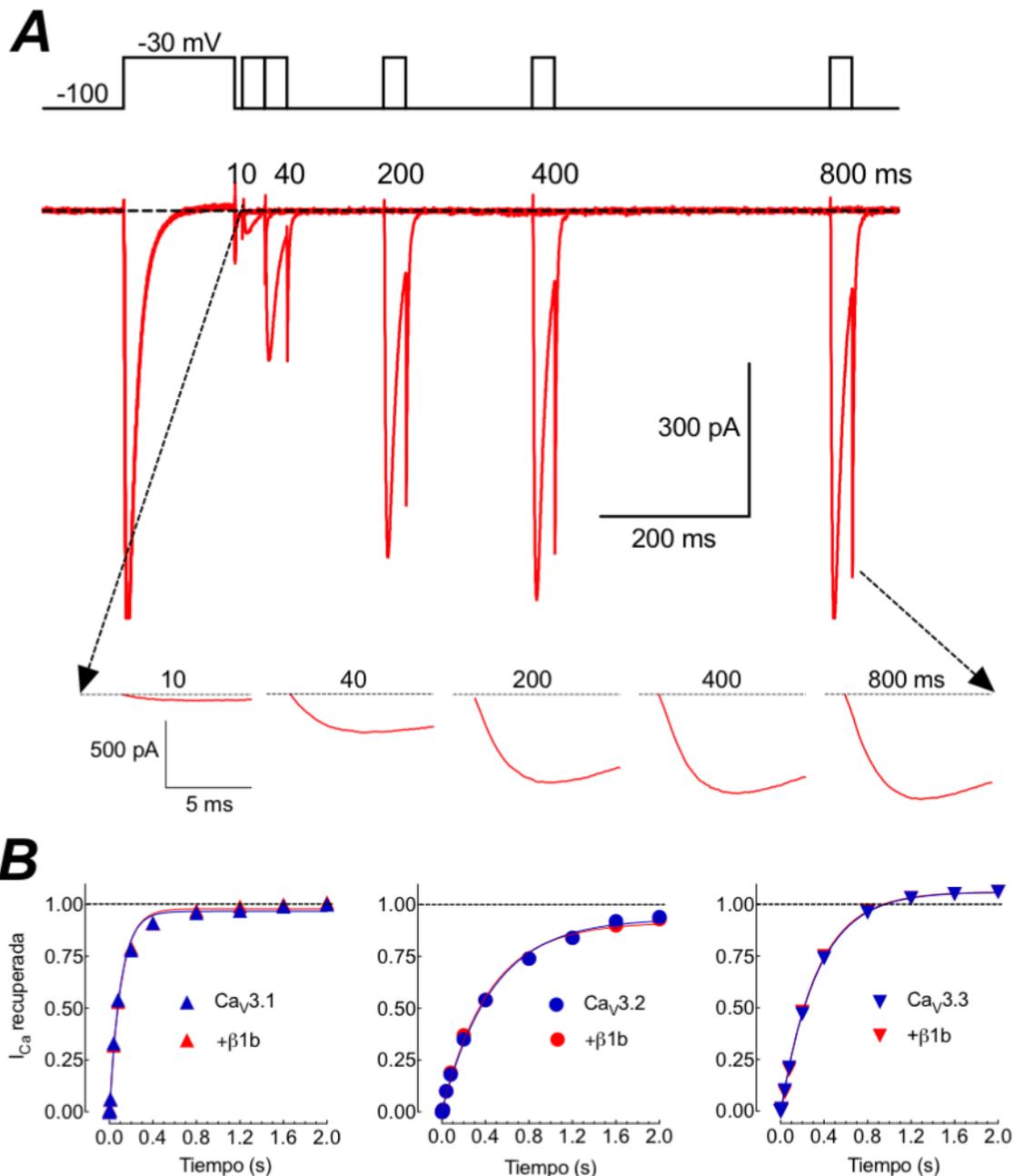


Figura 11. La recuperación de la inactivación de los canales LVA no se modifica por la presencia de $\beta1b$. **A)** Trazos representativos de corrientes de calcio registradas en células HEK-293 que expresan al canal $Ca_v3.1$ junto con $\beta1b$. Las corrientes se generaron en respuesta al protocolo mostrado en la parte de arriba de los trazos (para más detalles véase el texto). En el extremo inferior se presenta la magnificación de las corrientes registradas durante el pulso de prueba a los tiempos indicados. **B-D)** Curso temporal de la recuperación de la inactivación para los canales $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$ solos y en presencia de la subunidad auxiliar $\beta1b$, respectivamente. Los datos son el promedio del porcentaje de la I_{Ca} recuperada a diferentes intervalos de tiempo. Las líneas continuas son el ajuste de los datos con una función exponencial. El número de células analizadas varió de 9 a 23. El valor de la tau de recuperación para cada canal se muestra en la **Tabla 3**.

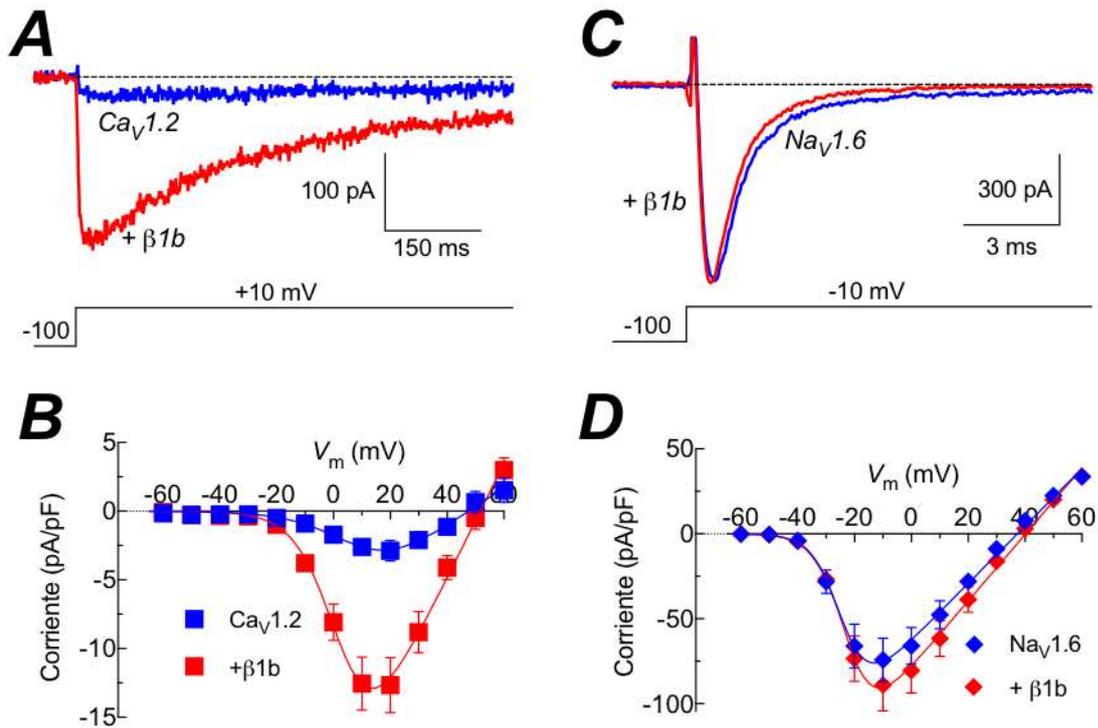


Figura 12. El efecto modulador de la subunidad $\beta 1b$ es específico para los canales de calcio activados por voltaje. **A)** Registros representativos obtenidos a +10 mV en células HEK-293 transfectadas con el canal $Ca_v1.2$ solo y en presencia de $\beta 1b$. En este caso el acarreador de corriente fue 10 mM de Ba^{2+} . **B)** Relación $I-V$ para la densidad de corriente del canal HVA $Ca_v1.2$ solo y en presencia de $\beta 1b$. Nótese que el incremento de la densidad de corriente provocado por la subunidad auxiliar es mas que evidente. **C)** Corrientes representativas registradas a +10 mV en células HEK-293 transfectadas con el canal $Na_v1.6$ solo y en presencia de $\beta 1b$. El acarreador de corriente fue 158 mM de Na^+ . **D)** Curva $I-V$ del canal $Na_v1.6$ expresado solo y con la subunidad auxiliar señalada. Nótese que no hay un cambio evidente en la densidad de corriente del canal provocado por la subunidad auxiliar. Los experimentos de *patch-clamp* se realizaron con un potencial de mantenimiento de -100 mV, ambas curvas $I-V$ fueron ajustadas con una función de Boltzmann modificada. El número de células empleadas en el análisis varió de 13 a 16.

Tabla 3. Propiedades electrofisiológicas de los canales LVA en ausencia y presencia de las subunidades β de los canales HVA.

Canal	I_{Ca} (pA/pF)	Activación V_{50} (mV)	Inactivación V_{50} (mV)	τ act (ms)	τ inact (ms)	τ_h (ms)
$Cav3.1 + \beta1a$	-72 ± 14	-48 ± 0.6	-76 ± 0.6	3.4 ± 0.3	19.6 ± 1.0	131 ± 9
$Cav3.1 + \beta1b$	$-87 \pm 9^*$	-51 ± 0.4	-77 ± 0.5	2.1 ± 0.1	16.2 ± 0.5	108 ± 4
$Cav3.1 + \beta2a$	-55 ± 14	-48 ± 1.2	-78 ± 0.8	2.9 ± 0.3	21.8 ± 0.9	140 ± 5
$Cav3.1 + \beta3$	-64 ± 8	46 ± 1.2	-76 ± 1.5	3.4 ± 0.3	20.5 ± 1.1	129 ± 6
$Cav3.1 + \beta4$	-56 ± 11	-49 ± 1	-78 ± 1.2	3.1 ± 0.2	19.5 ± 1.1	142 ± 8
$Cav3.2 + \beta1a$	-81 ± 12	-49 ± 1.0	-77 ± 0.9	4.3 ± 0.1	24.4 ± 2.1	449 ± 35
$Cav3.2 + \beta1b$	95 ± 17	-44 ± 1.0	-73 ± 0.7	5.4 ± 0.4	24.5 ± 2.3	495 ± 19
$Cav3.2 + \beta2a$	-49 ± 6	-41 ± 1.8	-71 ± 1.6	5.8 ± 0.8	24.8 ± 2.7	445 ± 102
$Cav3.2 + \beta3$	-58 ± 18	-40 ± 0.8	-69 ± 1.1	4.4 ± 0.4	20.6 ± 2.8	391 ± 21
$Cav3.2 + \beta4$	-66 ± 7	-41 ± 1.4	-70 ± 1.1	5.2 ± 0.8	22.6 ± 2.3	403 ± 15
$Cav3.3 + \beta1a$	91 ± 13	-44 ± 1.0	-72 ± 2.5	$19.5 \pm$	75.4 ± 5.8	367 ± 34
$Cav3.3 + \beta1b$	$-129 \pm 11^*$	$-46 \pm 0.7^*$	-73 ± 0.8	$14.6 \pm$	65.9 ± 3.2	345 ± 9
$Cav3.3 + \beta2a$	-73 ± 12	-41 ± 0.9	-74 ± 0.4	$17.9 \pm$	53.6 ± 8.1	301 ± 26
$Cav3.3 + \beta3$	-136 ± 38	-43 ± 1.8	-70 ± 1.0	$18.2 \pm$	73.9 ± 5.0	343 ± 29
$Cav3.3 + \beta4$	-112 ± 22	-44 ± 1.6	-71 ± 0.9	$20.9 \pm$	87.7 ± 5.2	334 ± 17

Los valores se presentan como la media \pm EEM. Densidad de corriente (pA/pF) a -30 mV. Los parámetros de V_{50} de activación e inactivación se obtuvieron a partir de ajustes con la función de Boltzmann a las curvas de conductancia-voltaje, así como la de inactivación en estado estacionario, respectivamente. La τ de activación e inactivación se obtuvieron a partir de ajustes con dos funciones exponenciales de los trazos de corriente generados a -30 mV. La τ_h se calculó a partir de un ajuste con una función exponencial de los datos de recuperación de la inactivación a -100 mV. El número de células analizadas varió de 5 a 29. Los asteriscos denotan significancia estadística (Prueba t de Student; $P < 0.05$) entre los canales LVA solos y en presencia de las diferentes subunidades auxiliares mostradas. En negritas se resaltan los valores que presentaron diferencias significativas respecto al canal en ausencia de subunidades β .

Los resultados presentados hasta aquí demuestran que al co-transfectar los canales LVA con la subunidad β 1b se incrementa la densidad de corriente de manera específica y significativa sin afectar sus propiedades biofísicas. Estudios previos han

mostrado efectos similares, aunque los datos electrofisiológicos de Cav3.3 presentados en este trabajo son los primeros en evidenciar de manera clara el efecto de las subunidades β .

LA CO-EXPRESIÓN CON LA SUBUNIDAD β 1B AUMENTA LA EXPRESIÓN DE LOS CANALES LVA EN LA MEMBRANA CELULAR.

Para investigar si los incrementos en la densidad de corriente de los canales LVA co-expresados con la subunidad β 1b son el resultado de una mayor expresión de los canales en la membrana plasmática de las células HEK-293, se evaluó la localización celular de los canales LVA por microscopía confocal en presencia o ausencia de la subunidad β 1b. Para este propósito se usaron los canales Cav1.2 y Cav3 etiquetados con GFP y la subunidad β 1b fusionada con BFP (β 1b-BFP). Como marcador de la membrana celular se utilizó el indicador fluorescente FM4-64. Las transfecciones transitorias de los canales Cav1.2 y de los 3 canales LVA (Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3) en las células HEK-293 mostraron una señal mayormente restringida a la membrana celular y algunas membranas intracelulares (**Fig. 13**, líneas - β 1b). Interesantemente, cuando las subunidades α_1 de Cav1.2, Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3 se co-transfectaron con β 1b-BFP la colocalización de estos canales con el marcador de la membrana celular se incremento drásticamente (**Fig. 13**, columnas Merge y Colocalización). En promedio el coeficiente de Pearson de colocalización entre los canales estudiados y la membrana celular, se incrementó más de seis veces en presencia de la subunidad β 1b. Estos resultados sugieren que β 1b promueve el tráfico hacia la membrana celular tanto del canal HVA (Cav1.2) como de los tres canales LVA lo cual es consistente con los resultados electrofisiológicos mostrados en las **Figs. 7 y 8**.

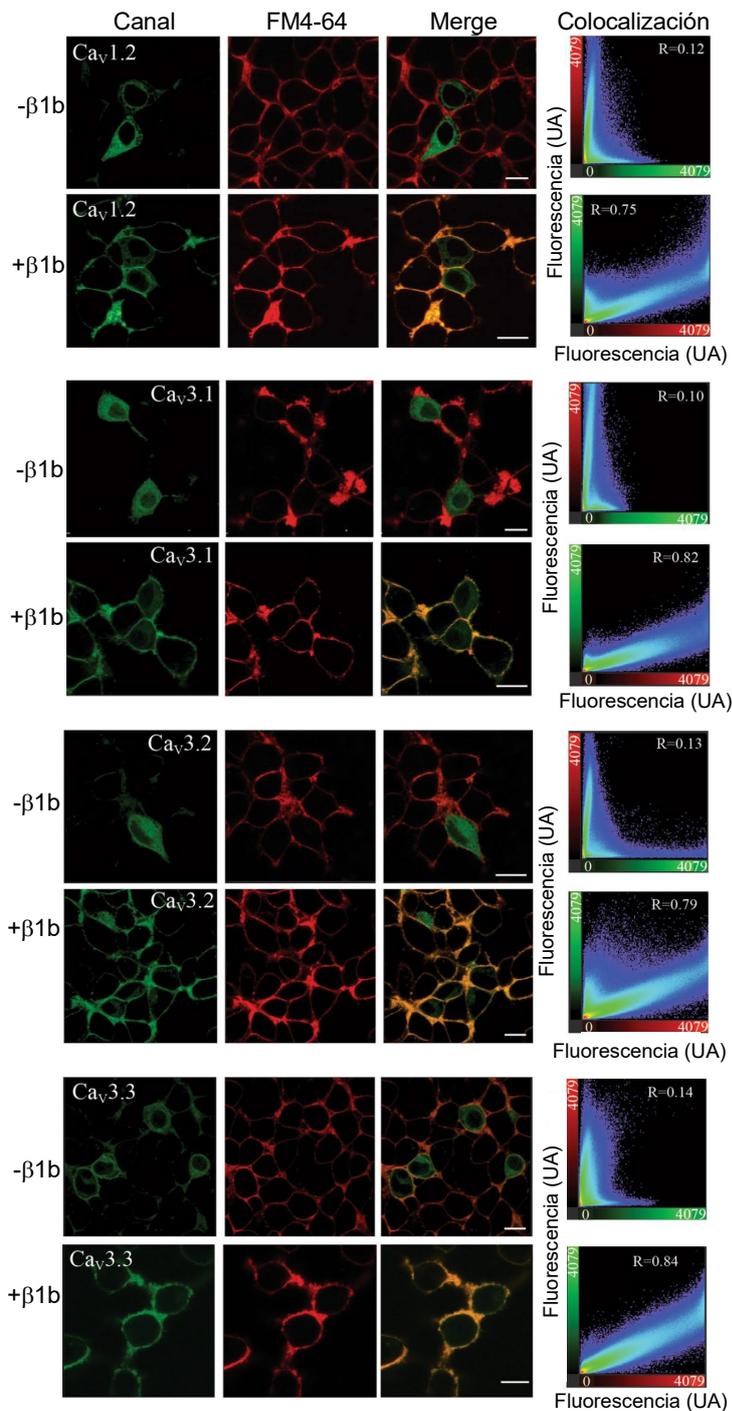


Figura 13. La subunidad β 1b incrementa la cantidad de canales de calcio activados por voltaje en la membrana celular. Análisis de colocalización en células HEK-293 que expresan la subunidad α_1 de los canales Ca_v1.2, Ca_v3.1, Ca_v3.2 y Ca_v3.3 fusionados a la GFP en ausencia (líneas - β 1b) y presencia (líneas + β 1b) de la subunidad β 1b. Los paneles de la izquierda muestran imágenes representativas de microscopía confocal de células HEK-293 que expresan el canal indicado (señal verde; columna Canal) y teñidas con el marcador de membrana celular FM4-64 (señal roja; columna FM4-64). La colocalización entre la subunidad α_1 de los canales Ca_v y el FM4-64 se muestra en amarillo en la columna Merge. La barra de escala en todos los paneles corresponde a 10 μ m. Los paneles de la columna de la extrema derecha (Colocalización) muestran los píxeles totales que colocalizan de la señal verde (α_1) con la de la señal roja (FM4-64). En la esquina superior derecha de cada panel se presenta el coeficiente de correlación de Pearson (R) para cada condición.

Posteriormente, para evaluar si los incrementos en la expresión de los canales LVA en la membrana plasmática obedecen a una interacción física directa con la subunidad $\beta 1b$ se realizaron mediciones de FRET entre las subunidades α_1 de cada uno de los canales Ca_v3 y la subunidad $\beta 1b$, utilizando el protocolo *sensitized emission* (Zeug *et al.*, 2012). Como ya ha sido reportado anteriormente (Altier *et al.*, 2011; Waithe *et al.*, 2011) la subunidad $\beta 1b$ mostró una amplia distribución a través del citoplasma y núcleo (**Fig. 14**, columna de la izquierda, pixeles azules). Nuevamente, la subunidad α_1 de los canales Ca_v se observó distribuida ampliamente en la membrana plasmática de las células HEK-293 (pixeles verdes). En cuanto a la señal de FRET, esta se manifestó de manera evidente cuando los canales $Ca_v1.2$ se co-expresaron con la subunidad $\beta 1b$; la señal se detectó principalmente en la membrana celular de las células HEK-293 (**Fig. 14**, panel superior derecho). De manera más interesante, no se observó señal de FRET significativa para ninguno de los canales LVA con la subunidad $\beta 1b$; solamente en el caso del canal $Ca_v3.3$ se observó una débil señal de FRET (**Fig. 14**, panel inferior derecho).

Los análisis de FRET confirman que la subunidad α_1 del canal $Ca_v1.2$ y la subunidad $\beta 1b$ se encuentran dentro de un rango de distancia entre 10 y 100 nm, mientras que los canales LVA, con la probable excepción de $Ca_v3.3$, se encontrarían a una distancia mayor a los 100 nm de la subunidad $\beta 1b$, sugiriendo que dichas subunidades no interaccionan físicamente.

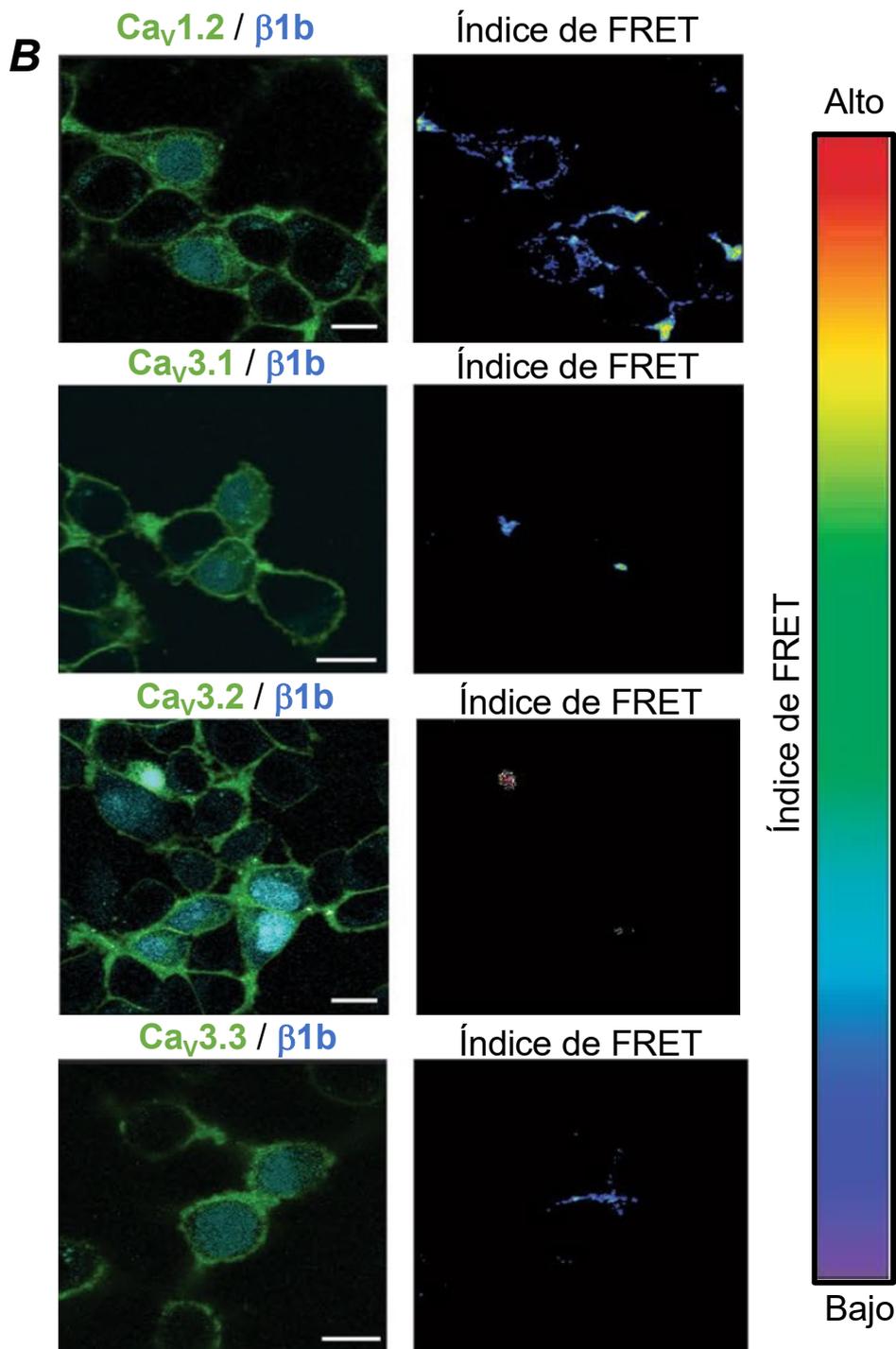


Figura 14. Análisis de FRET entre las subunidades α_1 de los canales Ca_v y la subunidad $\beta 1b$ de los canales HVA. En la columna de la izquierda se muestran la fluorescencia de la subunidad α_1 de los canales Ca_v (GFP) y la subunidad $\beta 1b$ (BFP) de células HEK-293 co-transfectadas como se indica en cada panel. El FRET entre la GFP en cada canal de calcio señalado y la BFP en la subunidad $\beta 1b$ se muestra en la columna de la derecha. Nótese que FRET solo se observa entre el canal HVA Ca_v1.2 y $\beta 1b$, pero no se observa con ninguno de los canales LVA, con la excepción de algunos pixeles de FRET en el panel del canal Ca_v3.3. El FRET bajo y alto fue calculado pixel por pixel, y en la barra de la derecha se muestra la intensidad del FRET en pseudo color. El número de células analizadas para la colocalización y el FRET varió de 32 a 65, provenientes de 4 a 13 experimentos independientes. La escala en todos los paneles corresponde a 10 μ m.

EL CANAL Ca_v3.3 NO INTERACTÚA FÍSICAMENTE CON LA SUBUNIDAD β1B.

Con el propósito de estudiar con mas detalle, la posible interacción física entre el canal Ca_v3.3 y la subunidad β1b sugerida por los resultados de FRET (**Figs. 13 y 14**), se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) y *western blot*. En extractos de proteína total de células HEK-293 transfectadas con β 1b-HA y de inmunoprecipitaciones de estos mismos extractos con una matriz de afinidad con anti-HA se detectó una banda bien definida e intensa de alrededor de 75 kDa (**Fig. 15**, panel de en medio), misma que estuvo totalmente ausente en extractos de células transfectadas con los canales Ca_v1.2 o Ca_v3.3 (**Fig. 15**, carriles 5 y 6 del panel de en medio), demostrando que la especificidad del anticuerpo contra HA permite identificar únicamente la subunidad β1b. Por otro lado, cuando las células HEK-293 fueron transfectadas con los canales Ca_v1.2-GFP o Ca_v3.3-GFP y sus extractos de proteína total correspondientes fueron retados con el anticuerpo contra GFP se observó una banda cercana a los 250 kDa (**Fig. 15**, carriles 5 y 6, panel superior), indicando la presencia de las subunidades α₁ de dichos canales. Adicionalmente, el complejo proteico Ca_v1.2-GFP/ β 1b-HA fue co-inmunoprecipitado con la matriz de afinidad anti-HA, en el que la presencia del canal Ca_v1.2-GFP fue detectado como una banda de 250 kDa usando el anticuerpo anti-GFP (**Fig. 15**, carril 1, panel superior). Por el contrario, el mismo procedimiento no evidenció precipitación alguna cuando el canal Ca_v3.3-GFP se empleó en lugar del canal HVA (**Fig. 15**, carril 2, panel superior). Los sobrenadantes obtenidos de las muestras de co-inmunoprecipitación utilizadas en los carriles 1 y 2 muestran cantidades considerables de los canales Ca_v1.2 (carril 7) y Ca_v3.3 (carril 8) indicando que la falta de señal en el carril 2 se debe a la ausencia de una interacción física suficientemente fuerte entre el canal Ca_v3.3 y β 1b, y no definitivamente a la escasez de proteína en la muestra. De manera interesante cuando

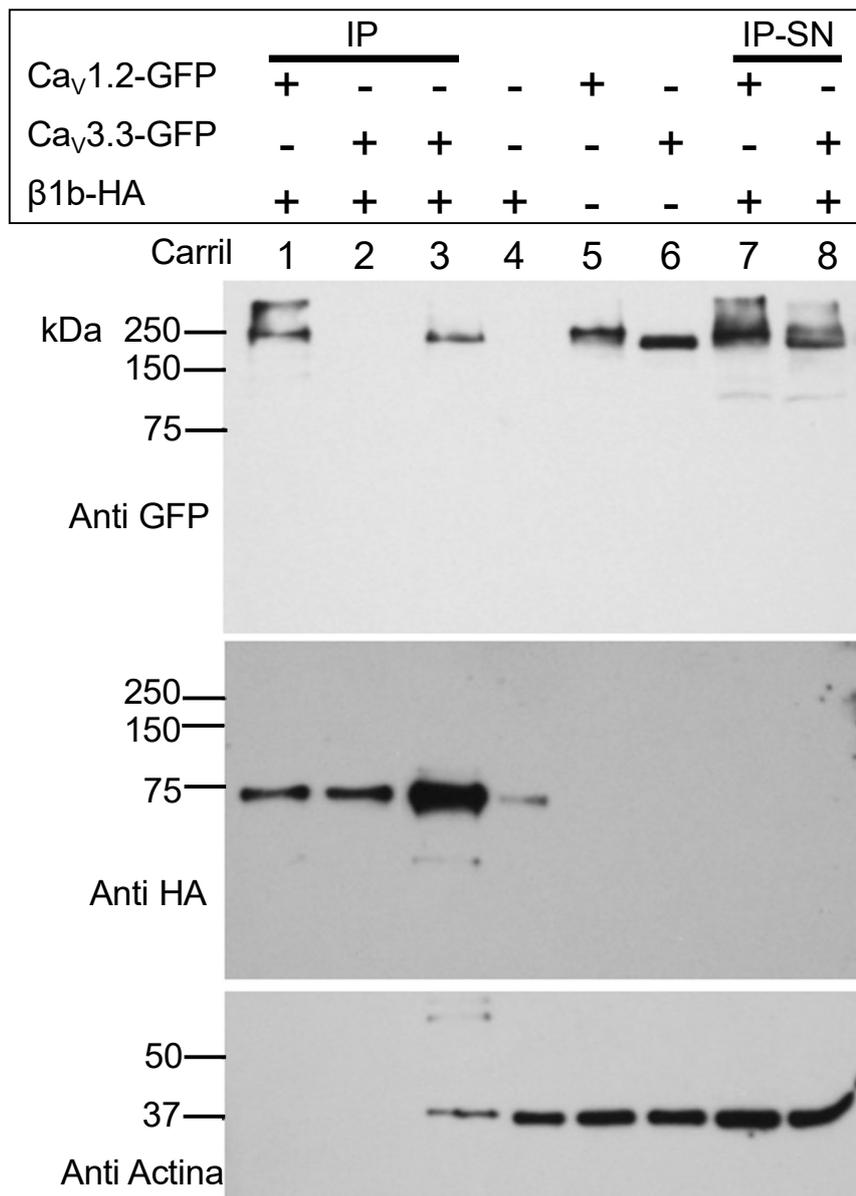


Figura 15. Los canales Ca_v3.3 y la subunidad β1b no co-inmunoprecipitan. *Western blot* de la inmunoprecipitación (IP) de Ca_v1.2-GFP con β1b-HA (control positivo, carril 1) y Ca_v3.3-GFP con β1b-HA (carril 2 y 3). Las muestras de las inmunoprecipitaciones de los carriles 1 y 2 fueron lavadas 3 veces con amortiguador de lisis después de una incubación a 4° C toda la noche, mientras que la muestra del carril 3 únicamente recibió un lavado. Los inmunoblots se incubaron con anticuerpo anti GFP (panel superior) para visualizar las subunidades α₁, posteriormente se desnudó la membrana y se incubó con anti HA para detectar a la subunidad β1b; después se repitió el mismo procedimiento con el anticuerpo anti actina como control de carga. Los carriles 4-6 se cargaron con 15 μg de proteína total de los lisados de células HEK-293 transfectadas con β1b, Ca_v1.2 y Ca_v3.3 respectivamente. Finalmente, los carriles 7 y 8 fueron cargados con 10 μl del sobrenadante (IP-SN) de las muestras cargadas en los carriles 1 y 2. Nótese la importancia de los lavados exhaustivos ya que lavados incompletos de la matriz anti HA permite la obtención de resultados falsos positivos. Como se puede observar Ca_v1.2 co-inmunoprecipita con β1b (carril 1, panel superior) pero Ca_v3.3 no lo hace (carril 2, panel superior). Se muestra una figura representativa de 3 experimentos independientes.

las co-inmunoprecipitaciones se procesaron de manera menos exhaustiva, esto es lavando la matriz de afinidad anti-HA solo una vez y no tres veces, como se hizo para los carriles 1 y 2 de la **Fig. 15** (panel superior), la inmunodetección con el anticuerpo contra GFP revela una banda que corresponde al canal Cav3.3 y una banda por lo menos tres veces más intensa para $\beta 1b$ -HA en la misma inmunoprecipitación (**Fig. 15**, carril 3) así como la presencia de actina (**Fig. 15**, carril 3, panel inferior), indicando la importancia del correcto proceso de lavado en estos ensayos.

En suma, los experimentos de precipitación indican que la subunidad $\beta 1b$ no interactúa físicamente con el canal Cav3.3 o por lo menos no con una alta afinidad, como si lo hace con el canal HVA Cav1.2. A la luz de tales resultados, el incremento en la densidad de corriente observada en las co-transfecciones de los canales Cav3 con la subunidad $\beta 1b$ de los canales HVA no parece ser debido a una interacción física directa entre ambas subunidades.

EL ASA QUE UNE LOS DOMINIOS I Y II ES CRUCIAL PARA EL GATING DE LOS CANALES LVA.

La segunda parte de la presente tesis consistió en investigar si la transferencia del sustrato molecular responsable de la interacción entre las subunidades β con las subunidades α_1 de los canales HVA al canal LVA Cav3.3 era suficiente para inducir la modulación de estos últimos por la subunidad β . Para tal fin se construyó un canal quimérico formado por el canal Cav3.3 (LVA) al cual se le intercambia el asa I-II por la correspondiente del canal Cav1.2 (HVA) (**Fig. 16**). La predicción fue que la remoción del freno de la compuerta de los canales LVA modificaría drásticamente las características distintivas de estos canales en cuanto a su dependencia al voltaje. La expresión del canal Cav3.3 en células HEK-293 generó corrientes visibles a partir de

-50 mV aproximadamente y la corriente máxima se alcanzó entre -20 y -30 mV (**Fig. 16A**, izquierda), mientras que el canal quimérico IC_{LI-II} que está formado por el “esqueleto” del canal $Ca_v3.3$ con el asa I-II de $Ca_v1.2$ (**Fig. 16A**, derecha) exhibió corrientes visibles alrededor de -70 mV y su máximo de corriente cercano a -50 mV. La relación corriente-voltaje de ambos canales muestra un claro aumento en la densidad de corriente del canal quimérico respecto al canal silvestre cercano al 50%, así como un drástico desplazamiento del pico de la corriente máxima hacia voltajes más negativos (alrededor de 30 mV) (**Fig. 16C**). El análisis de la dependencia al voltaje de la activación e inactivación en estado estacionario de los canales $Ca_v3.3$ demostró que el canal quimérico presentó un *gating* a voltajes más negativos que el canal silvestre (**Fig. 16D**), cuyos valores de activación e inactivación media (V_{50}) se desplazaron alrededor de 20 mV hacia voltajes más negativos con respecto al canal silvestre (**Tabla 4**). La sustitución del asa I-II del canal $Ca_v3.3$ por la del $Ca_v1.2$ también promovió alteraciones en la cinética de las corrientes de calcio generadas por el canal quimérico. Por un lado, aceleró significativamente la activación a voltajes muy negativos (entre -50 y -20 mV; **Fig. 16D**), por el contrario, a voltajes más positivos la inactivación fue enlentecida de manera drástica entre -30 y +10 mV (**Fig. 16D**). Aún considerando que el canal quimérico presenta un *gating* 20 mV más negativo que el canal $Ca_v3.3$ silvestre, los cambios en la cinética de la corriente es un efecto verdadero sobre las transiciones conformacionales del canal del estado cerrado al abierto (activación) y de éste al estado activado no conductor (inactivación). Finalmente, los cambios cinéticos también se manifestaron en la recuperación de inactivación, ya que la quimera IC_{LI-II} fue ligeramente más lenta que el canal $Ca_v3.3$ silvestre (**Fig. 16E**). Estos datos electrofisiológicos confirman que dentro del asa que une a los dominios I y II de los canales LVA existen determinantes moleculares críticos

para el funcionamiento característico de estas proteínas (Baumgart *et al.*, 2008), entre los que destaca el freno de la compuerta.

Tabla 4. Propiedades electrofisiológicas del canal silvestre Cav3.3 y quimérico IC_{LI-II}.

Canal	I _{Ca} (pA/pF)	Activación V ₅₀ (mV)	Inactivación V ₅₀ (mV)	τ act (ms)	τ inact (ms)	τ h (ms)
Cav3.3	-81 ± 18	-39.0 ± 0.1	-70.0 ± 1.3	25.1 ± 2.2	77.4 ± 4.4	467 ± 45
IC _{LI-II}	-115 ± 16	-63.2 ± 0.8*	-97.1 ± 0.9*	9.4 ± 1.1*	106 ± 4.8*	789 ± 38*

Los valores se presentan como en la **Tabla 3**. En este caso, la densidad de corriente (pA/pF) se reporta para el voltaje al cual se registro el pico máximo de corriente, esto es -30 mV para el silvestre y -50 mV para el canal quimera. El numero de células analizadas fue de 6 para Cav3.3 y 7 para IC_{LI-II}. Los asteriscos denotan significancia estadística (Prueba t de Student; $P < 0.05$) entre ambos canales.

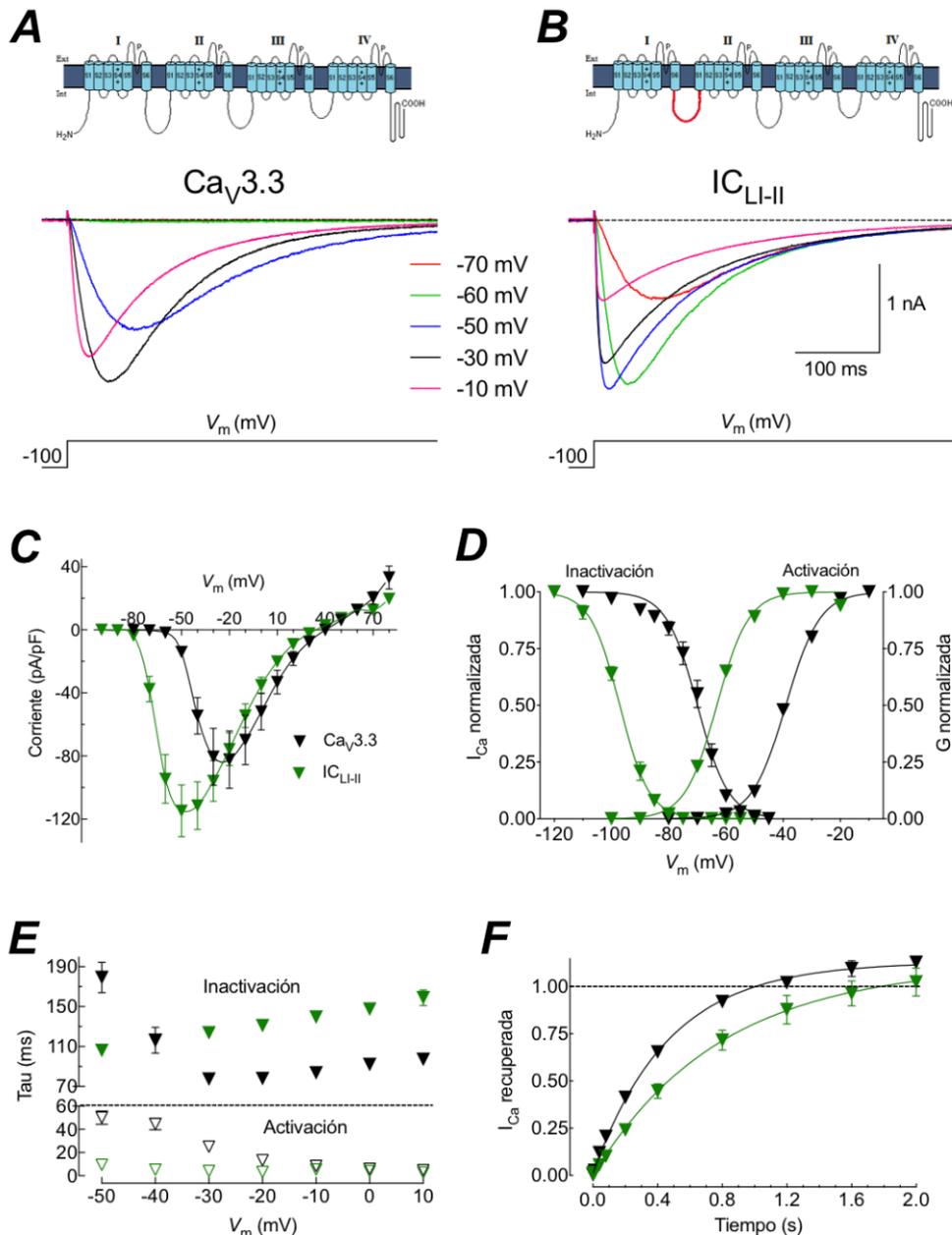


Figura 16. El cambio del asa I-II del canal LVA Cav3.3 por el asa del canal HVA Cav1.2 modifica notablemente las propiedades electrofisiológicas del LVA. A, B) representación esquemática del canal LVA silvestre (izquierda) y quimérico (derecha) así como la corriente representativa a los voltajes señalados en células HEK-293 transfectadas con dichos canales. Es claro que el canal quimérico genera corrientes a voltajes más negativos que el canal silvestre, incluso desde los -70 mV (trazo en color rojo). **C)** Las curvas $I-V$ muestran que la corriente máxima para el canal quimérico se alcanza a -50 mV mientras que para el canal silvestre entre -20 mV y -30 mV, el voltaje de inversión de la corriente no se ve afectado por el cambio del asa. **D)** Las curvas de activación e inactivación revelan un cambio generoso hacia potenciales más negativos (ver datos de V_{50} en **Tabla 4**) en el quimérico. **E)** La cinética de inactivación es más lenta en el canal IC_{LI-II} comparado con el canal silvestre Cav3.3, especialmente a potenciales de membrana más positivos que -40 mV. **F)** El canal quimérico se recupera de la inactivación de manera más lenta que el silvestre, incluso después de 2 segundos aun no se recupera completamente. El número de células analizadas fue de 6 para Cav3.3 y 7 para IC_{LI-II} .

Con la finalidad de investigar si la transferencia del asa I-II del canal HVA al canal LVA (quimera IC_{L-I-II}) es suficiente para conferir a ésta la facultad de ser modulada por las subunidades β de los canales HVA, procedimos a expresar la quimera IC_{L-I-II} en presencia de las diferentes subunidades β ya mencionadas con anterioridad. El resumen de los resultados se presenta en la **Fig. 17**. La densidad de corriente aumento (entre 10 y 30%) en presencia de cualquiera de las cuatro subunidades β estudiadas; sin embargo, las diferencias no solo no fueron significativas, sino que en comparación con los efectos observados en canales HVA (aumentos de 300-500%) no son relevantes desde el punto de vista fisiológico. Tampoco se observaron cambios en el pico de la curva *I-V* en presencia de las subunidades accesorias (**Fig. 17A**). De igual manera la inactivación en el estado estacionario ni la cinética de activación, inactivación, recuperación de la inactivación y cierre del canal desde el estado abierto sufrieron modificaciones significativas (**Fig. 17 B-E**). Estos resultados sugieren que la presencia de la secuencia AID necesaria para la interacción física entre la subunidad α_1 y la subunidad β ; así como la estructura secundaria de alfa hélice ininterrumpida desde el IS6 hasta el final del AID no son suficientes para que la subunidad auxiliar ejerza sus efectos sobre la subunidad principal. Lo anterior sugiere que el mecanismo de acople entre la unión de la subunidad β y la subunidad α_1 y los efectos en las propiedades biofísicas de ésta última involucran estructuras adicionales al asa I-II de los canales HVA.

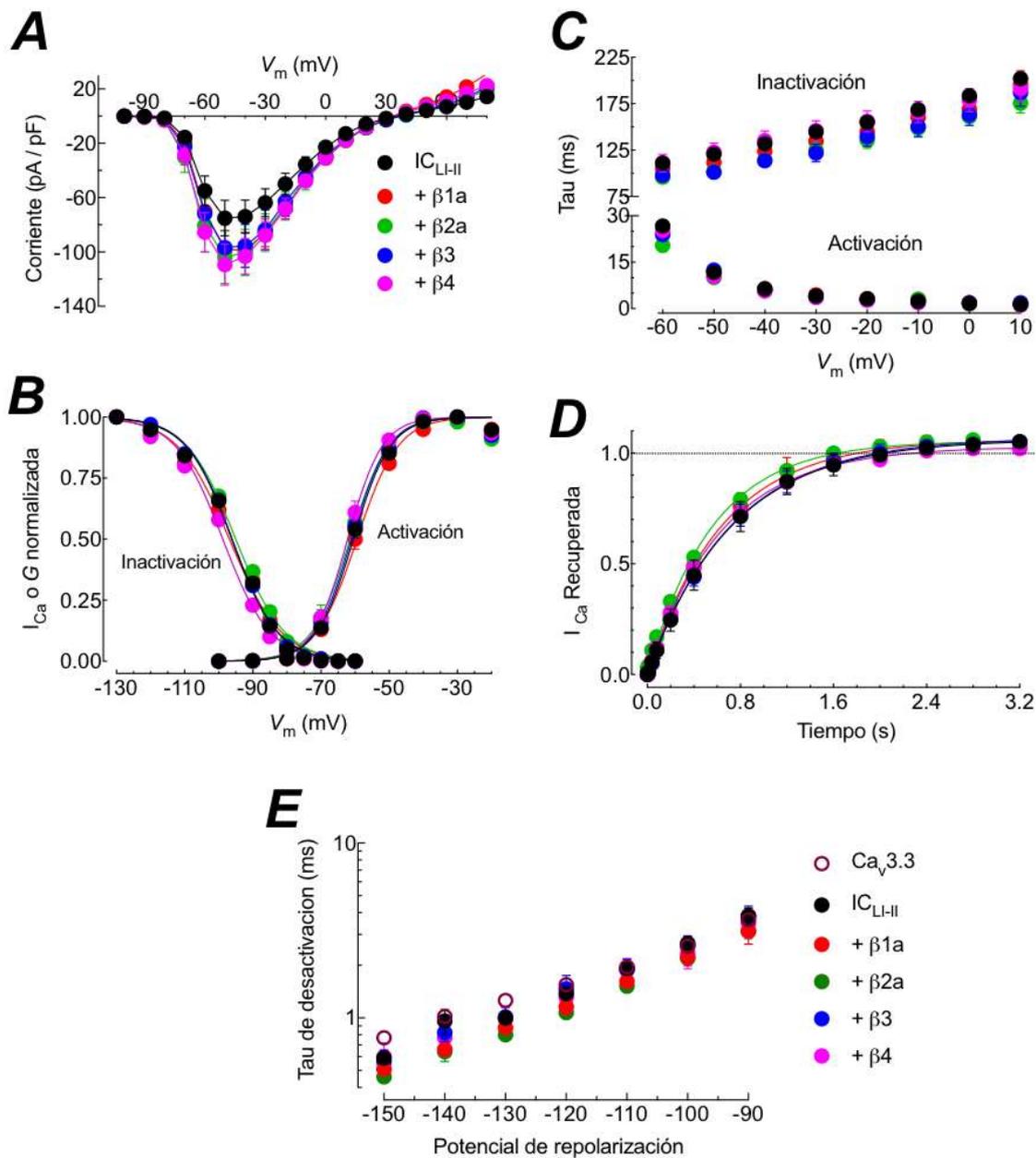


Figura 17. Las propiedades biofísicas del canal quimérico IC_{L-II} no son afectadas por las subunidades β . **A)** Las curvas $I-V$ muestran que la corriente máxima para el canal quimérico se alcanza a -50 mV en presencia o ausencia de cualquier subunidad β empleada. **B)** Las curvas de activación e inactivación revelan que no hay cambios en la dependencia al voltaje del canal IC_{L-II} debidos a la presencia de las subunidades β . **C - E)** Las cinéticas de activación e inactivación, de la recuperación de la inactivación y desactivación fueron prácticamente las mismas independientemente de la presencia de las subunidades β . El numero de células estudiadas vario de 3 a 19. En todos los casos los datos se grafican como la media \pm EEM.

CONSERVACIÓN DEL PUENTE SALINO DEL FRENO DE LA COMPUERTA EN DIVERSOS TAXA ANIMALES Y SU CONTRIBUCIÓN A LA ACTIVACIÓN DE BAJO UMBRAL DE LOS CANALES LVA.

Los alineamientos mostrados en la **Fig. 18** reflejan una alta conservación de la secuencia que corresponde a los primeros 65 aminoácidos del asa que une a los dominios I y II de los tres canales LVA en taxa animales sumamente diversos, desde cnidarios (*Hydra*) hasta primates (*Gorilla*, *Pan*, *Homo*). La estructura secundaria predicha por SOPMA en esta región fue de dos hélices alfa separadas por una estructura aleatoria (no alfa ni beta plegada), justo como ya se había propuesto anteriormente (Arias-Olguín *et al.*, 2007; Baumgart *et al.*, 2008).

En el alineamiento se observa la absoluta conservación del freno de la compuerta en diferentes grupos animales como cnidarios, peces, anfibios, reptiles y mamíferos; lo cual sugiere la relevancia funcional de esta estructura en los canales LVA. Dentro del alto grado de conservación, es importante enfatizar el 100% de conservación de dos residuos con carga en todos los grupos animales analizados, el ácido glutámico (E) en la hélice 1 y la arginina (R) en la hélice 2 (coloreados en rojo y azul en la **Fig. 18**).

La estructura tridimensional del freno de la compuerta obtenida mediante el servidor de I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), sugiere una estrecha proximidad entre dos aminoácidos cargados, el ácido glutámico en la hélice 1 y la arginina en la hélice 2. La distancia calculada entre estos aminoácidos fue de 1.7 Å para Cav3.1 y Cav3.2 mientras que para Cav3.3 fue de 7.2 Å (**Fig. 19A-C**). Estas distancias se encuentran dentro del intervalo en el que la formación de una interacción electrostática debida a un puente salino puede tener lugar (Donald, *et al.*, 2011).

Ca _v 3.1	Región proximal del Asa I-II (freno de la compuerta)
<i>Ochotona</i>	ATQFSETKQRFSQLMREQVRVFLSNASTLASFSEPGSCYEELLKYLVIILRKAARLAQVSRAGVVR-
<i>Mus</i>	ATQFSETKQRFSQLMREQVRVFLSNASTLASFSEPGSCYEELLKYLVIILRKAARLAQVSRAGVVR-
<i>Rattus</i>	ATQFSETKQRFNQLMREQRARYLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRSLRLYARWQSRW
<i>Bos</i>	ATQFSETKQRFSQLMREQVRVFLSNASTLASFSEPGSCYEELLKYLVIILRKAARLAQVSRAGVVR-
<i>Pteropus</i>	ATQFSETKQRFNQLMREQRARYLSDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHICRKVKRSLRFYARWQSRW--
<i>Canis</i>	ATQFSETKQRFSQLMREQVRVFLSNASTLASFSEPGSCYEELLKYLVIILRKAARLAQVSRAGVVR---
<i>Felis</i>	ATQFSETKQRFSQLMREQVRVFLSNASTLASFSEPGSCYEELLKYLVIILRKAARLAQVSRAGVVR---
<i>Orcinus</i>	ATQFSETKQRFSQLMREQVRVFLSNASTLASFSEPGSCYEELLKYLVIILRKAARLAQVSRAGVVR---
<i>Gorilla</i>	ATQFSETKQRFSQLMREQVRVFLSNASTLASFSEPGSCYEELLKYLVIILRKAARLAQVSRAGVVR---
<i>Pan</i>	ATQFSETKQRFSQLMREQVRVFLSNASTLASFSEPGSCYEELLKYLVIILRKAARLAQVSRAGVVR---
<i>Homo</i>	ATQFSETKQRFSQLMREQVRVFLSNASTLASFSEPGSCYEELLKYLVIILRKAARLAQVSRAGVVR---
Estructura secundaria	cc <hh< h="">ehhhhhhhhhccctt<hh< h="">ttcc HÉLICE 1 <i>ALEATORIA</i> HÉLICE 2</hh<></hh<>

Ca _v 3.2	Región proximal del Asa I-II (freno de la compuerta)
<i>Hydra</i>	ATQFSETRQRFSSALMAEARKKARPGTFTSMSENENSGCYRQILSLAKYSIRNSYR--L--RQRFIHKN--
<i>Ochotona</i>	ATQFSETKQRFNQLMREQRARYLSNDSTLASFSEPGSCYEELLRYLGHVCRKVRRLGLRLYARWQSRW--
<i>Mus</i>	ATQFSETKQRFNQLMREQRARYLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRSLRLYARWQSRW--
<i>Rattus</i>	ATQFSETKQRFNQLMREQRARYLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRSLRLYARWQSRW--
<i>Bos</i>	ATQFSETKQRFNQLMREQRARYLSNDSTLASFSEPGSCYEELLRYVGHVCRKLRRLGLRLYARWQSRW--
<i>Pteropus</i>	ATQFSETKQRFNQLMREQRARYLSDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHICRKVKRSLRFYARWQSRW--
<i>Canis</i>	ATQFSETKQRFNQLMREQRARYLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHICRKVKRSLRLYARWQSRW--
<i>Felis</i>	ATQFSETKQRFNQLMREQRARYLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHVCRKVRRLGLRLYARWQSRW--
<i>Orcinus</i>	ATQFSETKQRFSQLMREQRARYLSNDSTLASFSEPGSCYEELLRYVGHVCRKLRRLGLRLYARWQSRW--
<i>Gorilla</i>	ATQFSETKQRFSQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRSLRLYARWQSRW--
<i>Pan</i>	ATQFSETKQRFSQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRSLRLYARWQSRW--
<i>Homo</i>	ATQFSETKQRFSQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRSLRLYARWQSRW--
Estructura secundaria	cc <hh< h="">ccctcheeccccttcc<hh< h="">cthh HÉLICE 1 <i>ALEATORIA</i> HÉLICE 2</hh<></hh<>

Ca _v 3.3	Región proximal del Asa I-II (freno de la compuerta)
<i>Ochotona</i>	ATQFSETKQRFHRLMLEQRQRYLSS-STVASYAEPGDCYEEIFQYVCHILRKAKRALGLYQVLQSR--
<i>Mus</i>	ATQFSETKQRFHRLMLEQRQRYLSS-STVASYAEPGDCYEEIFQYVCHILRKAKRALGLYQALQNR--
<i>Rattus</i>	ATQFSETKQRFHRLMLEQRQRYLSS-STVASYAEPGDCYEEIFQYVCHILRKAKRALGLYQALQNR--
<i>Bos</i>	ATQFSETKQRFHRLMLEQRQRYLSS-STVASYAEPGDCYEEIFQYVCHILRKAKRALGLYQALRSR--
<i>Pteropus</i>	ATQFSETKQRFHRLMLEQRQRYLSS-STVASYAEPGDCYEEIFQYVCHILRKAKRALGLYQALQSR--
<i>Canis</i>	ATQFSETKQRFHRLMLEQRQRYLSS-STVASYAEPGDCYEEIFQYVCHILRKARRALGLYQALQSR--
<i>Felis</i>	ATQFSETKQRFHRLMLEQRQRYLSS-STVASYAEPGDCYEEIFQYVCHILRKARRALGLYQALQSR--
<i>Orcinus</i>	ATQFSETKQRFHRLMLEQRQRYLSS-STVASYAEPGDCYEEIFQYVCHILRKAKRALGLYQALQRR--
<i>Gorilla</i>	ATQFSETKQRFHRLMLEQRQRYLSS-STVASYAEPGDCYEEIFQYVCHILRKAKRALGLYQALQSR--
<i>Pan</i>	ATQFSETKQRFHRLMLEQRQRYLSS-STVASYAEPGDCYEEIFQYVCHILRKAKRALGLYQALQSR--
<i>Homo</i>	ATQFSETKQRFHRLMLEQRQRYLSS-STVASYAEPGDCYEEIFQYVCHILRKAKRALGLYQALQSR--
Estructura secundaria	hccc <hh< h="">ch-hhhhhcccttcc<hh< h="">tt HÉLICE 1 <i>ALEATORIA</i> HÉLICE 2</hh<></hh<>

Figura 18. Conservación filogenética del freno de la compuerta en los canales LVA. Se muestran los alineamientos de la región proximal del asa I-II de los tres canales LVA en diferentes grupos animales a lo largo de la escala evolutiva (desde los relativamente simples como los cnidarios hasta mas complejos como los mamíferos). Los alineamientos se muestran agrupados para los canales Ca_v3.1, Ca_v3.2 y Ca_v3.3. La predicción de la estructura secundaria con el algoritmo SOPMA sugiere la presencia de dos hélices alfa separadas por una región con estructura aleatoria. Se resalta en color rojo (ácido glutámico) y azul (arginina) a los aminoácidos con carga eléctrica neta propuestos para formar un puente salino entre la hélice 1 y la hélice 2 del freno de la compuerta. El nombre completo de cada especie mostrada en el alineamiento y el número de acceso de la secuencia para Ca_v3.1, Ca_v3.2 y Ca_v3.3 respectivamente son los siguientes: *Hydra vulgaris* (nótese que solo aplica para Ca_v3.2

Cuando se realizaron mutaciones *in silico* para evitar la formación del puente salino no se observaron modificaciones importantes en la estructura del freno de la compuerta (hélice-aleatoria-hélice), lo que sugiere que dicho puente salino no es de crucial relevancia para el mantenimiento de la estructura del freno de la compuerta, sin embargo, su posible efecto en la función del mismo fue investigado experimentalmente mediante la introducción de las mutaciones en el cDNA de cada uno de los canales Cav3.

Con el objetivo de estudiar la contribución funcional del putativo puente salino del freno de la compuerta formado por el ácido glutámico y arginina, se eliminó esta interacción sustituyendo el Glu por Ala en los tres canales LVA mediante mutagénesis sitio dirigida.

Los tres canales mutantes E477A, E429A y E408A correspondientes a Cav3.1, Cav3.2 y Cav3.3 respectivamente, fueron funcionales y generaron corrientes detectables a voltajes más negativos que los canales silvestres (**Fig. 20A-C**), y una clara tendencia a expresar corrientes más robustas que se reflejaron en densidades de corriente más grandes, sobre todo para el caso de las mutantes de los canales Cav3.2 y Cav3.3, no obstante, dichos cambios no fueron significativos (**Fig. 20D-F y Tabla 5**).

HAAD01005429), *Ochotona princeps* (XM_004591023, XM_004596803 y XM_004589745), *Mus musculus* (NM_009783, NM_021415 y NM_001044308), *Rattus norvegicus* (AF290212, NM_153814 y NM_020084), *Bos taurus* (NM_001193140, XM_015460299 y XM_010805738), *Pteropus vampyrus* (XM_011365046, XM_011376985 y XM_011369120), *Canis lupus familiaris* (XM_005624647, XM_014114720 y XM_014117423), *Felis catus* (XM_019816934, XM_019820296 y XM_019835888), *Orcinus orca* (XM_004282562, XM_004270474 y XM_004279506), *Gorilla gorilla* (XM_004041354, XM_019012668 y XM_019018027), *Pan troglodytes* (XM_016932515, XM_016929117 y XM_016939202) y *Homo sapiens* (AF190860, AF051946 y AF393329).

Interesantemente, la propiedad más afectada en los tres canales Cav3 fue la dependencia al voltaje de activación e inactivación, ya que las curvas de conductancia-voltaje y de inactivación en estado estacionario se desplazaron hacia voltajes más negativos (**Fig. 20G-I**). Los valores de V_{50} de la activación como de la inactivación fueron alrededor de 8-10 mV más negativos respecto al de los canales silvestres (**Tabla 5**).

En resumen la serie de experimentos realizada en el presente trabajo muestra que los canales LVA son afectados en su densidad de corriente por la subunidad $\beta 1b$, que este incremento no es consecuencia de una interacción de alta afinidad entre las subunidades α_1 (de los canales LVA) y $\beta 1b$; además que el freno de la compuerta se encuentra altamente conservado entre los canales LVA conocidos de diferentes especies animales y que al interior de esta estructura se conserva un puente salino que contribuye de manera relevante en la dependencia al voltaje de los canales LVA.

Tabla 5. Características electrofisiológicas de los canales LVA silvestres y mutantes sin puente salino del freno de la compuerta.

Canal	I_{Ca} (pA/pF)	Activación V_{50} (mV)	Inactivación V_{50} (mV)	τ act (ms)	τ inact (ms)
Cav3.1	-72 ± 10	-48.8 ± 1.2	-77.2 ± 1.6	2.5 ± 0.2	18.0 ± 0.8
E477A	-70 ± 15	$-57.2 \pm 0.8^*$	$-84.0 \pm 1.2^*$	2.3 ± 0.2	16.4 ± 1.0
Cav3.2	-59 ± 12	-47.5 ± 2.0	-78.3 ± 2.1	4.5 ± 0.5	27.2 ± 1.8
E429A	-106 ± 19	$-57.5 \pm 1.2^*$	$-85.4 \pm 0.9^*$	4.7 ± 0.4	$22.6 \pm 1.1^*$
Cav3.3	-138 ± 18	-44.2 ± 1.0	-72.0 ± 0.7	16.1 ± 1.5	58.8 ± 2.9
E408A	-210 ± 31	$-56.7 \pm 0.7^*$	$-81.2 \pm 0.6^*$	$9.1 \pm 0.8^*$	51.8 ± 3.6

Los valores se presentan como la media \pm EEM. Densidad de corriente (pA/pF) comparada al pico máximo de corriente de la curva $I-V$, esto es -30 mV para el silvestre y -40 mV para los canales mutantes. El resto de los parámetros biofísicos se obtuvieron de la misma forma que los presentados en la **Tabla 3**. El número de células analizadas varió entre 5 y 15. Los asteriscos denotan significancia estadística (t de Student; $P < 0.05$) entre el canal silvestre y los mutantes.

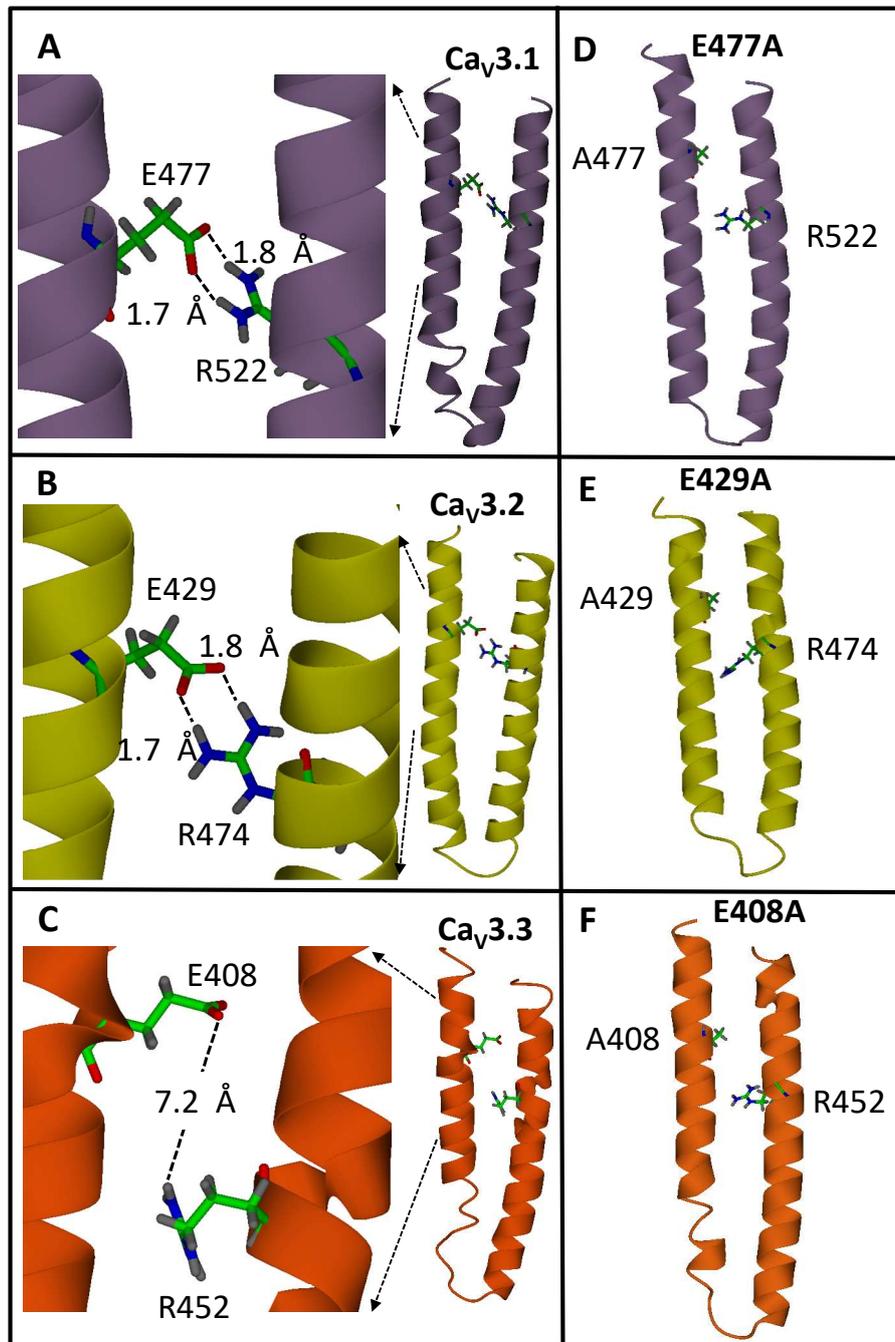


Figura 19. La disrupción *in silico* del puente salino no modifica sustancialmente la estructura del freno de la compuerta. A - C) Estructura tridimensional del freno de la compuerta en los canales LVA generada en I-TASSER. En cada panel se muestra la estructura completa (derecha) del freno de la compuerta dos hélices alfa unidas por una estructura aleatoria en forma de asa. Se destaca en forma de palillos (*sticks*) los dos aminoácidos que forman los puentes salinos: el Glu (E) en la hélice 1 y la Arg (R) en la hélice 2. A la izquierda se muestra un acercamiento del puente salino, así como las distancias entre los aminoácidos mencionados en los tres casos es menor a 10 Å, lo cual es determinante para la formación del puente salino. D - F) Mutaciones *in silico* para evitar la formación del puente salino, mediante la sustitución del Glu ubicado en la hélice 1 por Ala, en cada uno de los canales Ca_v3. Nótese que la estructura del freno de la compuerta no sufre alteraciones evidentes por la mutación, en comparación con la estructura obtenida en los canales silvestres.

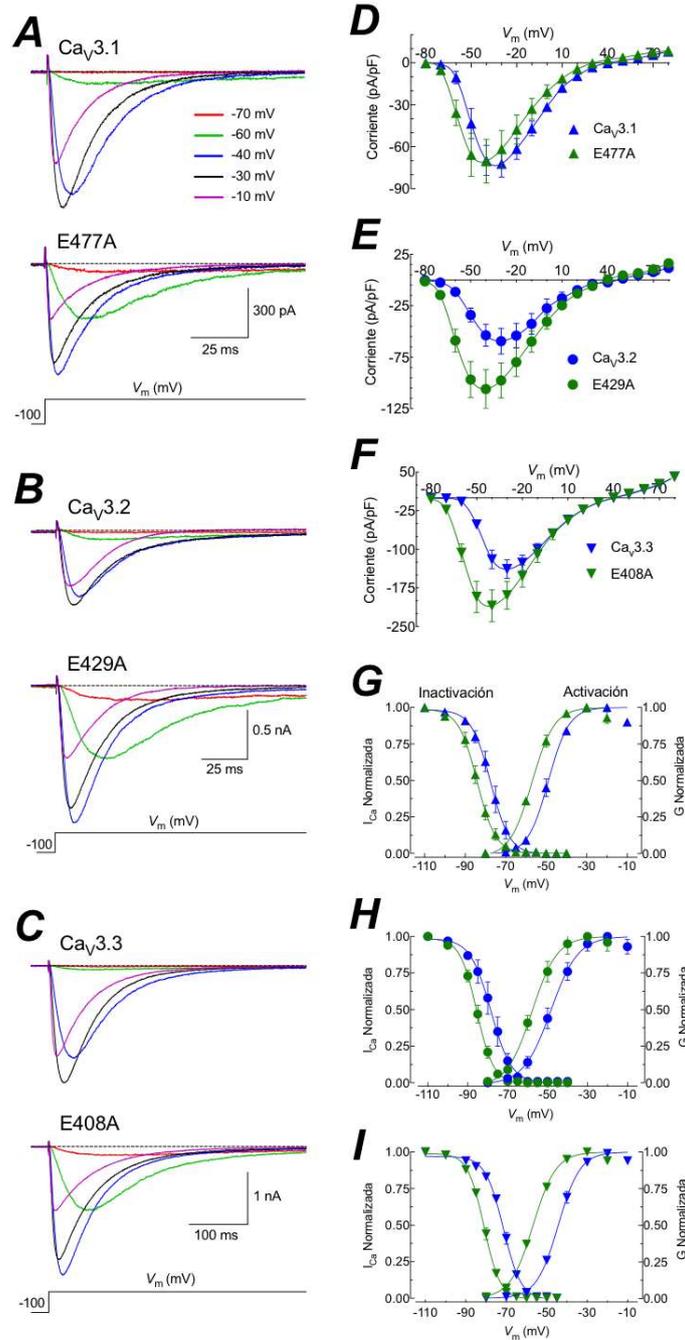


Figura 20. La disrupción *in situ* del puente salino modifica sustancialmente la dependencia al voltaje de los canales LVA. **A - C)** Corrientes representativas de Ca^{2+} generadas por células HEK-293 transfectadas con los canales LVA silvestres y mutantes señalados en cada caso. Los canales mutantes generan corrientes a voltajes más negativos que sus contrapartes silvestres. **D - F)** Curvas *I-V* donde se compara la densidad de corriente de los canales LVA silvestres y mutantes. La tendencia a expresar corrientes más robustas es clara, aunque no significativa, sobre todo para los canales mutantes de $\text{Ca}_v3.2$ y $\text{Ca}_v3.3$. Además, la corriente máxima de los canales carentes del puente salino, se alcanza a voltajes más negativos que los canales silvestres. **G - I)** Curvas conductancia-voltaje y de inactivación en estado estacionario. En los tres casos la dependencia al voltaje de ambas propiedades se desplazo hacia voltajes más negativos para los canales LVA mutantes comparada con los silvestres (ver parámetros V_{50} en **Tabla 5**). El número de células analizadas varió entre 5 y 15.

DISCUSIÓN

La contribución de los canales de calcio LVA (tipo T o Ca_v3) a los diferentes procesos celulares en los que están involucrados es inherente, al menos de manera parcial, a las propiedades electrofisiológicas que los distinguen. La apertura dependiente de voltaje de los canales tipo T ocurre a potenciales de membrana (V_m) comparativamente negativos donde la entrada de calcio contribuye a la despolarización de la membrana plasmática, incrementando así la probabilidad de apertura de canales de sodio activados por voltaje y la proclividad de las células para generar potenciales de acción (Crandall *et al.*, 2010). Además, la rápida recuperación de la inactivación permite a los canales tipo T generar espigas de calcio en los periodos breves de hiperpolarización del V_m , lo cual conduce al disparo de ráfagas o potenciales de acción de rebote, fenómeno que da lugar a varias formas de ritmogénesis neuronal (Crunelli *et al.*, 2006; Cain y Snutch, 2013). Igualmente, relevante resulta ser la propiedad de “corriente de ventana” que generan los canales tipo T. Aunque una fracción importante de canales tipo T se encuentran inactivados al V_m de la mayoría de las neuronas, una pequeña fracción de canales permanecen abiertos permitiendo el influjo pasivo de calcio. En algunas neuronas, la corriente de ventana ha sido asociada a la generación de oscilaciones de baja frecuencia observadas durante patrones del sueño (Crunelli *et al.*, 2005), y es probable que participe en funciones adicionales especialmente en células no excitables. Finalmente, los canales de calcio tipo T participan en la liberación de bajo umbral de neurotransmisores y hormonas, probablemente por su capacidad de acoplamiento funcional con la maquinaria de liberación vesicular (Weiss y Zamponi, 2013; Carbone *et al.*, 2014). En consecuencia, no es de sorprender que alteraciones en el funcionamiento o expresión de estos canales repercuta en el funcionamiento celular derivando en condiciones patológicas como epilepsia, ataxia espinocerebelar, dolor

neuropático, desordenes neuropsiquiátricos, fibrilación atrial, insuficiencia cardíaca congénita y cáncer (Gomora *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2003; Bourinet *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2006; Shin, 2006; Choi *et al.*, 2007; Cribbs, 2010; Uslaner *et al.*, 2012; Gangarossa *et al.*, 2014; Morino *et al.*, 2015; Weaver *et al.*, 2015). La actividad de los canales tipo T es regulada finamente por diferentes mecanismos celulares como la acción de hormonas y neurotransmisores (Chemin *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2013); así como en procesos celulares entre ellos la diferenciación y proliferación celular (Lory *et al.*, 2006; Weaver *et al.*, 2015); y diferentes moléculas de señalización y otras moléculas “compañeras” entre las que se encuentran el dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G (Wolfe *et al.*, 2003; DePuy *et al.*, 2006); calmodulina-CaMKII (Welsby *et al.*, 2003; Chemin *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017), kelch-like 1 (Aromolaran *et al.*, 2010), calcineurina (Huang *et al.*, 2013), syntaxina 1A (Weiss *et al.*, 2012), y CACHD1 (Cottrell *et al.*, 2018; Stephens y Cottrell 2019). Sin embargo, la regulación por las subunidades auxiliares de los canales HVA es aún controversial. Varios grupos de investigación han reportado que los canales LVA no son regulados por las subunidades auxiliares de los canales HVA (Lacinova *et al.*, 1995; Lambert *et al.*, 1997; Leuranguer *et al.*, 1998; Arias *et al.*, 2005). Uno de estos reportes muestra que la depleción de las subunidades β de neuronas del ganglio nodoso no provoca cambios significativos en las corrientes generadas por los canales LVA (Lambert *et al.*, 1997). No obstante, esas células no expresan la subunidad $\beta 1b$ que, de acuerdo a los datos reportados en la presente disertación, es la que induce el cambio más importante en la actividad de los canales LVA. Por consiguiente, los resultados de Lambert y colaboradores podrían ser explicados por la no expresión de la proteína de $\beta 1b$. En contraste, otro grupo de evidencias sugiere que los canales LVA si son regulados por las subunidades auxiliares de los canales HVA (Dolphin *et al.*,

1999; Dubel *et al.*, 2004; Bae *et al.*, 2010). Empleando inmunoensayos *in vitro*, Bae y colaboradores en 2010, sugirieron una interacción de baja afinidad entre subunidades β y péptidos de Cav3.3 que contenían el equivalente a la secuencia AID (péptido de 30 residuos). En el presente trabajo se demostró que la co-transfección de los canales LVA con diferentes subunidades β genera un incremento en la densidad de corriente, un efecto que es más robusto y consistente con el canal Cav3.3. Esta acción se limitó a los niveles de densidad de corriente mientras que las propiedades biofísicas de los canales no se afectaron, tal como se había reportado por otros autores (Dubel *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2005).

Usando las subunidades α_1 completas de los canales LVA y Cav1.2 se observó un incremento robusto en la colocalización de estas subunidades α_1 con la membrana celular en presencia de la subunidad β 1b. Estos resultados fueron confirmados después con experimentos de co-inmunoprecipitación donde solo la proteína del canal Cav1.2 precipitó con la subunidad β 1b, sugiriendo que el canal Cav3.3 no está lo suficientemente cerca de la subunidad β 1b para tener una fuerte interacción física, tal como se observó con el canal Cav1.2 (**Fig. 13**). En consecuencia, la regulación electrofisiológica de los canales LVA por parte de las subunidades β , mostrada en las **Figs. 6 y 7** no puede ser explicada por una interacción física fuerte entre estas proteínas, pero sí por los incrementos observados en la localización de los canales Cav3 en la membrana celular. La ausencia de una interacción fuerte entre Cav3.3 y β 1b puede explicarse en parte por la ausencia del AID, que se ha probado es necesario para mediar la interacción física entre los canales HVA y las subunidades β (Berrou *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004; Van Petegem *et al.*, 2004). Sin embargo, como lo demuestran nuestros resultados de la quimera IC_{LI-II} en la cual el asa que une los dominios I y II del canal Cav3.3 fue reemplazada con la del canal Cav1.2 que contiene

la región AID, la presencia de esta última fue insuficiente para conferir la modulación del canal LVA por subunidades β de los canales HVA (**Fig. 17**). Probablemente se requieran estructuras adicionales al AID para que la unión de la subunidad β se traduzca en la regulación de las propiedades biofísicas de los canales HVA. Además, una interacción alterna al AID entre los canales LVA y las subunidades β no se puede descartar. De hecho, esta posibilidad se sustenta en la observación de que péptidos sintéticos que corresponden al AID de $Ca_v1.2$ no alteran la unión del péptido correspondiente al AID de $Ca_v3.3$ con la subunidad $\beta1b$ y $\beta4$, sugiriendo que el sitio ABP dentro de la subunidad β no juega un papel en la unión con el AID de $Ca_v3.3$ (Bae *et al.*, 2010).

Evidencias adicionales permiten plantear la posibilidad de múltiples sitios de interacción entre las subunidades α_1 de los canales HVA y las subunidades β , incluyendo estudios estructurales (Maltez *et al.*, 2005; Dresviannikov *et al.*, 2009). Debido a que en el presente trabajo se utilizaron a las proteínas completas en los experimentos de colocalización, FRET y co-inmunoprecipitación, la identificación precisa de los aminoácidos implicados en la interacción no es posible.

Independientemente del probable sitio o sitios de interacción de la subunidad β de los canales HVA con las subunidades α_1 de los canales LVA responsables del aumento observado en la expresión de estos últimos en la membrana plasmática (**Figs. 7, 8 y 13**), es probable que tales subunidades auxiliares de los canales HVA no sean las principales proteínas moduladoras de los canales LVA. Recientemente se han mostrado evidencias de que la actividad funcional de los canales Ca_v3 (LVA) es regulada por moléculas endógenas como la proteína unidora de actina kelch-like 1, la

proteína adaptadora Stac1, la proteína integral de retículo endoplásmico calnexina, y la proteasa específica de ubiquitina, USP5 (revisado en Weiss y Zamponi, 2019).

Mención aparte merecen los recientes hallazgos con CACHD1 (*Ca²⁺ channel and chemotaxis receptor domain containing protein 1*), una proteína con similitudes estructurales a otra de las subunidades auxiliares de los canales HVA, las subunidades $\alpha 2\delta$. Experimentos de expresión heteróloga con los tres tipos de canales Ca_v3 , así como en neuronas del hipocampo de rata, demostraron que la sobreexpresión de la proteína CACHD1, pero no de $\alpha 2\delta 1$, incrementa de manera robusta la densidad de corriente de Ca^{2+} al pico de la curva *I-V*, lo cual se acompañó de un incremento en la probabilidad de apertura de los canales Ca_v3 ; así mismo, la excitabilidad celular de las neuronas del hipocampo se incrementó de manera significativa al observarse un aumento en la frecuencia de disparo de potenciales de acción mediados por la actividad de los canales Ca_v3 (Cottrell *et al.*, 2018). Interesantemente, experimentos similares en el canal HVA $Ca_v2.2$ mostraron un efecto más discreto de CACHD1 en la densidad de corriente del canal; por el contrario, la co-transfección con la subunidad $\alpha 2\delta 1$ indujo un aumento que fue 4 veces mayor al observado con CACHD1. Es probable que CACHD1 y $\alpha 2\delta 1$ compitan por el mismo motivo estructural en el canal $Ca_v2.2$, ya que la co-expresión de CACHD1 redujo una reducción en las acciones mediadas por $\alpha 2\delta 1$ en el canal $Ca_v2.2$ (Dahimene, *et al.*, 2018). Este conjunto de evidencias sugiere que CACHD1 podría ser una proteína que module de manera específica la actividad de los canales Ca_v3 , por lo que podría representar un posible blanco terapéutico para el tratamiento de padecimientos que involucren una actividad neuronal aberrante, como en el caso de la epilepsia de tipo ausencia e incluso en la canalopatía de epilepsia idiopática generalizada, entre otros.

En resumen, la primera parte del presente trabajo de tesis demostró que los canales LVA son regulados por la subunidad $\beta 1b$ mediante el incremento de los canales en localizados en la membrana celular y de la densidad de corriente en células HEK-293 que expresan ambas subunidades señaladas. Sin embargo, la baja o prácticamente nula señal de FRET sugiere una débil (si es que existe) interacción física entre las dos proteínas, hecho que explicaría los incrementos en la densidad de los canales en la membrana celular. Es importante mencionar que la debilidad de la mencionada interacción puede ser la principal razón de la discreta y en ocasiones total ausencia de regulación de las propiedades biofísicas de los canales LVA por parte de las subunidades β .

La segunda parte de la presente disertación se enfocó a estudiar la contribución del asa que une los dominios I y II (asa DI-DII) de la subunidad α_1 en el *gating* de los canales LVA y la relevancia estructural y funcional del puente salino del freno de la compuerta. El asa DI-DII de los canales de calcio HVA es blanco de numerosas regulaciones desde subunidades auxiliares (Arikkath y Campbell, 2013; Felix *et al.*, 2013; Simms y Zamponi, 2014); sitios de fosforilación e interacción con proteínas G (Zamponi *et al.*, 1997; Kamp y Hell, 2000). En contraste el asa I-II de los canales LVA no se le había dado relevancia en la regulación de los canales, hasta que el grupo del Dr. Perez-Reyes de la Universidad de Virginia (Arias *et al.*, 2005) construyeron un canal hiper-LVA, cuando movieron el asa I-II del canal HVA $Ca_v2.2$ al canal LVA $Ca_v3.2$. A partir de los hallazgos de ese trabajo el estudio de la región del asa I-II de los canales LVA se hizo más relevante para entender el *gating* de dichos canales. Estudios posteriores disecaron la función de cada parte del asa I-II hasta encontrar que los primeros 65 aminoácidos formaban una estructura a la cual se le llamó freno de la compuerta que presentaba una estructura secundaria con dos hélices alfa unidas

por un giro aleatorio. También se sugirió la presencia de un puente salino entre al menos tres aminoácidos con carga eléctrica, un ácido glutámico en la hélice 1 y dos argininas en la hélice 2 (Vitko *et al.*, 2007; Arias-Olguín *et al.*, 2008; Baumgart *et al.*, 2008). En el presente trabajo se analizó la secuencia de los canales LVA en diferentes taxa animales encontrando de manera interesante la completa conservación de los dos aminoácidos presuntamente involucrados en la formación del puente salino; estos datos sugieren la relevancia de dicha interacción electrostática. Cuando se previno la formación del puente salino mediante la sustitución del ácido glutámico en la hélice 1 por alanina, la estructura del freno de la compuerta de los tres canales LVA no cambió, esto es, se mantuvieron las dos hélices alfa unidas por una estructura azarosa (**Fig. 19**); pero más importante fue que el funcionamiento de los tres canales LVA se alteró de manera significativa (**Fig. 20**). Los cambios fueron similares a los encontrados en el canal quimérico donde se sustituyó por completo el asa I-II del canal LVA por el del canal HVA (**Fig. 16**), básicamente la activación e inactivación de los canales mutantes sin puente salino se manifiesta a voltajes más negativos (**Fig. 20**), con la implicación fisiológica que ello conlleva. La importancia del freno de la compuerta en el funcionamiento de los canales LVA ha sido mostrada por diferentes grupos (Arias *et al.*, 2005; Vitko *et al.*, 2007; Arias-Olguín *et al.*, 2008; Baumgart *et al.*, 2008), sin embargo justo como se mencionó en el párrafo anterior la trascendencia del presente trabajo consistió en revelar la elevada conservación de aminoácidos eléctricamente cargados dentro del freno de la compuerta y su importancia para las propiedades voltaje dependientes de estos canales.

Es posible que el ácido glutámico altamente conservado en el freno de la compuerta de los canales LVA interactúe físicamente con aminoácidos cargados positivamente (argininas y leucinas) presentes en la pequeña asa que une a los segmentos 4 y 5 del

dominio I de estos canales, tal como lo sugiere el modelo del *gating brake* propuesto por Perez-Reyes (2010) e ilustrado en la **Fig. 5** de esta disertación. Tal hipótesis fue fortalecida recientemente por resultados de nuestro grupo de investigación obtenidos mediante la fabricación de quimeras entre el canal LVA Cav3.3 y el HVA Cav1.2 (Sanchez-Sandoval *et al.*, 2018). En una de dichas quimeras, el segmento S4 y la parte inicial del asa que une los segmentos S4 y S5 del dominio I de Cav3.3 fueron sustituidos por los segmentos correspondientes del canal Cav1.2 (quimera IS4C). El canal quimérico resultante mostró una curva de inactivación en el estado estacionario drásticamente desplazada hacia voltajes más negativos (aproximadamente 20 mV), comparado con el canal silvestre. El efecto fue específico del dominio I ya que quimeras similares de los dominios II, III y IV no modificaron la dependencia al voltaje de la inactivación o lo hicieron hacia voltajes más positivos (quimera IIS4C, 6 mV). Con la sustitución en la quimera IS4C se pierden dos aminoácidos con carga positiva (argininas) que se encuentran en el asa intracelular que une los segmentos S4 y S5 de los canales LVA, pero no en los canales HVA. Teniendo en cuenta la aparente alta movilidad del asa I-II y del asa IS4-IS5 es posible que se presente la interacción entre el ácido glutámico altamente conservado dentro del freno de la compuerta y estructuras muy cercanas al sensor de voltaje con la correspondiente afectación en las propiedades dependientes de voltaje de los canales LVA.

Se ha planteado que el freno de la compuerta estabiliza a los canales LVA en el estado cerrado (Perez-Reyes, 2010), por ello cuando esta estructura se altera o es afectada en su conformación fundamental, justo como sucede en el canal quimérico IC_{LI-II}, el estado cerrado es desestabilizado y la activación e inactivación de los canales se lleva a cabo a potenciales de membrana extremadamente negativos (cerca de 20 mV más negativos; **Fig. 16**). Algo semejante ocurre con los canales mutantes E477A,

E429A y E408A; en los que a pesar de que la estructura fundamental del freno de la compuerta no se afecta, pero la formación del puente salino se ve afectada al sustituir el ácido glutámico por alanina, lo cual probablemente previene la asociación del freno de la compuerta con regiones cercanas al sensor de voltaje (Sanchez-Sandoval *et al.*, 2018). Tomando en cuenta esta información se puede hipotetizar que el asa I-II de los canales LVA se mueve hacia el asa S4-S5 en el dominio I y que los aminoácidos con cargas opuestas en estas regiones intracelulares interactúan, permitiendo al canal tener una dependencia al voltaje característica (bajo umbral de activación). Como perspectiva del presente trabajo y para poder comprobar la hipótesis mencionada se requieren realizar experimentos de estructura-función en los canales Cav3 en los que se investigue la contribución de las argininas (y residuos contiguos) del asa IS4-IS5 en la dependencia al voltaje de la activación e inactivación de los canales Cav3.

CONCLUSIONES

Con base en las evidencias experimentales expuestas en el presente trabajo se concluye que la subunidad $\beta 1b$ regula la corriente de los canales LVA incrementando la densidad de corriente expresada por las células transfectadas con las subunidades α_1 de los tres canales LVA: $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$. Este efecto se relaciona con un aumento en la membrana plasmática de la cantidad de proteína de las subunidades α_1 de dichos canales. Sin embargo, dicha elevación en la localización del canal en la membrana no se puede asociar con una interacción física de alta afinidad entre la subunidad α_1 de los canales LVA y la subunidad $\beta 1b$.

Por otro lado, a partir del análisis de las secuencias de aminoácidos de canales Ca_v y las características electrofisiológicas de la quimera IC_{LH-II} y los canales mutantes del puente salino, se concluye que el puente salino que se encuentra dentro del freno de la compuerta de los canales LVA forma parte de una estructura altamente conservada a lo largo de muy diversos grupos animales y que la interacción electrostática entre los aminoácidos que lo forman es fundamental para el funcionamiento de bajo umbral del freno de la compuerta, aunque la estructura global de éste no sufra mayores cambios.

REFERENCIAS

- Agnew W.S., Levinson S.R., Brabson J.S., y Raftery M.A.** 1978. Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus* electroplax membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:2606-2610.
- Antal L.** y Martin-Carballo. 2019. T-type calcium channels in cancer. *Cancers* (Basel). 11(2): pii: E134. doi: 10.3390/cancers11020134.
- Arias J.M., Murbartian J, Vitko I, Lee JH, Perez-Reyes E.** 2005. Transfer of beta subunit regulation from high to low voltage-gated Ca²⁺ channels. *FEBS Lett* 579(18):3907–12.
- Arias-Olguin I., Vitko I., Fortuna M., Baumgart J.P., Sokolova S., Shumilin I., Van Deusen A., Soriano-García M., Gomora J.C. y Perez-Reyes E.** 2008. Characterization of the Gating Brake in the I-II Loop of Ca_v3.2 T-type Ca²⁺ Channels. *J. Biol. Chem* 283 (13), 8136-8144
- Arikkath J. y Campbell K.P.** 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol.* 13(3):298–307.
- Armstrong C.M.** 2007. Life Among the Axons. *Annu Rev Physiol* 69:1-18.
- Aromolaran KA, Benzow KA, Cribbs LL, Koob MD, y Piedras-Renteria ES.** 2010. T-type current modulation by the actin-binding protein Kelch-like 1. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C1353–C1362.
- Bae J., Suh E.J. y Lee C.** 2010. Interaction of T-type calcium channel Ca(v)3.3 with the beta-subunit. *Mol Cells* 30(3):185–91.
- Baumgart J.P., Vitko I., Bidaud I., Kondratskyi A., Lory P. y Perez-Reyes E.** 2008. I-II loop structural determinants in the gating and surface expression of low voltage-activated calcium channels. *PLoS One* 3 (8): e2976.
- Bean B.P.** 1985. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 86:1-30.
- Berridge M.J.** 2005. Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu Rev Physiol* 67:1–21.
- Berrou L., Klein H., Bernatchez G. y Parent L.** 2002. A specific tryptophan in the I–II linker is a key determinant of beta-subunit binding and modulation in Ca(V)2.3 calcium channels. *Biophys J* 83(3):1429–42.
- Bohn G., Moosmang S., Conrad H., Ludwig A., Hofmann F. y Klugbauer N.** 2000. Expression of T- and L-type calcium channel mRNA in murine sinoatrial node. *FEBS Lett* 481(1):73-6.
- Bourinet E., Alloui A., Monteil A., Barrere C., Couette B., Poirot O., Pages A., McRory J., Snutch T. P., Eschalier A. y Nargeot J.** 2005. Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. *EMBO J* 24 (2): 315-324.
- Braun M., Ramracheya R., Bengtsson M., Zhang Q., Karanauskaite J., Partridge C., Johnson P.R. y Rorsman P.** 2008. Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes* 57(6):1618-28.
- Cain SM, y Snutch TP.** 2013. T-type calcium channels in burst-firing, network synchrony, and epilepsy. *Biochim Biophys Acta* 1828:1572–8.
- Canti C., Davies A., Berrow N.S., Butcher A.J., Page K.M. y Dolphin A.C.** 2001. Evidence for two concentration-dependent processes for beta-subunit effects on alpha 1B calcium channels. *Biophys J* 81(3):1439–51.
- Carbone E. y Lux H.D.** 1984. A low voltage-activated, fully inactivating calcium channel in vertebrate sensory neurons. *Nature* 310:501-502.

- Carbone E, Calorio C, y Vandael DHF.** 2014. T-type channel-mediated neurotransmitter release. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 466:677–87.
- Catterall W.A.** 2010. Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology. *Neuron* 67(6): 915–928
- Catterall W.A.** 2011. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (8).
- Catterall W.A.** 1988. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242:50-61.
- Catterall W.A.** 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Chemin J., Traboulsie A. y Lory P.** 2006. Molecular pathways underlying the modulation of T-type calcium channels by neurotransmitters and hormones. *Cell Calcium* 40(2):121–34.
- Chemin J, Taiakina V, Monteil A, Piazza M, Guan W, Stephens RF, Kitmitto A, Pang ZP, Dolphin AC, Perez-Reyes E, Dieckmann T, Guillemette JG, y Spafford JD.** 2017. Calmodulin regulates Cav3 T-type channels at their gating brake *J Biol Chem.*;292(49):20010-20031. doi: 10.1074/jbc.M117.807925.
- Chen C.C., Lamping K.G., Nuno D.W., Barresi R., Prouty S.J., Lavoie J.L., Cribbs L.L., England S.K., Sigmund C.D., Weiss R.M., Williamson R.A., Hill J.A. y Campbell K.P.** 2003. Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca²⁺ channels. *Science* 302(5649):1416-8.
- Chen Y., Lu J., Pan H., Zhang Y., Wu H., Xu K., Liu X., Jiang Y., Bao X., Yao Z., Ding K., Lo W.H., Qiang B., Chan P., Shen Y. y Wu X.** 2003. Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann Neurol.* 54 (2), 239-43.
- Chen Y.H., Li M.H., Zhang Y., He L.L., Yamada Y., Fitzmaurice A., Shen Y., Zhang H., Tong L. y Yang J.** 2004. Structural basis of the alpha(1)-beta subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Nature* 429(6992):675–80.
- Cheong E. y Shin H.S.** 2013. T-Type Ca²⁺ Channels in Normal and Abnormal Brain Functions. *Physiol Rev* 93 (3): 961-992.
- Choi S., Na H.S., Kim J., Lee J., Lee S., Kim D., Park J., Chen C.C., Campbell K.P. y Shin H.S.** 2007. Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)3.2 T-type channels. *Genes Brain Behav* 6 (5): 425-431.
- Cottrell GS, Soubrane CH, Hounshell JA, Lin H, Owenson V, Rigby M, Cox PJ, Barker BS, Ottolini M, Ince S, Bauer CC, Perez-Reyes E, Patel MK, Stevens EB, y Stephens GJ.** 2018. CACHD1 is an α2δ-Like Protein That Modulates Cav3 Voltage-Gated Calcium Channel Activity. *J Neurosci* 38:9186–201.
- Cornet V., Bichet D., Sandoz G., Marty I., Brocard J., Bourinet E., Mori Y., Villaz M. y De Waard M.** 2002. Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum. *Eur J Neurosci* 16(5):883–95.
- Crandall SR, Govindaiah G, y Cox CL.** 2010. Low-threshold Ca²⁺ current amplifies distal dendritic signaling in thalamic reticular neurons. *Journal of Neuroscience* 30:15419–29.
- Cribbs L.L.** 2006. T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: multiple functions. *Cell Calcium.* 40(2):221-30.
- Cribbs L.L.** 2010. T-type calcium channel expression and function in the diseased heart. *Channels* 4(6): 447-452.
- Cribbs L.L., Lee J.H., Yang J., Satin J., Zhang Y., Daud A., Barclay J., Williamson M., Fox M., Rees M. y Perez-Reyes E.** 1998. Cloning and characterization of

alpha 1H from human heart, a member of the T-type Ca(2+) channel gene family. *Circ Res* 83(1):103–9.

- Crunelli V., Toth T.I., Cope D.W., Blethyn K. y Hughes S.W.** 2005. The "window" T-type calcium current in brain dynamics of different behavioural states. *J Physiol* 562 (1): 121-129.
- Crunelli V, Cope D y Hughes S.** 2006. Thalamic T-type Ca²⁺ channels and NREM sleep. *Cell Calcium* 40:175–90.
- Dahimene S, Page KM, Kadurin I, Ferron L, Ho DY, Powell GT, Pratt WS, Wilson SW, Dolphin AC.** 2018. The alpha2delta-like protein *cachd1* increases N-type calcium currents and cell surface expression and competes with alpha2delta-1. *Cell Rep.* 25:1610–1621 e1615.
- Darszon A., López-Martínez P., Acevedo J.J., Hernández-Cruz A. y Treviño C.** 2006. T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium* 40 (2): 241-252.
- DePuy SD, Yao J, Hu C, McIntire W, Bidaud I, Lory P, Rastinejad F, Gonzalez C, Garrison JC, y Barrett PQ.** 2006. The molecular basis for T-type Ca²⁺ channel inhibition by G protein beta2gamma2 subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:14590–5.
- DeWaard M., Scott V.E.S., Pragnell M. y Campbell K.P.** 1996. Identification of critical amino acids involved in alpha(1)-beta interaction in voltage-dependent Ca²⁺ channels. *FEBS Lett* 380(3):272–6.
- Dewaard M., Witcher D.R., Pragnell M., Liu H.Y. y Campbell K.P.** 1995. Properties of the alpha(1)-beta anchoring site in voltage-dependent Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 270(20):12056–64.
- Dolphin A.C., Wyatt C.N., Richards J., Beattie R.E., Craig P., Lee J.H., Cribbs L.L., Volsen S.G. y Perez-Reyes E.** 1999. The effect of alpha 2-delta and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel alpha 1G. *J Physiol London.* 519(1):35–45.
- Donald J.E., Kulp D.W., DeGrado W.F.** 2011. Salt bridges: Geometrically specific, designable interactions. *Proteins* 79:898-915
- Dresviannikov A.V., Page K.M., Leroy J., Pratt W.S. y Dolphin A.C.** 2009. Determinants of the voltage dependence of G protein modulation within calcium channel beta subunits. *Pflugers Arch* 457(4):743–56.
- Dubel S.J., Altier C., Chaumont S., Lory P., Bourinet E. y Nargeot J.** 2004. Plasma membrane expression of T-type calcium channel alpha(1) subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits. *J Biol Chem* 279(28):29263–9.
- Eckle V.S., Shcheglovitov A., Vitko I., Dey D., Yap C.C., Winckler B. y Perez-Reyes E.** 2014. Mechanisms by which a CACNA1H mutation in epilepsy patients increases seizure susceptibility. *J Physiol.* 592(4):795-809.
- Ertel E.A., Campbell K.P., Harpold M.M., Hofmann F., Mori Y., Perez-Reyes E., Schwartz A., Snutch T.P., Tanabe T., Birnbaumer L., Tsien R.W., y Catterall W.A.** 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
- Felix F., Calderón-Rivera A. y Andrade A.** 2013. Regulation of high-voltage-activated Ca²⁺ channel function, trafficking, and membrane stability by auxiliary subunits. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal.* 2(5), 207–220.
- Franciolini F. y Petris A.** 1989. Evolution of ionic channels of biological membranes. *Mol Biol Evol* 6:503-513.
- Gangarossa G., Laffray S., Bourinet E. y Valjent E.** 2014. T-type calcium channel Ca(v)3.2 deficient mice show elevated anxiety, impaired memory and reduced sensitivity to psychostimulants. *Front Behav Neurosci* 8 (92):1-12.

- Gao T.Y., Bunemann M., Gerhardstein B.L., Ma H., y Hosey M.M.** 2000. Role of the C terminus of the alpha(1C) (Ca(v)1.2) subunit in membrane targeting of cardiac L-type calcium channels. *J Biol Chem* 275(33):25436–44.
- Geourjon C. y Deléage G.** 1995. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci.* 11(6): 681-4.
- Goldin A.L., Barchi R.L., Caldwell J.H., Hofmann F., Howe J.R., Hunter J.C., Kallen R.G., Mandel G., Meisler M.H., Netter Y.B., Noda M., Tamkun M.M., Waxman S.G., Wood J.N. y Catterall W.A.** 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28:365-368.
- Gomora J.C., Daud A.N., Weiergraber M. y Perez-Reyes E.** 2001. Block of cloned human, T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Mol Pharmacol* 60(5):1121–32.
- Gomora J.C., Murbartian J., Arias J.M., Lee J.H., Perez-Reyes E.** 2002. Cloning and expression of the human T-type channel Ca(v) 3.3: insights into prepulse facilitation. *Biophys J* 83(1):229–41.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., y Sigworth, F.J.** 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hansen J.P., Chen R.S., Larsen J.K., Chu P.J., Janes D.M., Weis K.E., Best P.M.** 2004. Calcium channel gamma 6 subunits are unique modulators of low voltage-activated (Cav3.1) calcium current. *J Mol Cell Cardiol* 37(6):1147–58.
- Henderson R. y Wang J.H.** 1972. Solubilization of a specific tetrodotoxin-binding component from garfish olfactory nerve membrane. *Biochemistry* 11:4565-4569.
- Hille B.** 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3ra ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hirano Y, Fozzard HA, January CT.** 1989. Characteristics of L- and T-type Ca²⁺ currents in canine cardiac Purkinje cells. *Am J Physiol.* 256:H1478-92.
- Hodgkin A.L. y Huxley A.F.** 1952. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500-544.
- Huang C-H, Chen Y-C, y Chen C-C.** 2013. Physical interaction between calcineurin and Cav3.2 T-type Ca²⁺ channel modulates their functions. *FEBS Lett* 587:1723–30.
- Huguenard J.R. y Prince D.A.** 1992. A novel T-type current underlies prolonged Ca(2+)-dependent burst firing in GABAergic neurons of rat thalamic reticular nucleus. *J. Neurosci* 12 (10): 3804-3817.
- Jan L.Y. y Jan Y.N.** 1990. A superfamily of ion channels. *Nature* 345:672.
- Jones L.P., Wei S.K. y Yue D.T.** 1998. Mechanism of auxiliary subunit modulation of neuronal alpha (1E) calcium channels. *J Gen Physiol* 112(2):125–43.
- Josephson I.R. y Varadi G.** 1996. The beta subunit increases Ca²⁺ currents and gating charge movements of human cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Biophys J.*:70(3):1285–93.
- Kamp T. y Hell J.W.** 2000. Regulation of Cardiac L-Type Calcium Channels by Protein Kinase A and Protein Kinase C. *Circulation Research* 87: 1095-1102.
- Kamp T.J., Perez Garcia M.T. y Marban E.** 1996. Enhancement of ionic current and charge movement by coexpression of calcium channel beta(1A) subunit with alpha(1C) subunit in a human embryonic kidney cell line. *J Physiol London.* 492 (1):89–96.
- Kim D., Song I., Keum S., Lee T., Jeong M.J., Kim S.S., McEnery M.W. y Shin H.S.** 2001. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to

- absence seizures in mice lacking alpha(1G) T-type Ca(2+) channels. *Neuron* 31 (1): 35-45.
- Klößner U, Lee JH, Cribbs LL, Daud A, Hescheler J, Pereverzev A, Perez-Reyes E., y Schneider T.** 1999. Comparison of the Ca²⁺ currents induced by expression of three cloned alpha 1 subunits, alpha 1G, alpha 1H and alpha 1I, of low-voltage-activated T-type Ca²⁺ channels. *Eur J Neurosci* 11(12):4171–8.
- Lacinova L., Klugbauer N., y Hofmann F.** 1995. Absence of modulation of the expressed calcium channel alpha1G subunit by alpha2delta subunits. *J Physiol* 516 (Pt 3):639–45.
- Lambert R.C., Maulet Y., Mouton J., Beattie R., Volsen S., De Waard M. y Feltz A.** 1997. T-type Ca²⁺ current properties are not modified by Ca²⁺ channel beta subunit depletion in nodose ganglion neurons. *J Neurosci* 17(17):6621–8.
- Larsen J.K., Mitchell J.W. y Best P.M.** 2002. Quantitative Analysis of the Expression and Distribution of Calcium Channel alpha 1 subunit mRNA in the atria and ventricles of the Rat Heart. *J Mol Cell Cardiol* 34(5):519-32.
- Lee J.H., Daud A.N., Cribbs L.L., Lacerda A.E., Pereverzev A., Klockner U., Schneider T. y Perez-Reyes E.** 1999. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 19(6):1912–21.
- Lee N, Jeong S, Kim KC, Kim JA, Park JY, Kang HW, Perez-Reyes E, y Lee JH.** 2017. Ca²⁺ Regulation of Ca_v3.3 T-type Ca²⁺ Channel Is Mediated by Calmodulin. *Mol Pharmacol.* 92(3):347-357. doi: 10.1124/mol.117.108530.
- Leuranguer V., Bourinet E., Lory P., y Nargeot J.** 1998. Antisense depletion of beta-subunits fails to affect T-type calcium channels properties in a neuroblastoma cell line. *Neuropharmacology* 37(6):701–8.
- Lory P., Bidaud I. y Chemin J.** 2006. T-type calcium channels in differentiation and proliferation. *Cell Calcium* 40(2):135–46.
- Maltez J.M., Nunziato D.A., Kim J. y Pitt G.S.** 2005. Essential Ca(V)beta modulatory properties are AID-independent. *Nat Struct Mol Biol* 12(4):372–7.
- Marty A. y Neher E.** 1995. Tight-seal whole-cell recording. En *Single Channel Recording*. B.Sakmann and E.Neher, editors. Plenum Press, New York. 31-52.
- Matteson D.R. y Armstrong C.M.** 1986. Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J Gen Physiol* 87:161-182.
- Molineux M.L., McRory J.E., McKay B.E., Hamid J., Mehaffey W.H., Rehak R., Snutch T.P., Zamponi G.W. y Turner R.W.** 2006. Specific T-type calcium channel isoforms are associated with distinct burst phenotypes in deep cerebellar nuclear neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(14):5555-60.
- Morino H., Matsuda Y., Muguruma K., Miyamoto R., Ohsawa R., Ohtake T., Otobe R., Watanabe M., Maruyama H., Hashimoto K. y Kawakami H.** 2015. A mutation in the low voltage-gated calcium channel CACNA1G alters the physiological properties of the channel, causing spinocerebellar ataxia. *Mol Brain.* 8:89.
- Nelson M.T., Todorovic S.M. y Perez-Reyes E.** 2006. The role of T-type calcium channels in epilepsy and pain. *Curr. Pharm* 12 (18): 2189-2197.
- Nowycky M.C., Fox A.P., y Tsien R.W.** 1985. Three types of neuronal calcium channel with different agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- Perez-Reyes E.** 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83:117-161.
- Perez-Reyes E.** 2010. Characterization of the gating brake in the I–II loop of Ca_v3 T-type calcium channels. *Channels.* 4(6), 453-458.

- Perez-Reyes E., Cribbs L.L., Daud A., Lacerda A.E., Barclay J., Williamson M.P., Fox M., Rees M., y Lee J.H.** 1998. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391(6670):896–900.
- Rafferty M.A., Hunkapiller M.W., Strader C.D., y Hood L.E.** 1980. Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science* 208:1454-1456.
- Randall, A.D. y Benham, C.D.** 1999. Recent Advances in the Molecular Understanding of Voltage-Gated Ca²⁺ channels. *Mol Cell Neurosci* 14:255-273.
- Sanchez-Sandoval A.L., Herrera Carrillo Z., Díaz Velásquez C.E., Delgadillo D.M., Rivera H.M. y Gomora J.C.** 2018. Contribution of S4 segments and S4-S5 linkers to the low-voltage activation properties of T-type Cav3.3 channels. *PLoS ONE* 13(2).
- Shin H.S.** 2006. T-type Ca²⁺ channels and absence epilepsy. *Cell Calcium* 40(2):191–6.
- Simms B.A. y Zamponi G.W.** 2014. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron* 82(1):24–45.
- Stephens G.J., Page K.M., Bogdanov Y., Dolphin A.C.** 2000. The alpha 1B Ca(2+) channel amino terminus contributes determinants for beta subunit mediated voltage-dependent inactivation properties. *J Physiol London* 525(2):377–90.
- Stephens GJ, y Cottrell GS.** 2019. CACHD1: a new activity-modifying protein for voltage-gated calcium channels. *Channels* 13:120–3.
- Strong M., Chandy K.G., y Gutman, G.A.** 1993. Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability. *Mol Biol Evol* 10:221-242.
- Talley E.M., Cribbs L., Lee J.H., Daud A., Perez-Reyes E., y Bayliss D.A.** 1999. Differential distribution of three members of a gene family encoding Low voltage-activated (T-Type) Calcium Channels. *J Neurosci* 19(6):1895-911.
- Thompson W.R., Majid A.S., Czymbek K.J., Ruff A.L., Garcia J., Duncan R.L. y Farach-Carson M.C.** 2011. Association of the alpha(2)delta(1) subunit with Ca(v)3.2 enhances membrane expression and regulates mechanically induced ATP release in MLO-Y4 osteocytes. *J Bone Mineral Res* 26(9):2125–39.
- Tsien R.W., Limpscombe D., Madison D.V., Bley K.R., y Fox A.P.** 1995. Reflections on calcium channels diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci* 18:52-54.
- Uslaner J. M., Smith S.M., Huszar S.L., Pachmerhiwala R., Hinchliffe R.M., Vardigan J.D., Nguyen S.J., Surles N.O., Yao L.H., Barrow J.C., Uebele V.N., Renger J.J., Clark J. y Hutson P.H.** 2012. T-type calcium channel antagonism produces antipsychotic-like effects and reduces stimulant-induced glutamate release in the nucleus accumbens of rats. *Neuropharmacology* 62 (3): 1413-1421.
- Van Petegem F., Clark K.A., Chatelain F.C. y Minor D.L.** 2004. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* 429:671-675.
- Vitko I., Bidaud I., Arias J.M., Mezghrani A., Lory P. y Perez-Reyes E.** 2007 The I-II Loop Controls Plasma Membrane Expression and Gating of Cav3.2 T-Type Ca²⁺ Channels: A Paradigm for Childhood Absence Epilepsy Mutations. *Journal of Neuroscience*. 27 (2), 322-330.
- Walker D., Bichet D., Campbell K.P., y De Waard M.** 1998. A beta(4) isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha(1A) subunit. *J Biol Chem* 273(4):2361–7.
- Weaver E.M., Zamora F.J., Pupilampu-Dove Y.A., Kiessu E., Hearne J.L. y Martin-Caraballo M.** 2015. Regulation of T-type calcium channel expression by sodium butyrate in prostate cancer cells. *Eur J Pharmacol* 749: 20-31.

- Weiss N, Hameed S, Fernandez-Fernandez JM, Fablet K, Karmazinova M, Poillot C, Proft J, Chen L, Bidaud I, Monteil A, Huc-Brandt S, Lacinova L, Lory P, Zamponi GW, y De Waard M**, 2012. A Ca_v3.2/syntaxin-1A signaling complex controls T-type channel activity and low-threshold exocytosis. *J Biol Chem* 287:2810–8.
- Weiss N y Zamponi GW**. 2019. Genetic T-type calcium channelopathies. *J Med Genet*. doi:10.1136/jmedgenet-2019-106163.
- Weill C.L., McNamee M.G. y Karlin A**. 1974. Affinity-labeling of purified acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochem Biophys Res Commun* 61:997-1003.
- Welsby PJ, Wang H, Wolfe JT, Colbran RJ, Johnson ML, y Barrett PQ**. 2003. A Mechanism for the Direct Regulation of T-Type Calcium Channels by Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase II. *J. Neurosci.* 23:10116–21.
- Wolfe JT, Wang H, Howard J, Garrison JC, y Barrett PQ**. 2003. T-type calcium channel regulation by specific G-protein $\beta\gamma$ subunits. *Nature* 424:209–13.
- Yang S.N. y Berggren P.O**. 2005. β -Cell Ca_v channel regulation in physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E16–E28.
- Yasuda T., Chen L., Barr W., McRory J.E., Lewis R.J., Adams D.J. y Zamponi G.W.** 2004. Auxiliary subunit regulation of high-voltage activated calcium channels expressed in mammalian cells. *Eur J Neurosci* 20(1):1–13.
- Yu H.J., Seo J.B., Jung S.R., Koh D.S. y Hille B**. 2015. Noradrenaline upregulates T-type calcium channels in rat pinealocytes. *J Physiol-London* 593(4):887–904.
- Zakon HH**. 2012. Adaptive evolution of voltage-gated sodium channels: the first 800 million years. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109 Suppl 1:10619-25.
- Zamponi G.W., Bourinet E., Nelson D., Nargeot J. y Snutch T.P**. 1997. Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel α_1 subunit. *Nature*. 385 (6615): 442-6.
- Zeug A., Woehler A., Neher E., Ponimaskin E.G.** 2012. Quantitative intensity-based FRET approaches--a comparative snapshot. *Biophys J* 103(9):1821-7.
- Zhang Y**. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9 (40).
- Zhang Y. y Skolnick J**. 2004. Scoring Function for Automated Assessment of Protein Structure Template Quality. *Proteins* 57:702–710.
- Zhang Y., Jiang X.H., Snutch T.P. y Tao J**. 2013. Modulation of low-voltage-activated T-type Ca²⁺ channels. *Biochim Biophys Acta.* 1828(7):1550–9.