



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

PAPEL DEL TRIPTÓFANO DE LA REGIÓN AID DE  
LOS CANALES DE CALCIO HVA EN LA  
MODULACIÓN DEL CANAL DE CALCIO ALFA 1G  
POR SUBUNIDADES BETA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ROGELIO ARTEAGA TLECUITL

TUTOR: DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ



2007



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente.

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**"Papel del triptófano de la región AID de los canales de calcio HVA en la modulación del canal de calcio alfa 1G por subunidades beta"**

realizado por **Arteaga Tlecuitl Rogelio**, con número de cuenta **099014135**, quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dra.	Tamara Rosenbaum Emir	
Propietario	Dra.	Clara Esquivel Huesca	
Tutor(a) Propietario	Dr.	Juan Carlos Gómora Martínez	
Suplente	Fís.	David Velázquez Portilla	
Suplente	Biól.	Armando Muñoz Comonfort	

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Univeritaria, D. F., a 10 de abril del 2007  
COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA



Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

## Hoja de Datos del Jurado

### 1. Datos del alumno

Arteaga

Tlecuitl

Rogelio

56022894

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

099014135

### 2. Datos del tutor

Dr.

Juan Carlos

Gómora

Martínez

### 3. Datos del sinodal 1

Dra.

Tamara

Rosenbaum

Emir

### 4. Datos del sinodal 2

Dra.

Clara

Esquivel

Huesca

### 5. Datos del sinodal 3

Fís.

David

Velázquez

Portilla

### 6. Datos del sinodal 4

Biól.

Armando

Muñoz

Comonfort

### 7. Datos del trabajo escrito

Papel del triptófano de la región AID de los canales de calcio HVA en la modulación del canal de calcio alfa 1G por subunidades beta

83 p.

2007

## DEDICATORIA

Gracias a mis padres Alejandro y Eloisa y a mi hermano Roberto, ya que con su ejemplo y apoyo me he formado como persona y por darme la oportunidad de instruirme como biólogo.

Gracias a Alejandra por impulsarme y estar conmigo todo este tiempo.

*A las aves, alas; a los peces, aletas; a los hombres que  
viven en la Naturaleza,  
el conocimiento de la Naturaleza: esas son sus alas.*

José Martí. La América, New York, septiembre de 1883

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez por su invaluable apoyo académico en este trabajo y por infundir en mí la difícil visión crítica que debe tener un científico.

Doy las gracias a la Dra. Dulce María del Carmen Delgadillo Álvarez por su importante ayuda técnica y académica en la realización de mi trabajo.

Agradezco a los revisores de mi tesis por sus sugerencias y comentarios para enriquecer con ello el trabajo escrito, Dra. Tamara Rosenbaum Emir, Dra. Clara Esquivel Huesca, Fís. David Velázquez Portilla y Biól. Armando Muñoz Comonfort.

Muchas gracias a todos mis compañeros de laboratorio.

## PRESENTACIÓN

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, con el apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Algunos de los resultados del presente trabajo de investigación se presentaron en el siguiente congreso:

**Arteaga-Tlecuil R, Arias-Olguín I, Delgadillo DM, Gómora JC.**

Papel del triptófano de la región AID de los canales de calcio HVA en la modulación del canal  $Ca_v3.1$  por subunidades beta.

XLIX Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Querétaro del 4 al 8 de septiembre de 2006.

## CONTENIDO

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	5
1. Canales iónicos .....	5
2. Canales de Ca <sup>2+</sup> dependientes de voltaje.....	8
2.1. Clasificación de los CCDV .....	9
2.2 Propiedades moleculares de los canales de calcio.....	12
2.2.1. Subunidad $\alpha_1$ .....	12
2.2.2. Subunidades $\beta$ .....	14
2.2.2.1. AID .....	16
2.2.3. Subunidades $\alpha_2\delta$ .....	18
2.2.4. Subunidades $\gamma$ .....	20
2.2.5. Canales LVA y subunidades auxiliares.....	20
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	25
A. Hipótesis de trabajo.....	25
B. Objetivo General .....	25
C. Objetivos Específicos.....	25
V. MÉTODOS .....	26
1. Construcción de la mutante Y514W .....	26
1.1. Generación del fragmento mutante.....	26
1.2. Clonación del fragmento mutante en el vector de secuenciación y en el plásmido $\alpha_{1G}$ -pcDNA3 .....	29
1.3. Alineamiento de secuencias.....	29
2. Cultivo celular y transfección de células HEK-293.....	30
3. Electrofisiología .....	32
3.1. Experimentos de patch clamp.....	32



3.2. Soluciones de registro.....	36
3.3. Análisis de datos .....	36
VI. RESULTADOS.....	39
1. Construcción de la mutante Y514W .....	39
1.1. Liberación del inserto $\alpha_{1G}$ del vector pcDNA3 .....	40
1.2. Sustitución de la tirosina localizada en la posición 514 de $\alpha_{1G}$ por triptófano .....	41
1.3. Análisis molecular del fragmento mutante .....	43
2. Electrofisiología .....	45
2.1. Caracterización de la corriente de $Ca^{2+}$ generada por la mutante Y514W.....	46
2.1.1. Relación corriente-voltaje .....	46
2.1.2. Curva conductancia-voltaje de los canales $\alpha_{1G}$ y Y514W .....	48
2.1.3. Cinética de las corrientes generadas por los canales $\alpha_{1G}$ y Y514W .....	55
2.1.3.1. Activación e inactivación .....	55
2.1.3.2. Desactivación .....	57
2.1.4. Inactivación en estado estacionario de $\alpha_{1G}$ y Y514W.....	60
2.1.5. Recuperación de la inactivación de $\alpha_{1G}$ y Y514W .....	61
2.2. Efecto de las subunidades $\beta$ sobre las propiedades biofísicas de los canales $\alpha_{1G}$ .....	63
VII. DISCUSIÓN .....	71
1. La subunidad $\alpha_{1G}$ silvestre no es regulada por las subunidades $\beta$ .....	72
2. Las propiedades biofísicas del canal $\alpha_{1G}$ no se modifican por la sustitución de la Tyr por el Trp.....	72
3. La mutante Y514W no es regulada por subunidades $\beta$ .....	73
4. Papel de la estructura del asa I - II en la regulación de la subunidad $\alpha_1$ por las subunidades $\beta$ .....	75
VIII. CONCLUSIONES .....	78
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	79

## I. RESUMEN

Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) son una ruta clave para el influjo selectivo de  $\text{Ca}^{2+}$  a las células, en las que desempeña varios procesos celulares. Los CCDV se dividen en dos familias: canales de bajo umbral de activación o LVA y canales de alto umbral de activación o HVA. La composición molecular de los CCDV difiere entre ambas familias. Mientras los canales LVA parecen consistir únicamente de la subunidad  $\alpha_1$ , los HVA contienen además varias subunidades accesorias, como la  $\beta$ , la  $\alpha_2\delta$  y la  $\gamma$ . La función de estas subunidades accesorias es regular el funcionamiento de la subunidad  $\alpha_1$ . En los dos grupos de canales la subunidad  $\alpha_1$  está formada por cuatro dominios repetidos unidos por asas intracelulares. Cada dominio está integrado por seis segmentos transmembranales. En los canales HVA, el asa intracelular que une a los dominios I y II de la subunidad  $\alpha_1$  contiene una región mediante la cual interactúa con la subunidad  $\beta$  (llamada dominio de interacción de la subunidad alfa), mejor conocida como región AID (*Alpha Interaction Domain*). Tal dominio consiste de una secuencia de 18 aminoácidos, de los cuales 9 están altamente conservados en todos los canales HVA. Se ha demostrado que tres de estos aminoácidos, tirosina (Tyr), triptófano (Trp) e isoleucina (Ile), son indispensables para que la subunidad  $\beta$  interactúe con la subunidad  $\alpha_1$  y ejerza su función de regulación. Estudios más recientes indican que el triptófano es un elemento crucial para que se lleve a cabo esta interacción. Los canales LVA no presentan la región AID tal como se presenta en los canales HVA, por lo que se ha propuesto que las subunidades  $\alpha_1$  de esta familia no interactúan con las subunidades  $\beta$ . No obstante, se ha descrito una región homóloga al AID de los canales HVA en la que se conservan los residuos de Tyr e Ile, mientras que en la posición correspondiente al Trp se encuentra una tirosina o histidina en su lugar. Experimentos previos de expresión en sistemas

heterólogos han mostrado que los canales LVA clonados no son regulados por las subunidades  $\beta$  tal como sucede con las subunidades  $\alpha_1$  de los canales HVA.

Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo consistió en investigar si la sustitución de la tirosina por el triptófano faltante en  $\alpha_{1G}$ , un canal LVA, es suficiente para inducir la modulación de este canal por las subunidades  $\beta$  de los canales HVA. La mutación de la Tyr en la posición 514 por el Trp en la secuencia del canal  $\alpha_{1G}$  se realizó con la técnica de PCR en dos reacciones secuenciales generando así al canal mutante Y514W. La identidad molecular de Y514W, así como la ausencia de mutaciones no deseadas se constató mediante secuenciación automática. La expresión funcional de  $\alpha_{1G}$  y de Y514W se investigó en la línea celular de mamífero HEK-293 en presencia y ausencia de las subunidades  $\beta_{1a}$ ,  $\beta_{2a}$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_4$ , mediante la técnica de patch clamp (fijación de voltaje en microáreas de membrana) en la configuración de célula completa. En ambos canales se estudiaron las siguientes propiedades biofísicas: densidad de corriente, relación corriente-voltaje, inactivación en el estado estacionario, recuperación de la inactivación y cinética de la corriente. Los resultados obtenidos indican que la mutación *per se* no modifica ninguna de estas propiedades. Además, los experimentos electrofisiológicos realizados en ausencia y presencia de las subunidades  $\beta$  mencionadas, mostraron que las propiedades biofísicas de la mutante Y514W fueron estadísticamente iguales en ambas condiciones. La subunidad  $\beta_3$  fue la única que modificó de manera significativa las propiedades biofísicas del canal mutante, pues debido a su presencia, los canales Y514W se activaron a voltajes más negativos (4.3 mV más negativos). En conclusión, la sustitución de la tirosina por el triptófano en la posición 514 del canal  $\alpha_{1G}$ , no es suficiente para conferirle a éste la modulación por subunidades  $\beta$ .

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ABP:** Sitio de interacción de la subunidad  $\beta$  (*AID-Binding Pocket*).

**ADC:** Convertidor analógico-digital de la interfase.

**AID:** Dominio de interacción de la subunidad  $\alpha_1$  (*Alpha Interaction Domain*).

**Cas:** *Primer* candado antisentido.

**cDNA:** DNA complementario.

**CHO:** Línea celular del ovario del Hamster Chino (*Chinese Hamster Ovary cells*).

**C<sub>m</sub>:** Capacitancia membranal.

**COS-7:** Línea celular formada a partir de células transformadas de fibroblastos del mono verde africano (*Transformed African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells*).

**Cs:** *Primer* candado sentido.

**CyCa $\alpha_1$ :** subunidad  $\alpha_1$  del canal de calcio de la medusa *Cyanea capillata*.

**DAC:** Convertidor digital-analógico de la interfase.

**DHP:** Dihidropiridinas.

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.

**dNTP's:** Desoxinucleótidos trifosfatados.

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético.

**EGTA:** Ácido etilenglicoltetraacético.

**GFP:** Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*).

**G<sub>max</sub>:** conductancia máxima.

**G-V:** Curva conductancia-voltaje.

**HEK-293:** Línea celular inmortalizada a partir de células embrionarias de riñón humano (*Human Embryonic Kidney*).

**HEPES:** (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*).

**HP:** Potencial de mantenimiento.

**HVA:** Canales de calcio de alto umbral de activación (*High-Voltage Activated*).

**I<sub>Ca</sub>:** Corriente de calcio.

**IIV:** Relación corriente-voltaje instantánea.

**I<sub>m</sub>:** Corriente membranal.

**I-V:** Relación corriente-voltaje.

**LVA:** Canales de calcio de bajo umbral de activación (*Low-Voltage Activated*).

**Mas:** *Primer* mutante antisentido.

**mRNA:** RNA mensajero.

**Ms:** *Primer* mutante sentido.

**NG108-15:** Línea celular formada por la fusión de líneas celulares de neuroblastoma de ratón y de glioma de rata.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*).

**$R_s$ :** Resistencia en serie

**SOPMA:** Predicción de estructura secundaria de proteínas con base en alineamientos múltiples.

**$\tau_{act}$ :** Constante de tiempo de activación.

**$\tau_{inact}$ :** Constante de tiempo de inactivación.

**$\tau_{desact}$ :** Constante de tiempo de desactivación.

**$\tau_h$ :** Constante de tiempo de recuperación de la inactivación.

**TBE:** Solución amortiguadora del pH que contiene Tris base, ácido bórico, EDTA.

**TEA:** Tetraetilamonio.

**TOPO-617:** Fragmento mutante clonado en el vector pCR® 4Blunt-TOPO.

**$V_{1/2}$ :** Voltaje al cual se activa o inactiva el 50% de los canales.

**$V_c$ :** Pulsos comando.

**$V_m$ :** Potencial de membrana.

**$V_{inv}$ :** Potencial de inversión.

**Y514W:** Canal mutante en el que se sustituyó la tirosina 514 por triptófano.

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Canales iónicos

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 ( $\text{Na}^+$ ), el potasio ( $\text{K}^+$ ), el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y el cloruro ( $\text{Cl}^-$ ). 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 alguno de los iones mencionados arriba (Hille, 2001).

La importancia de los iones en la excitabilidad celular se conoce desde finales del siglo XIX cuando Sidney Ringer mostró que el corazón de rana podía seguir latiendo si se mantenía en una solución salina con sodio, potasio y calcio, mezclados en una proporción definida. Posteriormente, en 1888 Walter Nernst generó potenciales eléctricos a partir de la difusión de electrolitos, lo cual inició la especulación acerca del origen iónico de los potenciales bioeléctricos. Él propuso que el interior celular tenía que ser más electronegativo que el medio que rodea a la célula, ya que durante el metabolismo celular se producían ácidos y los protones resultantes podían difundir fuera de la célula más fácilmente que los aniones orgánicos que son más voluminosos. Más tarde, en la primera década del siglo XX, Julius Bernstein propuso que la membrana de las células excitables presentaba cierto grado de permeabilidad al potasio durante el reposo y que ésta se hacía más permeable a otros iones durante la excitación (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 ó moléculas acarreadores

(como ellos los denominaron originalmente; Hodgkin & Huxley, 1952a), permiten el flujo pasivo de los iones a favor de su gradiente de concentración química y de la facilidad con la que los iones pueden pasar a su través, es decir, de la permeabilidad iónica de la membrana, pero al estar cargados eléctricamente, los iones también atraviesan la membrana a favor de su gradiente 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 (Agnew et al., 1978; Henderson & Wang, 1972; Raftery et al., 1980; Weill et al., 1974). Posteriormente, con la aplicación de técnicas de biología molecular y más recientemente, de cristalografía, obtuvo información más clara y definida de la estructura de los canales iónicos (para una historia amena sobre este tópico véase 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, la unión de neurotransmisores o el 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 menos negativo) 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 inactivo 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) Son capaces de discriminar qué iones pasan a su través, es decir, que presentan *selectividad iónica*. En el caso particular de los canales de  $K^+$ , éstos son, al menos, 10,000 veces más permeables al  $K^+$  que al  $Na^+$  (Hille, 2001). En general, el poro de los canales dependientes de 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 & Petris, 1989; Hille, 2001).



Los canales iónicos están involucrados en una multiplicidad de procesos fisiológicos que incluyen el mantenimiento del potencial de membrana, la regulación de la excitabilidad eléctrica, la contracción muscular, la secreción de hormonas y neurotransmisores, y la expresión génica (Hille, 2001). Estudios electrofisiológicos, bioquímicos y de biología molecular han demostrado la existencia de una amplia variedad de canales iónicos, que pueden ser distinguidos con base a su selectividad iónica, dependencia al voltaje, conductancia iónica, inactivación y sensibilidad a agentes bloqueadores, así como por el gen que los codifica.

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 utilizaremos el término “canales dependientes de voltaje” para referirnos a los canales activados por cambios en el  $V_m$ . Debido a las similitudes que los caracterizan y que comparten entre ellos, los canales dependientes de voltaje se integran en una superfamilia conformada por los canales de  $\text{Na}^+$ , de  $\text{Ca}^{2+}$  y de  $\text{K}^+$  (Catterall, 1988; Hille, 2001; Jan & Jan, 1990).

## **2. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltaje**

El influjo de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) es crucial para varias funciones celulares incluyendo excitabilidad neuronal, contracción muscular, secreción de hormonas y neurotransmisores, diferenciación celular, y expresión génica (Bootman et al., 2001; Hille, 2001). Además del papel canónico de estos canales en la generación de señales eléctricas para la comunicación intercelular, sus funciones también son importantes en células consideradas tradicionalmente como no-excitables (p. ej., espermatozoides). La importancia de estos canales se

ejemplifica también por el uso en la clínica de los llamados “bloqueadores de canales de calcio”, fármacos que se utilizan desde hace varias décadas en el tratamiento de enfermedades como la hipertensión (Mitterdorfer et al., 1998). Más recientemente, también se han empleado en el tratamiento del dolor y algunas tipos de epilepsia (Gomora et al., 2001; Kim et al., 2001; McGivern, 2006; Prommer, 2006; Todorovic et al., 2001; Todorovic et al., 2002). Por tales razones, los CCDV han sido objeto de diversos estudios científicos a nivel básico y clínico. Sin embargo, la mayor parte de las investigaciones se han limitado a los canales de calcio de alto umbral de activación o HVA, y sólo en los últimos 8 años, los otros miembros de la familia de CCDV, es decir, los canales de bajo umbral o LVA (también llamados tipo T) han sido objetos de tales esfuerzos. La clonación de tres subunidades  $\alpha_1$  que expresan corrientes de calcio tipo T (Cribbs et al., 1998; Gomora et al., 2002; Perez-Reyes, 2003), ha promovido significativamente la investigación acerca de estos canales. No obstante, aspectos críticos de sus propiedades biofísicas y farmacológicas, de la relación entre la estructura y su función, de los diferentes tipos de regulación de que son sujetos, entre otros varios tópicos, no han sido estudiados lo suficiente. Por estas razones, la meta general del presente trabajo de tesis es avanzar en el conocimiento de los canales tipo T, concretamente en la posible regulación de éstos por las subunidades  $\beta$  de los canales HVA.

## **2.1. Clasificación de los CCDV**

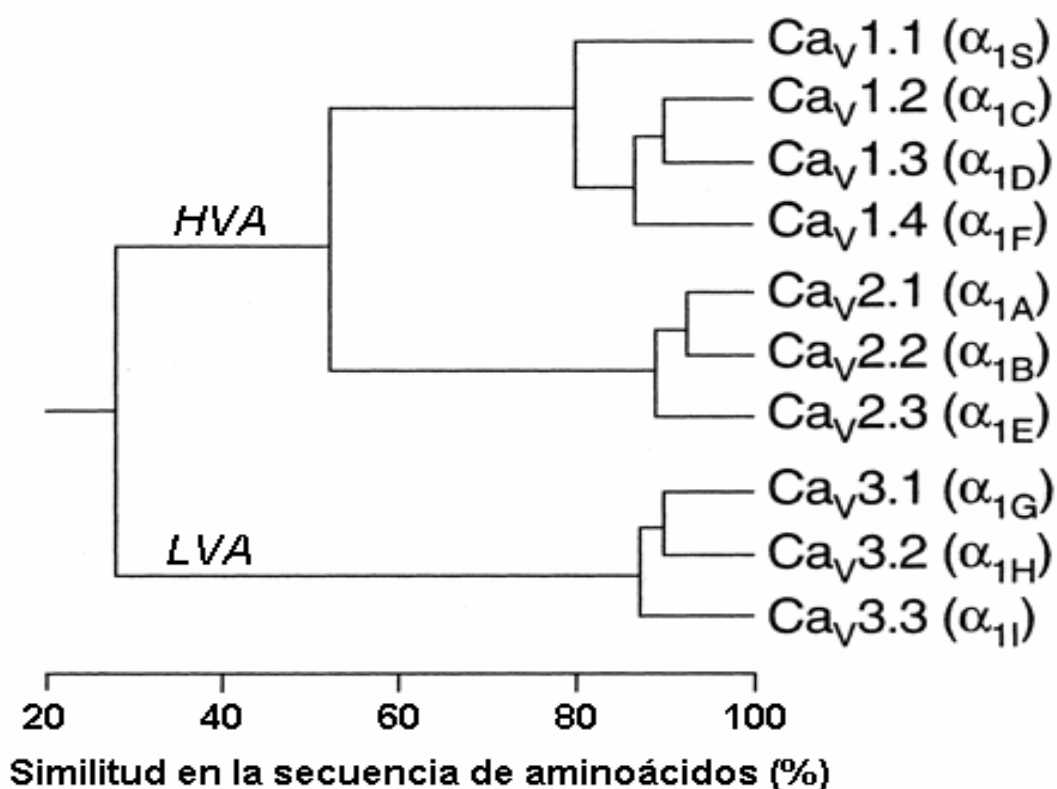
La primera clasificación de los CCDV tomó en consideración el voltaje que se requiere para activarlos. De acuerdo a los estudios electrofisiológicos realizados en la década de 1980-1990, se logró identificar dos grandes clases de canales de calcio, los de bajo umbral de activación ó LVA y los de alto umbral ó HVA (Bean, 1989; Carbone & Lux, 1984; Matteson & Armstrong, 1986). Los canales LVA se activan a potenciales de membrana cercanos a -60 mV, mientras que los canales de la familia 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; Matteson & Armstrong, 1986; Nowycky et al., 1985).

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  $\alpha_1$  de CCDV. Siete de tales subunidades generan corrientes tipo HVA (Tsien et al., 1995), mientras que los restantes tres genes codifican para subunidades  $\alpha_1$  que dan origen a corrientes tipo LVA (Perez-Reyes, 2003). La correspondencia entre subunidad  $\alpha_1$  y tipo de CCDV, así como su más reciente nomenclatura se presenta en la Fig. 1. Como se puede concluir a partir de la información de dicha figura, existen diferentes nomenclaturas para categorizar un mismo tipo de CCDV. Con la idea de unificar criterios para la clasificación de los canales de calcio, recientemente se designó una nomenclatura ya utilizada previamente en otras familias de canales dependientes de voltaje (Ertel et al., 2000; Goldin et al., 2000; Jan & Jan, 1990). El primer término de la nomenclatura se refiere al ión permeante ( $\text{Ca}^{2+}$ , 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  $Ca_v3.2$  identifica al canal de calcio dependiente de voltaje tipo T, codificado por la subunidad  $\alpha_{1H}$ . En el presente escrito, se empleará principalmente la clasificación basada en las subunidades  $\alpha_1$ , aunque para hacer referencia a la subfamilia de canales LVA se usará también el término de canales tipo T.



**Figura 1. Filogenia de las subunidades  $\alpha_1$  de los CCDV.** La comparación de las secuencias se basó en los aminoácidos de los segmentos transmembranales y del poro (aproximadamente 350 aa). Este 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).

Los canales HVA se subdividen en canales  $Ca_v1$ , que se caracterizan por ser sensibles a las dihidropiridinas (DHP, fármacos empleados en la clínica como antihipertensivos) y abarcan las subunidades  $\alpha_{1S}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$  y  $\alpha_{1F}$ . Estas subunidades generan corrientes tipo L cuando se expresan en sistemas heterólogos (ovocitos de rana o células de mamífero, por ejemplo). La segunda subfamilia de canales HVA, los  $Ca_v2$ , esta compuesta por las subunidades  $\alpha_{1A}$  (canales tipo P/Q),  $\alpha_{1B}$  (canales tipo N), y  $\alpha_{1E}$  (canales tipo R), mismos que se agrupan como canales tipo No L, debido a que son poco sensibles a las DHP. En cambio, éstos son bloqueados de manera selectiva por toxinas específicas de caracoles marinos y arañas (Doering & Zamponi, 2003). Por su parte, la subfamilia de canales LVA ( $Ca_v3$ ) consiste de las subunidades  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  y  $\alpha_{1I}$  (Perez-Reyes, 2003), mismas que fueron clonadas más recientemente y, por lo tanto, el conocimiento acerca de este tipo de canales es apenas incipiente.

## 2.2 Propiedades moleculares de los canales de calcio

Los canales de calcio son complejos de proteínas formados por 4 ó 5 subunidades, codificadas por múltiples genes que llevan los nombres genéricos de  $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$ , y  $\gamma$ . A continuación se describen algunas de sus características relevantes para el presente estudio.

### 2.2.1. Subunidad $\alpha_1$

La subunidad  $\alpha_1$  forma el poro hidrofílico que permite el flujo de iones y contiene regiones especializadas que determinan la selectividad del canal y su sensibilidad al voltaje (sensor de voltaje). De acuerdo con modelos de la estructura secundaria y terciaria de la subunidad  $\alpha_1$  de los CCDV, estas proteínas son cadenas de aminoácidos (aa) que forman cuatro dominios homólogos (numerados del I al IV), unidos entre sí por asas intracelulares. Cada dominio contiene seis segmentos transmembranales llamados S1 a S6 (partiendo del amino hacia el carboxilo terminal) e

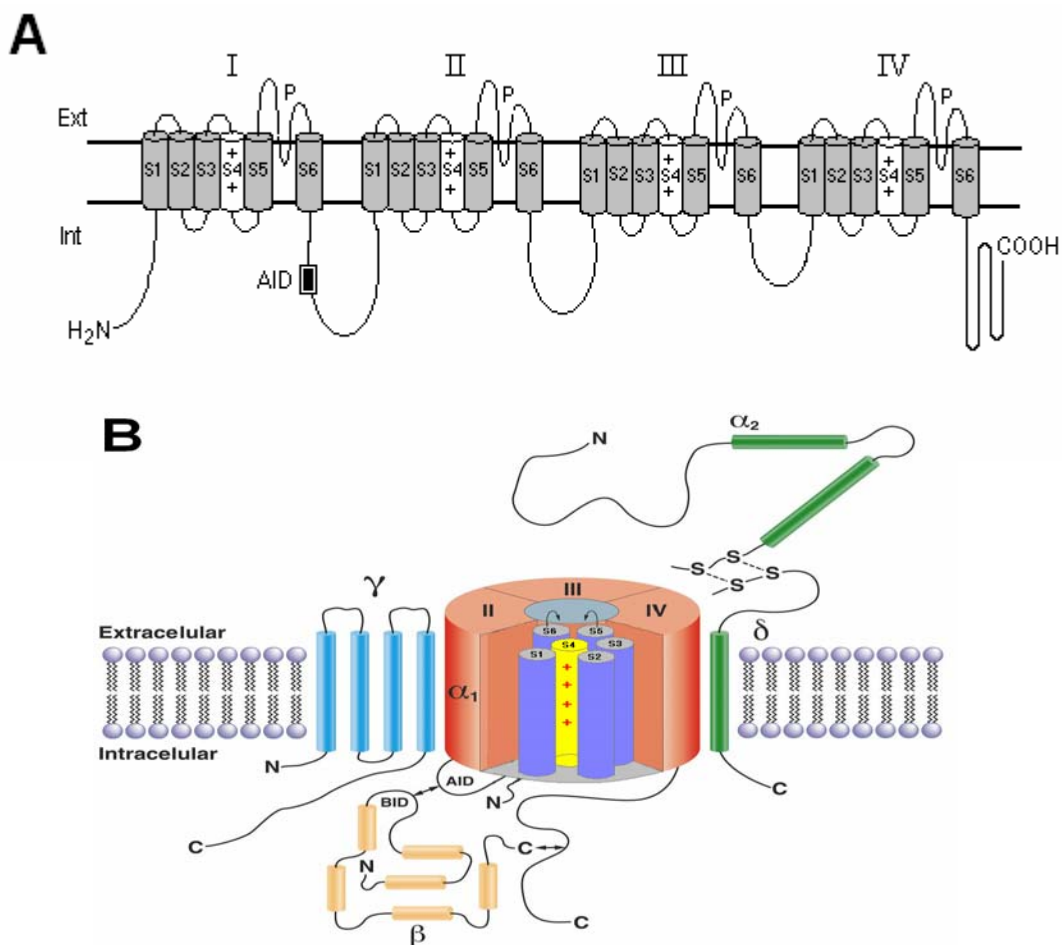
interconectados por asas intra y extracelulares (Fig. 2A). Los segmentos S5 y S6 se encuentran unidos por una secuencia de aminoácidos que forman un asa que se invagina parcialmente en la membrana, y que se conoce como el asa del poro. Estudios recientes utilizando cristalografía de rayos X para determinar la estructura molecular de canales de  $K^+$ , cuya subunidad  $\alpha$  también contiene el sensor de voltaje (S4) y comparte muchas similitudes con la de los canales de calcio y de sodio, indican que el extremo intracelular del poro está delineado por los segmentos S5 y S6, y el extremo opuesto (extracelular) está revestido por las asas del poro de cada dominio (Jiang et al., 2003b; Jiang et al., 2003a). Debido a la similitud entre las tres superfamilias de canales dependientes de voltaje, es probable que dichas observaciones en canales de  $K^+$  se puedan encontrar también en los canales de  $Ca^{2+}$ . En este sentido, existe todo un conjunto de evidencias experimentales que indican que en los CCDV las asas del poro forman el vestíbulo externo del canal y el filtro de selectividad, por lo que su secuencia de aminoácidos es un factor determinante de la conductancia, la selectividad iónica del canal y de su afinidad por diversas toxinas que modifican la actividad de la subunidad  $\alpha_1$  (para una revisión véase Catterall, 2000).

En los canales HVA la selectividad del poro está determinada por un anillo de cargas negativas formado por residuos de ácido glutámico (EEEE) en posiciones similares en cada una de las cuatro asas del poro (Yang et al., 1993). Los cuatro glutamatos forman un sitio único de alta afinidad para los iones  $Ca^{2+}$  ( $K_d \sim 0.7 \mu M$ ), de tal manera que a la concentración extracelular fisiológica ( $\sim 2 mM$ ), el sitio siempre se encuentra ocupado por el ion  $Ca^{2+}$  (revisado en Sather & McCleskey, 2003). La sustitución de cualquiera de los residuos de glutamato por una lisina (que tiene carga positiva) provoca que el canal pierda la selectividad por  $Ca^{2+}$  y permite entonces también el flujo de  $Na^+$ . Es importante mencionar que en las subunidades  $\alpha_1$  de los canales LVA, dos glutamatos están remplazados por aspartatos, que aunque también tienen carga negativa (Perez-Reyes, 2003), podrían significar cambios en las propiedades de permeación de los canales.

Por otro lado, el análisis de las secuencias de las proteínas que codifican las subunidades  $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$  y  $\alpha_{1I}$  revelan poca similitud con respecto a la subunidad  $\alpha_1$  de los canales HVA (Fig. 1). La subunidad  $\alpha_1$  de los canales LVA es una proteína de aproximadamente 2000 residuos de aminoácidos, y su distribución transmembranal que presenta es muy parecida a la subunidad  $\alpha_1$  de los canales de calcio HVA y de  $\text{Na}^+$  (Noda & Numa, 1987; Tanabe et al., 1987). No obstante, una diferencia digna de hacer notar entre los canales LVA y HVA, es que al parecer los primeros sólo están constituidos por la subunidad  $\alpha_1$ , mientras que los segundos, requieren de diferentes subunidades accesorias (Fig. 2) para generar corrientes similares a las observadas en preparaciones nativas (Arikkath & Campbell, 2003). De hecho, un aspecto todavía muy controversial es la posible modulación de canales tipo T por las subunidades  $\beta$  de los canales HVA (Dolphin et al., 1999; Dubel et al., 2004; Lambert et al., 1997; Leuranguer et al., 1998).

### 2.2.2. Subunidades $\beta$

La clonación de los canales de calcio inició con la purificación y secuenciación del receptor a DHP del músculo esquelético hace ya casi 20 años (Takahashi et al., 1987). Mediante el análisis bioquímico se logró conocer la composición del canal de calcio, el cual además de la subunidad principal ( $\alpha_1$ ), incluía otras proteínas de menor tamaño, a las que se les asignó el nombre de subunidades  $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$ , y  $\gamma$  y que, en su conjunto, se denominan subunidades accesorias. La subunidad  $\beta$ , de aproximadamente 55 kDa, es una proteína citoplásmica que consiste de varias  $\alpha$  hélices (Fig.2B). Esta subunidad es la que más ha sido estudiada en cuanto a los efectos de modulación que ejerce sobre la subunidad  $\alpha_1$ . Se conocen cuatro diferentes genes ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_4$ ) con varias isoformas adicionales generadas por procesamiento alternativo del RNA mensajero (mRNA). Sus efectos son mediados por la interacción con la región AID (del inglés *Alpha Interaction Domain*) de la subunidad  $\alpha_1$  (Fig. 2). La subunidad  $\beta$  regula diferentes propiedades de la



**Figura 2. Topología de los CCDV.** **A)** Representación esquemática de la estructura primaria de las subunidades  $\alpha_1$  de los canales de calcio. Los canales de calcio LVA y HVA se componen de una proteína de ~270 kDa (subunidad  $\alpha_1$ ) la cual consiste de cuatro dominios (I al IV), cada uno de los cuales contiene seis regiones transmembranales (S1 a S6) y una asa del poro (P). El segmento S4 se caracteriza por poseer varios aminoácidos con carga positiva, razón por la cual se ha propuesto que cumple con la función de detectar los cambios en el voltaje transmembranal. La región AID se muestra como un rectángulo en negro ubicado en el asa que une a los dominios I y II. **B)** Topología propuesta para el patrón de ensamblaje de un canal HVA. Se muestra el probable arreglo de las diferentes subunidades accesorias ( $\beta$ ,  $\alpha_2\delta$ ,  $\gamma$ ) en relación con la subunidad principal ( $\alpha_1$ ). El poro central se forma por el plegamiento de los cuatro dominios que conforman la subunidad  $\alpha_1$ . En este esquema el sensor de voltaje (S4) se presenta aislado del ambiente lipídico de la membrana por el resto de la proteína de la subunidad  $\alpha_1$ . Las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$  interactúan en un sitio denominado AID en el asa que une los dominios I y II de la subunidad  $\alpha_1$  (Modificado de Randall & Benham, 1999).



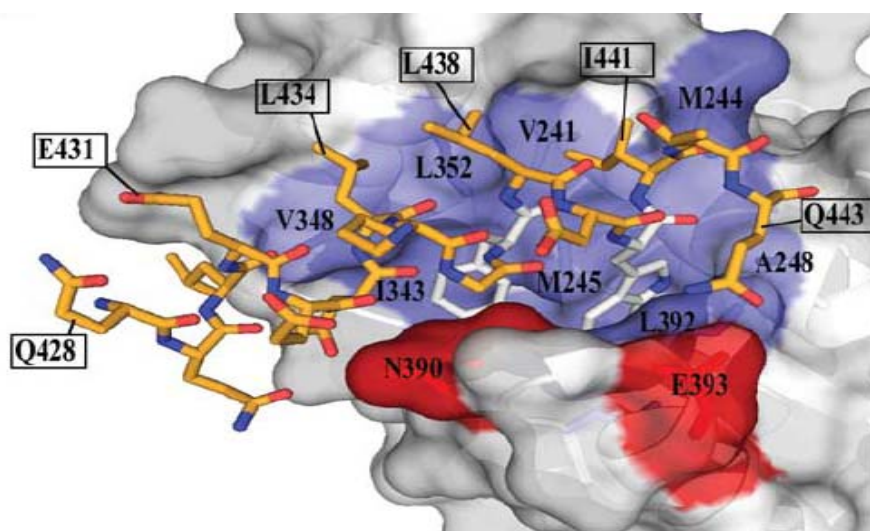
subunidad  $\alpha_1$  que incluyen el tráfico de ésta hacia la membrana celular, cambios en la dependencia al voltaje de la activación y la inactivación, modificaciones significativas en la tasa de inactivación de las corrientes y cambios en la sensibilidad a fármacos que modulan la actividad de la subunidad  $\alpha_1$  (Dolphin, 2003; Hanlon & Wallace, 2002).

### 2.2.2.1. AID

El asa que une a los dominios I y II de la subunidad  $\alpha_1$  contiene una secuencia de aminoácidos que forman la región AID. Esta es la principal región de unión con las subunidades  $\beta$ , la cual se une a su vez a la subunidad  $\alpha_1$  mediante su respectivo sitio de unión, el ABP (del inglés *AID-Binding Pocket*). Estudios bioquímicos revelan que el AID y la subunidad  $\beta$  interactúan con una alta afinidad (6-30 nM) (Dolphin, 2003). La secuencia que conforma la región AID es de 18 aminoácidos, 9 de ellos están altamente conservados en todos los canales HVA. Mediante mutaciones puntuales se ha demostrado que tres de estos aminoácidos, tirosina (Tyr ó Y), triptófano (Trp ó W) e isoleucina (Ile ó I) son indispensables para que se lleve a cabo la interacción y la regulación de la subunidad  $\alpha_1$  por parte de la subunidad  $\beta$  (De Waard *et al.*, 1996). Trabajos más recientes de mutaciones puntuales (Berrou *et al.*, 2002) y cristalografía (Chen *et al.*, 2004; Opatowsky *et al.*, 2004a; Richards *et al.*, 2004; Van Petegem *et al.*, 2004) han demostrado que el Trp es crucial para que se lleve a cabo la interacción mencionada. La idea actual es que dicho Trp es el aminoácido que interactúa con mayor intimidad con la subunidad  $\beta$ , pues sirve como una especie de ancla que mantiene la unión entre ambas subunidades (Fig. 3). Además, se ha observado que con la simple mutación del Trp se elimina la interacción de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$ . Por otro lado, las mutaciones que alteran a los demás aminoácidos ubicados en la región AID resultan sólo en una disminución de la interacción entre la subunidad  $\alpha_1$  y  $\beta$ , lo cual se traduce en la pérdida de regulación de algunas propiedades biofísicas de la subunidad  $\alpha_1$ , demostrando que la región AID es requerida

para que la subunidad  $\beta$  pueda ejercer su función reguladora (De Waard et al., 1996; Pragnell et al., 1994).

Algunos autores han reportado un sitio de interacción secundario entre la subunidad  $\alpha_1$  y  $\beta$ . Tal sitio ha sido ubicado en el extremo carboxilo terminal (también ilustrado en la Fig. 2B), la afinidad es  $\sim 30$  veces menor que la interacción AID-ABP y hasta el momento sólo se ha observado en los canales de la familia Cav2 (Dolphin, 2003; Qin et al., 1996; Walker et al., 1998).



**Figura 3. Esquema de la interacción entre la región AID y el ABP.** Se representa la superficie de la región ABP presente en la subunidad  $\beta_{2a}$  unida a la región AID (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).

Ahora bien, toda la información anterior acerca de la región AID se ha obtenido a partir de estudios con canales HVA, pero ninguno de los canales LVA presenta en su secuencia de aminoácidos (aa) dicha región. Sin embargo, con el alineamiento de las secuencias de todos los CCDV, se ha determinado que existe cierto grado de similitud en la región correspondiente en los canales LVA. De los 9 aa conservados en el AID de los canales HVA, tres de ellos se presentan en

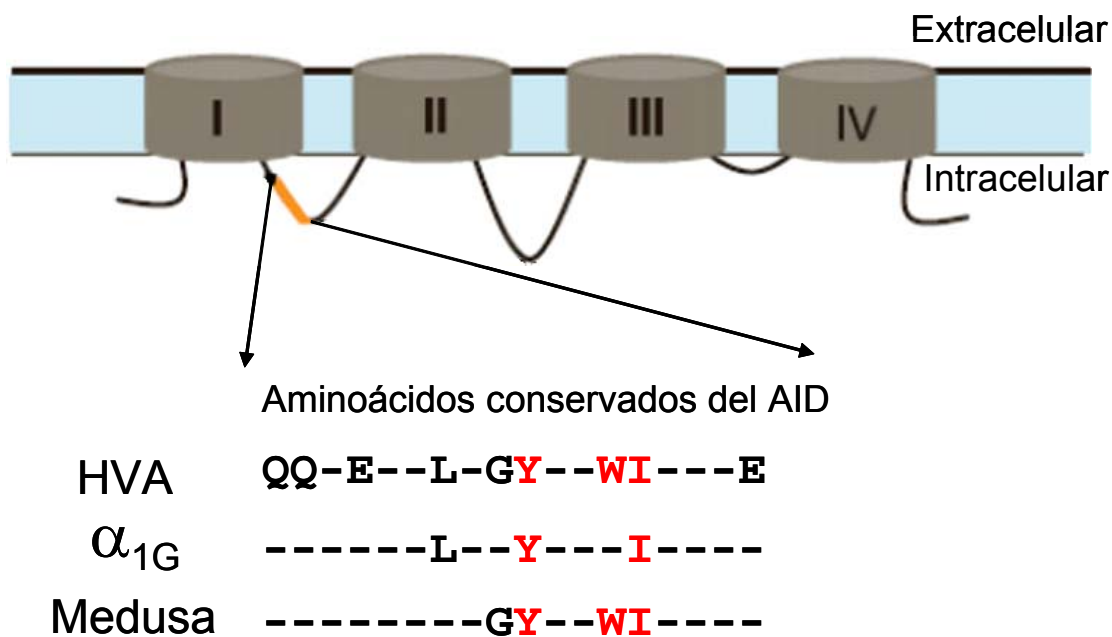
los canales tipo T (Fig. 4). Relevantemente, dos de ellos (Tyr e Ile) son parte del trío de aa requeridos para la interacción con la subunidad  $\beta$  en los canales HVA, aunque el Trp, considerado como crucial para la interacción, está ausente.

Otro dato relevante en este contexto, es que la subunidad  $\alpha_1$  del canal de calcio de la medusa *Cyanea capillata* (CyCa $\alpha_1$ ), cuyo gen ha sido recientemente clonado, presenta características electrofisiológicas similares a los canales tipo L (Jeziorski *et al.*, 1998), aunque su secuencia de aminoácidos del AID presenta una mínima conservación comparada con la de los canales HVA de vertebrados. Curiosamente, éste canal si contiene a los tres aminoácidos necesarios para la interacción con la subunidad  $\beta$  (Tyr, Trp e Ile; Fig. 4). Experimentos de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus*, indican que la CyCa $\alpha_1$  es regulada por subunidades  $\beta$  de la misma medusa o de vertebrados (Jeziorski *et al.*, 1999). Con ello, se reafirma el papel crucial del Trp de la región AID para la interacción y regulación entre las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$ .

### 2.2.3. Subunidades $\alpha_2\delta$

La subunidad auxiliar  $\alpha_2\delta$  es codificada por un sólo gen y consiste en un fragmento extracelular  $\alpha_2$  unido por un puente disulfuro al fragmento transmembranal  $\delta$ , cuya función al parecer es anclar a la proteína a la membrana plasmática (Fig. 2B; Jay *et al.*, 1991). Hasta el momento han sido descritas cuatro subunidades  $\alpha_2\delta$  ( $\alpha_2\delta_1$ - $\alpha_2\delta_4$ ), con diversas isoformas generadas por procesamiento alternativo del mRNA y una amplia distribución en cerebro y tejidos periféricos (Hobom *et al.*, 2000; Klugbauer *et al.*, 2003). El efecto de las subunidades  $\alpha_2\delta$  sobre la actividad de la subunidad  $\alpha_1$  de los canales HVA es más discreto que el de las subunidades  $\beta$ , no obstante su presencia provoca incrementos en la amplitud de la corriente y en el tráfico de la subunidad  $\alpha_1$  hacia la membrana (Arikkath & Campbell, 2003; Klugbauer *et al.*, 2003). También tiene efectos sobre la cinética de activación e inactivación y la dependencia al voltaje de éstos (Gurnett *et al.*,

1996; Klugbauer et al., 1999; Qin et al., 1998). En algunos casos se ha observado que cuando se co-transfectan las subunidades  $\beta$  y  $\alpha_2\delta$  con subunidades  $\alpha_1$  de canales HVA (en particular con los de la subfamilia  $Ca_v2$ ), los cambios inducidos por ambas subunidades accesorias se ven potenciados de manera sinérgica (Yasuda *et al.*, 2004). Así mismo, se ha sugerido que el incremento en la amplitud de la corriente de los canales HVA requiere la porción extracelular  $\alpha_2$  intacta (Gurnett *et al.*, 1996), mientras que la región transmembranal  $\delta$  regula sus propiedades biofísicas (Felix *et al.*, 1997). Además se ha postulado que el sitio de interacción de la subunidad  $\alpha_2\delta$  con  $\alpha_1$  se localiza en el tercer dominio transmembranal (Arikath & Campbell, 2003).



**Figura 4. Región AID de los CCDV.** Esquema de un CCDV con sus 4 dominios unidos por medio de asas intracelulares. En el asa que une los dominios I y II se observa en naranja la región AID, del cual se muestran los 9 aminoácidos conservados en los canales HVA y se comparan con los residuos conservados de un canal de calcio LVA ( $\alpha_{1G}$ ) y un CCDV de una medusa. En rojo se indican los tres aa, Tyr, Trp e Ile (Y, W e I), considerados indispensables para la interacción con la subunidad  $\beta$ . Nótese que de dicho trío de aa, el Trp se encuentra ausente en la subunidad  $\alpha_{1G}$ . Por su parte, la subunidad  $\alpha_1$  de la medusa contiene cuatro aminoácidos conservados, incluyendo los tres indispensables para la interacción (modificado de Chen *et al.* 2004).

#### 2.2.4. Subunidades $\gamma$

Esta subunidad esta formada por cuatro segmentos transmembranales con su extremo amino terminal y carboxilo terminal citoplásmicos (Fig. 2B; Jay et al., 1991). Cuando la subunidad  $\gamma$  se detectó en el complejo proteico de los CCDV del músculo esquelético se pensó que sólo se encontraba en este tejido. Sin embargo, estudios recientes han demostrado su presencia en los CCDV presentes en neuronas. Hasta el momento se han identificado ocho subunidades  $\gamma$ , que con base en la homología de sus secuencias, han sido clasificadas en dos grupos: esqueléticas ( $\gamma 1$  y  $\gamma 6$ ) y neuronales ( $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$ ,  $\gamma 4$ ,  $\gamma 5$ ,  $\gamma 7$  y  $\gamma 8$ ) (Kang & Campbell, 2003).

De acuerdo a estudios funcionales, se sugiere que las subunidades  $\gamma$  regulan la cinética de la corriente, la inactivación en el estado estacionario y la amplitud de la corriente (Eberst et al., 1997; Singer et al., 1991; Wei et al., 1991). El efecto de las subunidades  $\gamma$  en la amplitud de la corriente de los canales HVA al parecer es opuesto a lo que sucede con las subunidades  $\beta$  y  $\alpha 2\delta$ , ya que se ha observado que las subunidades neuronales  $\gamma$  inhiben la amplitud de la corriente (Kang et al., 2001).

#### 2.2.5. Canales LVA y subunidades auxiliares

La posible regulación de los canales LVA por subunidades auxiliares de canales HVA ha sido explorada por varios grupos de investigación, con resultados diversos y contradictorios, pues algunos sugieren que si existe regulación por parte de las subunidades auxiliares (principalmente  $\beta$  y  $\alpha 2\delta$ ), mientras que otros indican lo contrario. Lacerda y cols. (1994) encontraron que, en presencia de las subunidades  $\beta 2$  y  $\beta 4$ , la inactivación de las corrientes tipo T endógenas de ovocitos ocurre más lentamente. Posteriormente, mediante la eliminación de subunidades  $\beta$  con oligonucleótidos antisentido en neuronas y células NG108-15, se demostró una disminución significativa en la actividad de los canales HVA, pero no se afectó significativamente la corriente

LVA (Lambert et al., 1997; Leuranguer et al., 1998). Por otro lado en estas últimas células, Wyatt y cols. (1998) encontraron que las corrientes endógenas tipo T aumentan su amplitud debido a la coexpresión de las subunidades  $\beta 2a$  y  $\alpha 2\delta$ , aunado a un efecto sobre la dependencia al voltaje de activación provocado por esta última subunidad.

Con la clonación de las subunidades  $\alpha 1$  que codifican para canales LVA de humano (Cribbs et al., 1998; Gomora et al., 2002; Perez-Reyes et al., 1998), el estudio de este y otros tópicos acerca de la estructura y función de los canales LVA se ha visto beneficiado sustancialmente. El primer trabajo que empleó estas nuevas herramientas fue el de Lacinova y cols. (1999) quienes concluyeron que la subunidad  $\alpha 2\delta 1$  y  $\alpha 2\delta 3$  no tienen efectos sobre la amplitud de la corriente ni en las propiedades biofísicas de  $\alpha 1G$ , utilizando como sistema de expresión las células HEK-293. Pocos meses después, otro grupo europeo (Dolphin et al., 1999) reportó que la corriente generada por los canales  $\alpha 1G$  aumenta su amplitud (~ en un 100%) al ser co-expresados con las subunidades  $\beta 1b$  y  $\alpha 2\delta$  en células COS-7, aunque no observaron efectos significativos en la dependencia al voltaje ni en la cinética de la corriente generada por  $\alpha 1G$ . Un año más tarde, Hobom y cols. (2000) co-expresaron la subunidad  $\alpha 1G$  junto con  $\alpha 2\delta 2a$  en células HEK-293, observando un incremento en la amplitud de corriente de  $\alpha 1G$ , además de la aceleración de la inactivación y un corrimiento hacia voltajes más positivos de la inactivación en el estado estacionario. Posteriormente, Dubel y cols. (2004) reportaron que la co-expresión de la subunidad  $\beta 1b$  y  $\alpha 2\delta 1$  con las subunidades  $\alpha 1$  de los canales LVA en células CHO y ovocitos de *Xenopus* aumenta al doble la densidad de la corriente, sin modificar sus propiedades biofísicas. Es importante mencionar que en este trabajo se muestran resultados un tanto confusos, pues los experimentos de co-expresión de la subunidad  $\alpha 1G$  con  $\beta 1b$  y  $\alpha 2\delta 1$  los realizan en células CHO, mientras que los de la subunidad  $\alpha 1H$  los llevan a cabo en ovocitos de *Xenopus*; además, nunca presentan datos de los efectos sobre la subunidad  $\alpha 1I$ , no obstante que en sus conclusiones indican que también ésta fue modificada por las

subunidades auxiliares de los canales HVA. Otro trabajo, realizado por el grupo del Dr. Perez-Reyez (Arias et al., 2005), demuestra que ninguna de las cuatro subunidades  $\beta$  regula la amplitud de corriente o las propiedades biofísicas de  $\alpha_{1G}$  cuando son co-expresados en células HEK-293. Finalmente, el trabajo que precede la presente tesis de licenciatura realizado por mi compañero Fernando Higueldo (2007) demostró que la subunidad  $\alpha_{1I}$  tampoco es regulada por las subunidades  $\beta$ .

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir de 1998, cuando el grupo del Dr. Perez-Reyes reportó la clonación de los genes codificantes de los canales LVA ( $\alpha_{1G}$ ,  $\alpha_{1H}$ ,  $\alpha_{1I}$ ) (Cribbs et al., 1998; Gomora et al., 2002; Perez-Reyes et al., 1998), el interés en estos canales recibió un fuerte impulso que se reflejó en un aumento en el número de estudios acerca de sus propiedades biofísicas y su relación entre la estructura molecular y su función. Durante los subsecuentes años se ha generado información nueva y relevante para el entendimiento de la estructura y función de los canales LVA. No obstante, aún persisten múltiples tópicos que no han sido explorados adecuadamente. En este contexto, la secuencia de aminoácidos de las subunidades  $\alpha_1$  de los canales LVA y HVA presentan únicamente un 28% de similitud entre ellas, una de las diferencias más notables es la ausencia de la región AID en los canales LVA. Dicho dominio se encuentra reducido en estos canales a la presencia de tres aa de los nueve altamente conservados en los canales HVA, y ninguno de ellos es el triptófano cuya presencia se ha demostrado ser crucial para la interacción con las subunidades  $\beta$  en los canales HVA (Berrou et al., 2002; Chen et al., 2004; De Waard et al., 1996; Opatowsky et al., 2004b; Opatowsky et al., 2004a; Van Petegem et al., 2004).

Debido a que los canales tipo T fueron clonados *in silicio*, no existen evidencias de subunidades auxiliares para estos canales. Por otro lado, la coexpresión de subunidades  $\alpha_1$  de canales LVA con subunidades  $\beta$  de canales HVA ha proporcionado resultados contradictorios. Algunos autores concluyen que si existe una regulación por parte de las subunidades  $\beta$  (Dolphin et al., 1999; Dubel et al., 2004), pero otros grupos de investigación, incluyendo el nuestro, no han encontrado evidencias de tal regulación (Arias et al., 2005; Higueldo, 2007; Lacinova et al., 1999; Leuranguer et al., 1998).



En consecuencia, con el propósito de profundizar en la posible regulación de los canales LVA por las subunidades  $\beta$  de los canales de alto umbral y con ello generar información adicional acerca de la relación que existe entre la estructura y la función de los canales LVA, en el presente trabajo se investigó el papel que tiene el triptófano faltante en la región similar al AID en los canales LVA sobre la posible regulación de las propiedades biofísicas de la corriente de  $\alpha_{1G}$  por las diferentes subunidades  $\beta$  de los canales HVA.

## IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### A. Hipótesis de trabajo

Los antecedentes indican que la interacción de la subunidad  $\alpha_1$  con la subunidad  $\beta$  en los canales HVA depende de la presencia de tres aminoácidos (Y, W e I), por lo que resulta razonable suponer que al incluir el triptófano faltante en dicha región similar al AID en la subunidad  $\alpha_1$  de un canal LVA, las subunidades  $\beta$  podrán ejercer una regulación sobre las propiedades biofísicas de dicho canal.

### B. Objetivo General

Contribuir al conocimiento de la biofísica y de la relación existente entre la estructura y la función de los canales de calcio LVA y, de manera particular, a dilucidar si estos canales son regulados por las subunidades  $\beta$  de los canales de calcio HVA.

### C. Objetivos Específicos

1. Construir una subunidad  $\alpha_{1G}$  mutante que presente un triptófano en lugar de la tirosina que se encuentra en la posición 514 (Y514W).
2. Caracterizar las propiedades biofísicas de la corriente expresada por la mutante Y514W.
3. Investigar la posible regulación de la mutante Y514W por las subunidades  $\beta$  de los canales HVA.

## V. MÉTODOS

La estrategia experimental del presente trabajo consistió en dos fases, la primera de ellas fue la construcción de la mutante Y514W con el empleo de técnicas de biología molecular; y la segunda etapa consistió en el análisis funcional de dicha mutante mediante experimentos de electrofisiología. A continuación se detallan las técnicas utilizadas en cada una de las dos etapas.

### 1. Construcción de la mutante Y514W

#### 1.1. Generación del fragmento mutante

En el presente estudio se utilizó el cDNA de la subunidad  $\alpha_{1G}$  clonada de humano (Número de acceso del GeneBank: AF190860; Cribbs et al., 2000). En primer lugar, la secuencia completa del canal se liberó del vector en que se encuentra insertado (pcDNA3) mediante la digestión a 37°C por una hora con la enzima *KpnI* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA). La mezcla de la digestión se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1% y el fragmento de interés (~8 kb, es decir, 8000 pares de bases) se purificó con el kit QIAquick® (QIAGEN, Alemania).

Para producir la mutante de  $\alpha_{1G}$  en la que se sustituyó la tirosina 514 de la proteína silvestre por un triptófano se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés) usando la estrategia de empalme (Sambrook J & Russell D, 2001). Dicha estrategia consta de tres reacciones de PCR y de cuatro oligonucleótidos específicos que sirven como cebadores o *primers*. De estos últimos, dos se denominan *primers* mutagénicos, ya que su secuencia contiene la mutación deseada y son complementarios uno con el otro (Tabla 1). Los otros dos *primers* son complementarios con la secuencia de  $\alpha_{1G}$  y se les denominó *primers* candado. Estos últimos tuvieron una secuencia parcialmente degenerada con el claro propósito de que puedan reconocer la secuencia homóloga en los genes que codifican para las subunidades  $\alpha_{1H}$

y  $\alpha_{11}$  a emplearse en futuros experimentos. El *primer* candado sentido contiene una **S**, lo cual significa que puede contener una C ó una G en esta posición, mientras que el *primer* candado antisentido contiene una **W**, lo cual indica que en esta posición se puede encontrar una A o T en la secuencia. El tamaño del fragmento comprendido entre ambos *primers* candado fue de 617 pares de bases (pb) e incluyen los sitios de corte de las enzimas *NheI* (base 1487) y *SfiI* (base 1763), mismos que se emplearon para subclonar el fragmento mutante en el plásmido  $\alpha_{1G}$ -pcDNA3.

**Tabla 1. Primers utilizados para la generación de la mutante Y514W**

Nombre	Secuencia	Ubicación
Ms	5'GTACCTGGTGT <b>GG</b> ATCCTTCGTAAG3'	1530-1554
Mas	5'CTTACGAAGGAT <b>CCAC</b> ACCAGGTAC3'	1554-1530
Cs	5'GGCTGGGT <b>S</b> GASATCATGTAC3'	1279-1299
Cas	5'GTCGGCATGGTAGAW <b>G</b> CTGTG3'	1896-1876

Las bases remarcadas indican, en los *primers* mutagénicos (Ms y Mas) el codón mutante que introduce el triptófano en la secuencia, y en los *primers* candado (Cs y Cas) las bases degeneradas de la secuencia: S = C ó G; W = A ó T. Los números de la columna derecha indican la ubicación de los primers en la secuencia completa de la subunidad  $\alpha_{1G}$ .

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo utilizando un termociclador Master Cycler (Eppendorf, Alemania). En la primera reacción (PCR1) se utilizaron los *primers* Cs y Mas, mientras que en una reacción paralela (PCR2) se emplearon los *primers* Ms y Cas. En ambas reacciones el templado utilizado fue el fragmento de DNA de 8 kb correspondiente a la secuencia completa de  $\alpha_{1G}$ . Finalmente, en la tercera reacción (PCR3) se utilizó como templado a los productos de la PCR1 y PCR2 y ambos *primers* candado. Cada una de las reacciones se llevo a cabo en tubos Eppendorf para PCR en un volumen final de 100  $\mu$ l. En PCR1 y PCR2 se utilizaron 40 ng de templado, mientras que para la PCR3 el templado consistió en 5  $\mu$ l de cada una de tales reacciones. En todas las reacciones se utilizaron 2 unidades de la enzima DNA polimerasa *Deep*

*Vent*, 10  $\mu$ l del buffer 10X, 1  $\mu$ l de MgSO<sub>4</sub> 100 mM, 1  $\mu$ l de dNTP's (25 mM). Los *primers* para cada reacción se usaron a una concentración de 4  $\mu$ M, al final se agregó agua hasta llegar al volumen final. En la tabla 2, se señalan los protocolos seguidos para amplificar el DNA en cada una de las reacciones.

Tanto el DNA digerido con enzimas de restricción como el DNA producto de las reacciones de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE con 0.5  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio. Las muestras (usualmente 5 o 10  $\mu$ l de cada tubo) se corrieron a 10 V/cm. Paralelamente, para constatar el tamaño de los productos observados, en un carril de cada gel se separaron también marcadores de tamaño molecular de 1 kb y de 100 pb (New England Biolabs). Las bandas de DNA se visualizaron por exposición a luz ultravioleta y se fotografiaron con una cámara digital utilizando el sistema de captura y análisis de imágenes DigiDoc-It<sup>®</sup> (UVP, Inc, Upland, CA, EUA).

**Tabla 2. Protocolos de amplificación utilizados en las reacciones de PCR.**

Paso	No. ciclos	PCR1 y PCR2		PCR3		Proceso
		°C	Segundos	°C	Segundos	
1	1	94	60	94	60	Desnaturalización
2	1	94	30	94	30	Desnaturalización
3	1	60	30	69	30	Alineamiento
4	1	72	45	72	45	Polimerización
5	Repetición de los pasos 2 al 4			por 33	ciclos	
6	1	72	300	72	300	Polimerización

## 1.2. Clonación del fragmento mutante en el vector de secuenciación y en el plásmido $\alpha_{1G}$ -pcDNA3

El fragmento mutante de 617 pb obtenido como producto de la reacción PCR3, se clonó en el vector del kit de clonación para secuenciación Zero Blunt® TOPO® PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para esto se mezclaron 4  $\mu$ l del producto de la PCR3 con 1  $\mu$ l de solución salina (1.2 M NaCl y 0.06 M MgCl<sub>2</sub>) y 1  $\mu$ l del vector pCR® 4Blunt-TOPO®. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos, después de lo cual se mantuvo en hielo hasta que se usó para la transformación de células competentes One Shot® TOP10 (contenidas en el mismo kit). De un total de 20 colonias que crecieron en las cajas de Petri con agar, 8 de ellas presentaron el DNA plasmídico con el fragmento mutante, mismo que fue liberado por la actividad de la enzima *Eco RI*. Para comprobar su identidad molecular, la presencia de la mutación deseada y la ausencia de mutaciones no deseadas, 3 de estas 8 colonias se secuenciaron automáticamente en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM. Una vez corroborada la presencia de la mutación deseada, se seleccionó uno de los tres plásmidos en cuestión y se digirió con las enzimas *NheI* y *SfiI*, lo cual generó un fragmento de 276 pb conteniendo por supuesto la mutación. Este fragmento se subclonó en el sitio *NheI* (1487)-*SfiI* (1763) del plásmido que contiene la secuencia completa de  $\alpha_{1G}$  ( $\alpha_{1G}$ -pcDNA3).

## 1.3. Alineamiento de secuencias

Una vez realizado el análisis de restricción a los plásmidos candidatos a contener la mutación, algunos de estos candidatos se enviaron a la Unidad de Biología Molecular del IFC para ser secuenciados. El alineamiento de los fragmentos mutantes secuenciados con la secuencia silvestre de  $\alpha_{1G}$  (número de acceso del GeneBank: AF190860; Cribbs et al., 2000) se realizó en los software DNAsis Max (EUA) y LALIGN (EUA), este último disponible gratuitamente en Internet

([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)) en el servidor del Instituto Suizo de Bioinformática.

## 2. Cultivo celular y transfección de células HEK-293

En el presente trabajo se empleó como sistema de expresión de las diferentes subunidades de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  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 de canales de calcio clonados.

Las células HEK-293 fueron crecidas en monocapas sobre cajas Petri de plástico de 100 mm de diámetro (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, EUA), a 37°C en una atmósfera saturada de agua y compuesta de 95% de  $\text{O}_2$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . 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  $\text{ml}^{-1}$  de penicilina y 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de estreptomycin. Todos los productos químicos para el cultivo y mantenimiento de las células se obtuvieron de GIBCO-Invitrogen (Carlsbad, CA). 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 resembradas a una densidad aproximadamente 50 veces menor en una caja de Petri nueva. Esta misma suspensión celular permitió inocular cajas Petri de 35 mm de diámetro (BD Falcon) destinadas para las transfecciones.

Los registros electrofisiológicos se realizaron en células HEK-293 transfectadas de forma transitoria con las subunidades  $\alpha_{1G}$ ,  $\beta_{1a}$ ,  $\beta_{2a}$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$ ,  $\alpha_2\delta_1$ ,  $\alpha_2\delta_2$  y la construcción mutante Y514W. Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Brevemente, el día

previo a la transfección, se sembraron células HEK-293 en cajas Petri de 35 mm a una densidad de  $0.25$  a  $1.0 \times 10^6$  células con 2 ml de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; GIBCO-Invitrogen), de tal suerte que al momento de la transfección, la monocapa de células se encontraba alrededor de 60-70% de confluencia. Para cada experimento de transfección se prepararon dos soluciones, una de ellas compuesta por 3  $\mu\text{g}$  DNA (generalmente 1.5  $\mu\text{g}$  de la subunidad  $\alpha_1$  y 1.5  $\mu\text{g}$  de la subunidad  $\beta$ ) y 0.15  $\mu\text{g}$  de un plásmido que contiene el DNA para la proteína verde fluorescente (GFP). El plásmido de la GFP se utilizó como un marcador de las células que han sido transfectadas, el volumen final de esta solución se llevó a 100  $\mu\text{l}$  con DMEM no suplementado. La otra solución contenía 9  $\mu\text{l}$  de lipofectamina y 91  $\mu\text{l}$  de medio DMEM no suplementado. Ambas soluciones se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min. Durante este tiempo se cambió el medio DMEM completo que contenían las células por 1 ml de DMEM no suplementado. Al transcurrir los 45 minutos, se agregó 800  $\mu\text{l}$  de DMEM no suplementado a los 200  $\mu\text{l}$  del complejo de transfección. Después, se retiró el DMEM no suplementado a las células y se les agregó el complejo de transfección (a esta caja Petri se le llamará caja de transfección). Las células se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  con una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  durante 8 horas, posteriormente el complejo de transfección fue retirado y se agregaron 2 ml de DMEM completo. Las células se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones por 18 horas adicionales.

Las células transfectadas se despegaron a las 24 h después de iniciada la transfección con el mismo procedimiento descrito en el párrafo previo al anterior. La diferencia principal fue que en este caso las células 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, y no más de 36 h. La caja de transfección (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 ó 4 días.

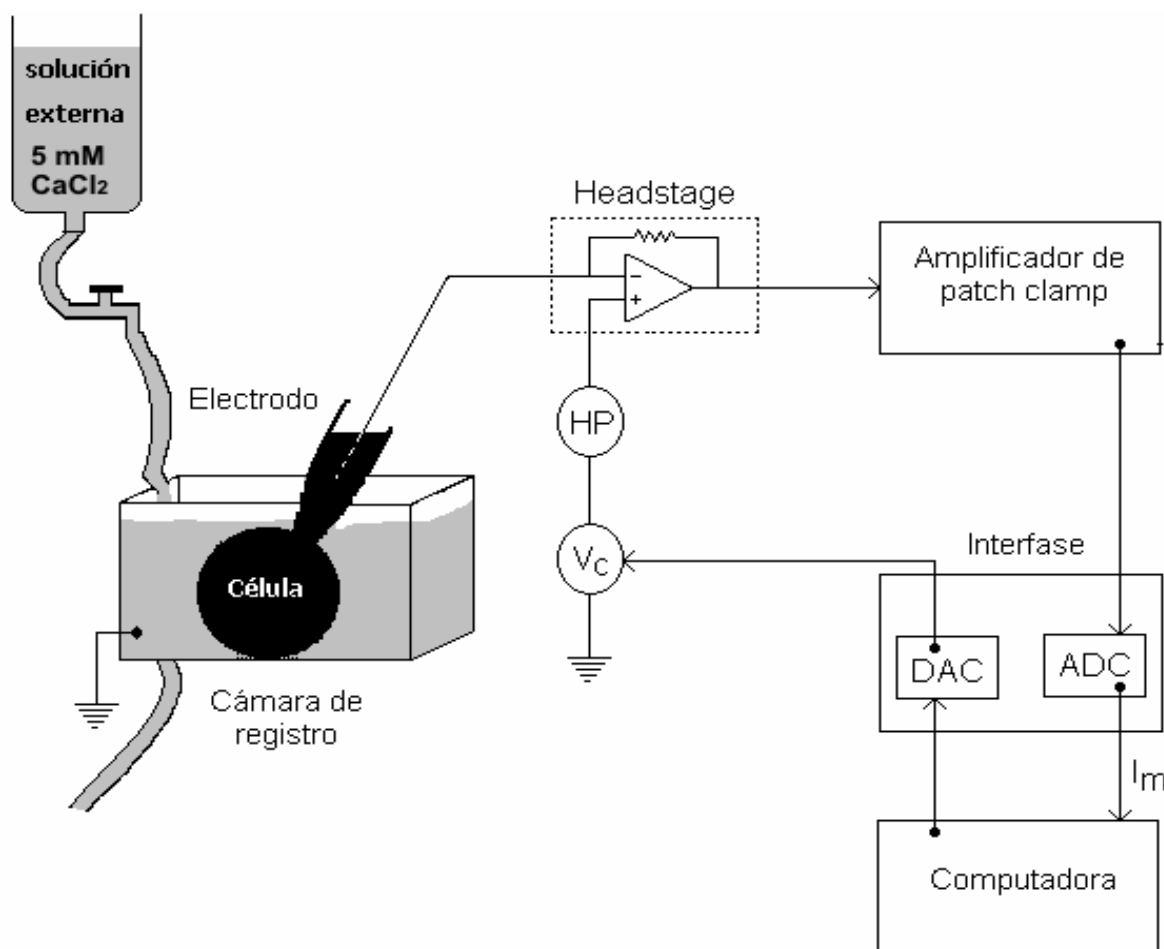
Con fines comparativos, en un par de experimentos iniciales un grupo de células fueron transfectadas con lipofectamina (tal y como se describió en el párrafo anterior) y un segundo grupo se transfectó con el kit de fosfato de calcio CalPhos™ (BD Biosciencias Clontech, Palo Alto, CA, EUA), de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Debido a que el porcentaje de células transfectadas con este último método fue significativamente menor comparado con el obtenido con Lipofectamina, aunado a la observación de que las células transfectadas con fosfato de calcio presentaron más daños en su integridad (a juzgar por la apariencia de su membrana celular y por la cantidad de muerte celular), en los experimentos subsecuentes para investigar el efecto de las subunidades  $\beta$  sobre el canal  $\alpha_{1G}$  silvestre y la mutante Y514W, las transfecciones se realizaron exclusivamente con Lipofectamina.

### **3. Electrofisiología**

#### **3.1. Experimentos de patch clamp**

Para registrar la actividad macroscópica de los canales  $\alpha_{1G}$  (silvestre y mutantes) expresados en las células HEK-293, se utilizó la técnica de patch clamp (fijación de voltaje en microáreas de membrana) en la configuración de célula completa (Hamill et al., 1981; Marty & Neher, 1995). Los registros se obtuvieron a una temperatura de 21 a 23°C, 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 Axon Instruments (Foster City, CA, EUA). Todos los componentes anteriores, así como sus conexiones se muestran en la Fig. 5.



**Figura 5. Esquema del registro electrofisiológico utilizado en los experimentos de fijación de voltaje.** La corriente de Ca<sup>2+</sup> 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 membranal ( $I_m$ ). 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 *headstage*.

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, Japón). 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 (Figura 5) y controlado por una válvula de seis vías. El flujo fue de aproximadamente 1.0 ml/min. Las células fueron visualizadas con un aumento de 400X y comenzaron a investigarse ~5 minutos después de haber sido colocadas en la cámara y se reemplazaron aproximadamente cada hora con un cubreobjetos nuevo. Los electrodos o pipetas de registro se fabricaron a partir de capilares de vidrio (TW150-3, WPI Inc., Sarasota, FL, EUA) con la ayuda de un estirador horizontal Modelo P-97 (Sutter Instrument Co., Novato, CA). Posteriormente, las puntas de estos fueron pulidas al calor con una microforja (MF-830, Narishigue Co., Japón) 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 cuyas resistencia osciló entre 1.8 y 3.5 M $\Omega$ .

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 esta tesis dicho valor siempre fue de -100 mV) 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  $\text{Ca}^{2+}$ . La forma y uso de cada uno de tales protocolos se describirán conforme se presenten los resultados correspondientes a lo largo de la presente tesis.

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 ( $\tau$ ) 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  $\mu\text{s}$ .

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/-4, 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  $\mu$ s) por medio del convertidor analógico-digital de la interfase y finalmente almacenadas en el disco duro de la computadora para su posterior análisis.

### 3.2. Soluciones de registro

Las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{CaCl}_2$  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  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , 4 Mg-ATP, 0.3  $\text{Na}_3\text{GTP}$  y 10 HEPES con un pH de 7.3 ajustado con CsOH.

### 3.3. Análisis de datos

Los registros electrofisiológicos fueron analizados y graficados utilizando los programas Clampfit del paquete pClamp 9.02 (Axon Instruments), Lotus Smartsuite 9.0 (IBM, Armonk, NY, EUA) y Prism 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). 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:

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

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

Para analizar la dependencia al voltaje de la activación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  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:

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

donde  $G$  es la conductancia,  $I_{\text{Ca}}$  es la corriente al pico,  $V_m$  es el valor de voltaje con el que se evocó la corriente, y  $V_{\text{inv}}$  es el potencial de inversión. A esta ecuación se le denominará en adelante conductancia cuerda. La segunda forma en que se midió la conductancia consistió en obtener el cociente de la amplitud de corriente obtenida a cada voltaje explorado con el protocolo de la  $I-V$  entre la amplitud de la cola de corriente registrada al voltaje correspondiente (para una descripción de este procedimiento véase el texto de la figura 13). Ambos valores de conductancia fueron normalizados, graficados y ajustados con la ecuación de Boltzmann para obtener las curvas conductancia-voltaje ( $G-V$ ):

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

donde, nuevamente,  $G$  es la conductancia,  $V_m$  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 (véase Figura 16) se ajustaron con una función de Boltzmann de la siguiente forma:

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

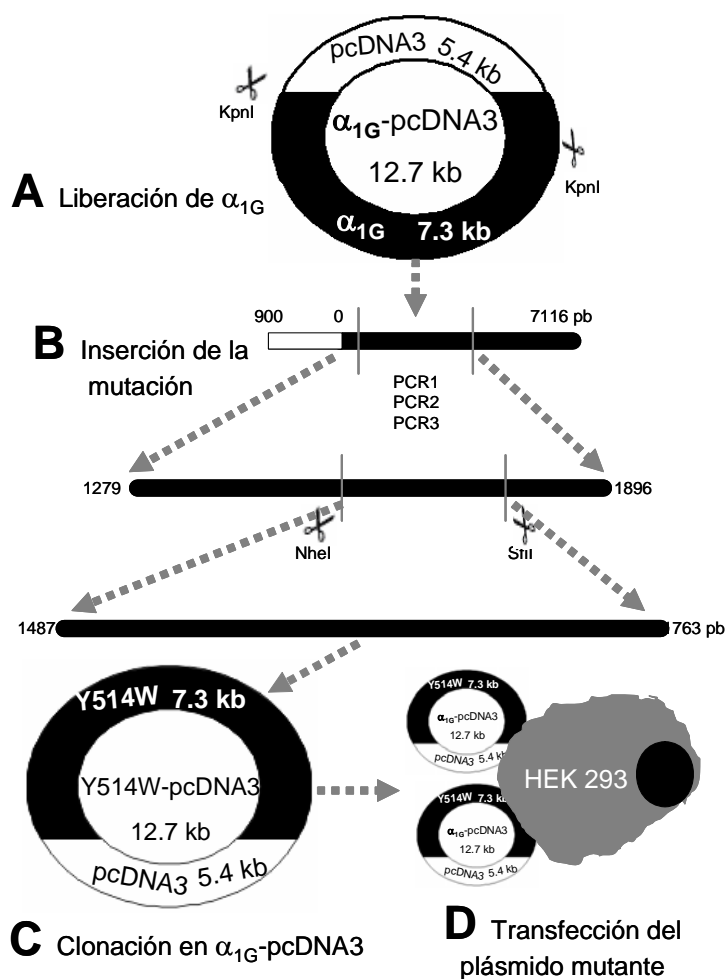
La cinética de las corrientes registradas a los diferentes voltajes fue analizada mediante su ajuste con una función biexponencial, donde la primera exponencial describe la fase de activación y la segunda, la inactivación de la corriente. Por su parte, el cierre de los canales o cinética de desactivación 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 (ver pagina 58), 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 ( $\tau$ ) 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 ( $\tau_h$ ).

Todos los resultados se expresan como la media  $\pm$  el error estándar (SEM) 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.

## VI. RESULTADOS

### 1. Construcción de la mutante Y514W

La primera etapa experimental del presente trabajo consistió en la generación de la mutante del canal  $\alpha_{1G}$  consistente en sustituir la tirosina ubicada en la posición 514 de la secuencia de aminoácidos de dicho canal por un triptófano (mutante Y514W) mediante técnicas de biología molecular. En la figura 6, se muestra una representación esquemática de la primera etapa.

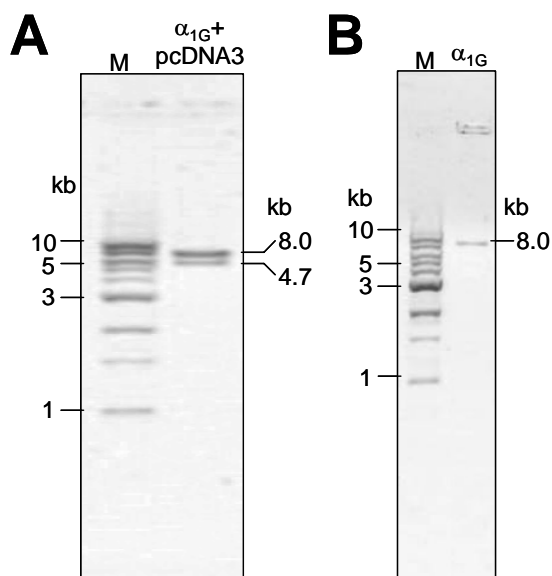


**Figura 6. Esquema general de la primera etapa experimental.** Los sitios de reconocimiento para las enzimas empleadas se señalan con el nombre de estas. **A)** Liberación del gen codificante de la subunidad  $\alpha_{1G}$  mediante la digestión con la enzima *KpnI*. **B)** Sustitución de la tirosina 514 por triptófano mediante reacciones de PCR con *primers* mutagénicos. **C)** Clonación del fragmento mutante en el plásmido  $\alpha_{1G}$ -pcDNA3. Una vez clonada, la secuencia mutante fue secuenciada para comprobar su identidad. **D)** Transfección de la construcción mutante a células HEK-293 para estudiar sus propiedades electrofisiológicas.



### 1.1. Liberación del inserto $\alpha_{1G}$ del vector pcDNA3

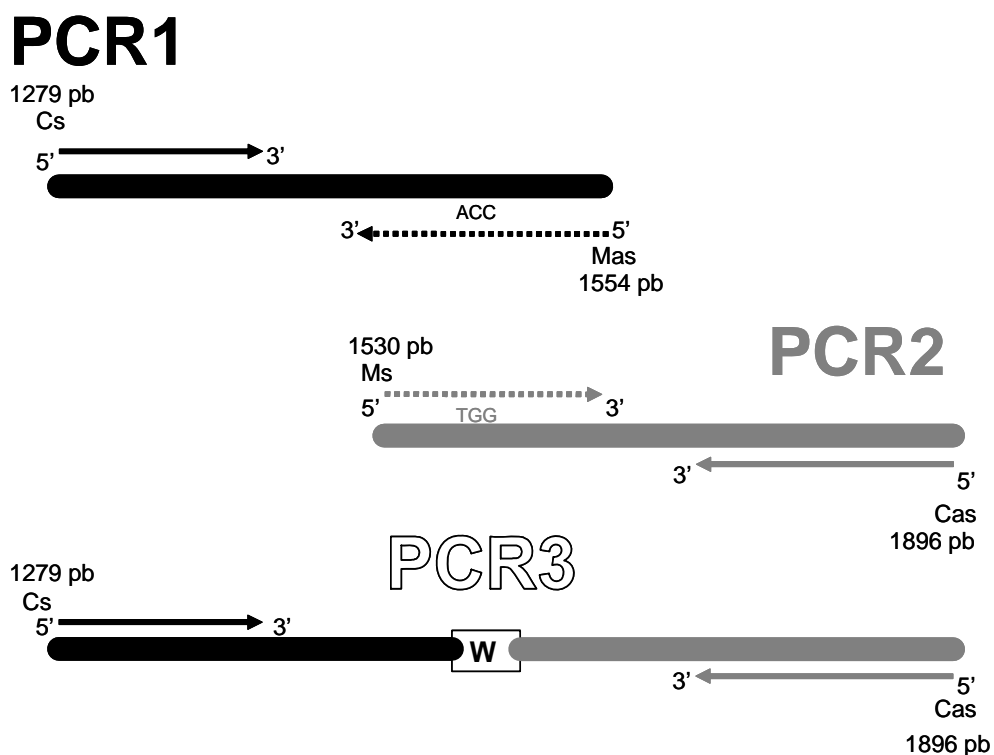
El gen que codifica para la subunidad  $\alpha_{1G}$  de los canales LVA utilizado en el presente trabajo de tesis fue donado a nuestro laboratorio originalmente por el Dr. Perez-Reyes de la Universidad de Virginia en los EUA (Cribbs et al., 2000). La secuencia completa de dicho gen se encuentra clonada en el sitio *KpnI* del vector pcDNA3. Con el propósito de reducir los posibles sitios de hibridación de los *primers* diseñados para generar la mutación, como primer paso en la construcción de la mutante Y514W, se liberó la secuencia de  $\alpha_{1G}$  del vector pcDNA3 mediante el empleo de la enzima de restricción *KpnI* (Fig. 6). Esta enzima libera casi por completo a  $\alpha_{1G}$ , ya que existe un sitio de corte en la región del *polylinker* (secuencia de DNA con múltiples sitios de reconocimiento para enzimas de restricción y que sirven para insertar secuencias de genes para estudiar su expresión) de pcDNA3 y otro más en el nucleótido 7116 de la secuencia del canal (que consta de 7349 pb). La digestión enzimática se analizó electroforéticamente en un gel de agarosa al 1%, obteniéndose dos bandas de DNA, una de 8016 pb y otra de 4779 pb (Fig. 7A). La primera corresponde a la secuencia (cuasi completa) de la subunidad  $\alpha_{1G}$ , y la segunda al vector pcDNA3. El DNA de la banda de 8 kb fue purificado (Fig. 7B) para su uso posterior como templado en la PCR1 y PCR2.



**Figura 7. Liberación de  $\alpha_{1G}$  del vector pcDNA3.** Electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE 0.5X. **A)** Productos de la digestión enzimática de  $\alpha_{1G}$ -pcDNA3 con *KpnI*. La banda de 8.0 kb corresponde a la secuencia de la subunidad  $\alpha_{1G}$  y la banda de 4.7 kb al vector pcDNA3. **B)** DNA purificado correspondiente a la banda de 8 kb del panel **(A)**. En los carriles de la izquierda de cada gel se muestran los marcadores de tamaño molecular (M). Los números indican los tamaños de las bandas de DNA.

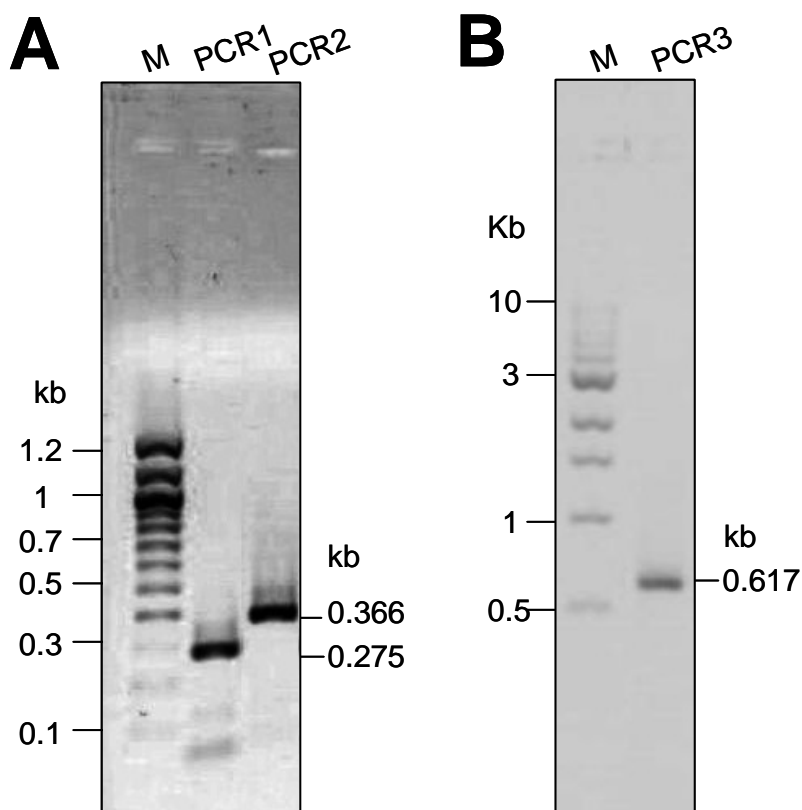
## 1.2. Sustitución de la tirosina localizada en la posición 514 de $\alpha_{1G}$ por triptófano

En la generación de la mutante Y514W se usaron dos primers mutagénicos cuya secuencia cambió el codón codificante para la tirosina (TAC) por un codón para el triptófano (TGG), es decir se mutaron dos bases de la secuencia del cDNA de la subunidad  $\alpha_{1G}$ . La mutación se introdujo mediante la técnica de mutación puntual dirigida por empalme con PCR (Fig. 8), la cual consiste de tres reacciones de PCR (véase la sección de Métodos). En la PCR1 y la PCR2 el templado utilizado fue el fragmento de DNA de 8.0 kb previamente purificado (Fig. 7B) y que corresponde al canal  $\alpha_{1G}$ .



**Figura 8. Esquema de la fabricación del fragmento mutante.** Mutación puntual dirigida por empalme mediante PCR empleada para generar la mutante Y514W. La PCR1 se simboliza con flechas negras, la PCR2 con flechas grises y la PCR3 con una flecha negra y otra gris. Los *primers* candado se muestran como flechas continuas, mientras que los *primers* mutagénicos con flechas discontinuas, en estos últimos se muestra el codón mutado que codifica para triptófano. Los productos de las reacciones 1 y 2 se simbolizan con rectángulos negros y grises, respectivamente.

En la PCR1 se utilizaron los *primers* Cs y Mas, y el producto obtenido fue un fragmento de 275 pb (Fig. 9A) que abarca del nucleótido 1279 al 1554 de la secuencia de  $\alpha_{1G}$ . En la PCR2 se amplificó la región entre los *primers* Ms y Cas, dando como resultado un fragmento de 366 pb, que inicia en el nucleótido 1530 y termina en el 1896 (Fig. 9A). En la PCR3 se utilizó como templado los fragmentos de DNA amplificados en las PCR1 y PCR2, y en presencia de los *primers* candado (Cs y Cas) se logró la amplificación de un fragmento de 617 pb (Fig. 9B) el cual comprende los nucleótidos 1279 al 1896 de  $\alpha_{1G}$ . Es importante mencionar que éste producto ya contiene el codón para el triptófano faltante en la región homóloga al AID en  $\alpha_{1G}$ .

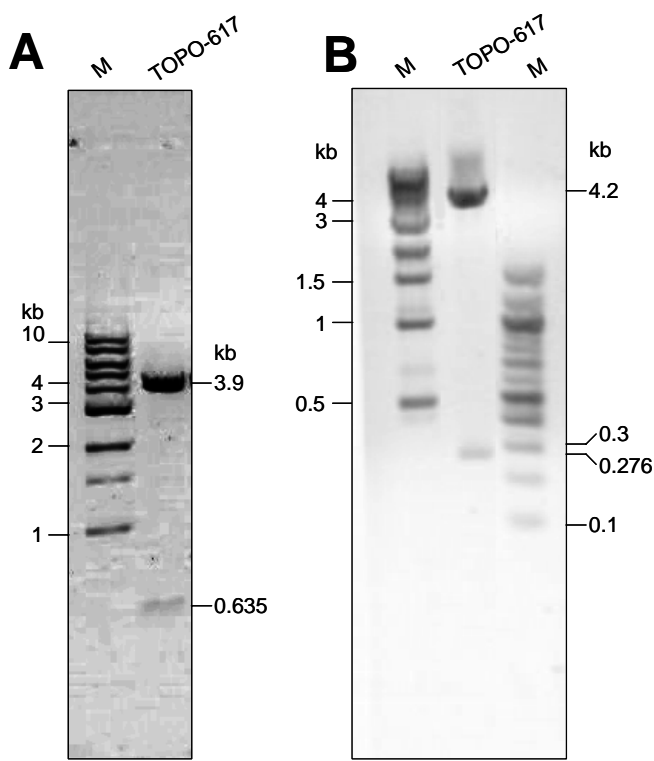


**Figura 9. Fabricación del fragmento mutante.** Electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE 0.5X. **A)** Productos de la PCR1 (275 pb) y de la PCR2 (366 pb). **B)** Producto de la PCR3 (617 pb) el cual contiene la mutación deseada. A la izquierda de cada gel están los tamaños moleculares de los marcadores (M) y a la derecha se encuentran el tamaño de las bandas del DNA esperado.

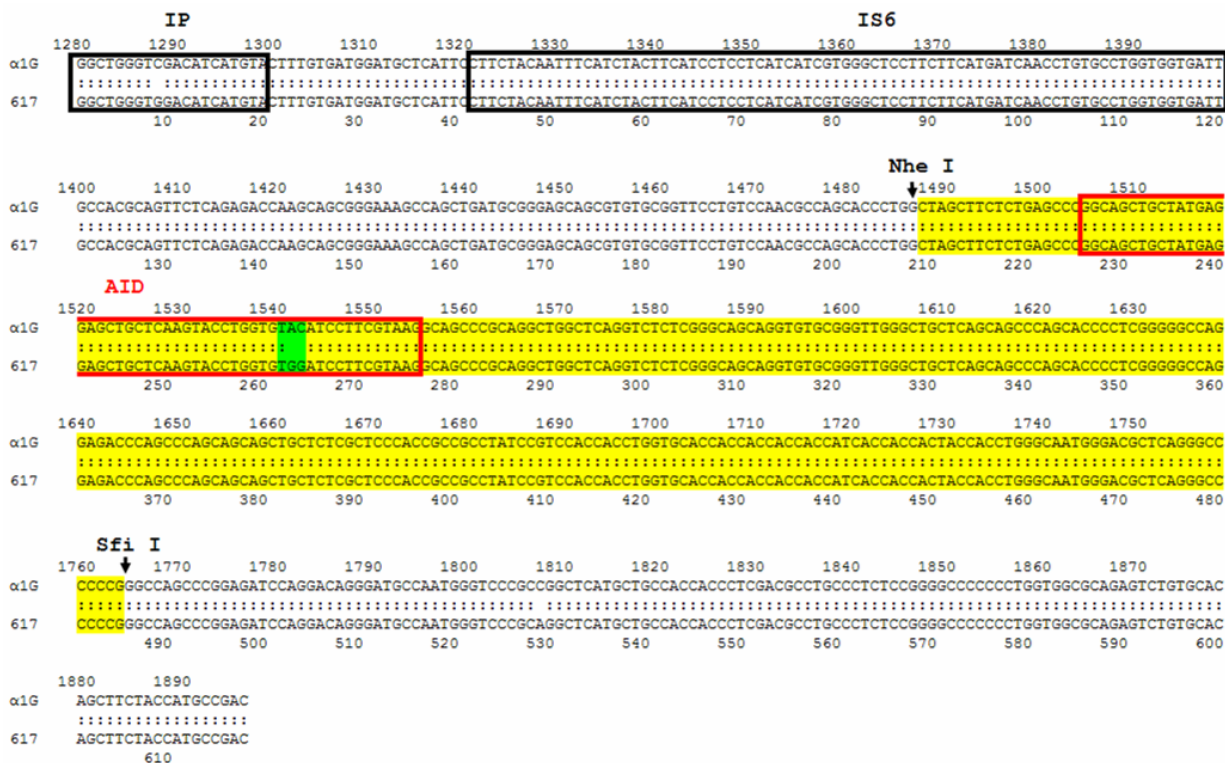
### 1.3. Análisis molecular del fragmento mutante

Con el objetivo de analizarlo mediante secuenciación automática y con enzimas de restricción, el fragmento mutante fue clonado en el vector pCR® 4Blunt-TOPO de acuerdo a las indicaciones del proveedor (véase Métodos). Esta construcción se identificó con el nombre de TOPO-617. El fragmento mutante que fue clonado en este vector se liberó con la enzima EcoRI, para la cual existen dos sitios de corte en el *polilinker* del vector, mismos que flanquean el sitio de clonación. Como era de esperarse, la digestión con dicha enzima generó una banda de DNA de 635 pb correspondiente al inserto y otra de 3.9 kb correspondiente al vector (Fig. 10A). Una vez confirmado el tamaño del inserto, se procedió a secuenciar el fragmento utilizando los *primers* universales T3 y T7, para los cuales existen sitios de reconocimiento en el *polilinker* del vector. Este procedimiento se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular. La secuencia obtenida se comparó con la secuencia de  $\alpha_{1G}$  silvestre (Fig. 11). Se puede observar en el alineamiento de las secuencias la presencia del codón TGG, el cual codifica para el triptófano, en la mutante Y514W, mientras que en la secuencia de  $\alpha_{1G}$  silvestre se tiene en la misma posición el codón TAC que codifica para tirosina. Analizando el resto de la secuencia del fragmento mutante se encontraron dos mutaciones no deseadas, una en el nucleótido 1287 y otra en el nucleótido 1807 de la secuencia de  $\alpha_{1G}$ . La primera se explica debido a que el *primer* Cs tiene una secuencia parcialmente degenerada (véase Tabla 1). En este caso el *primer* que reconoció a la secuencia del gen codificante de la subunidad  $\alpha_{1G}$  contenía una G, mientras que la secuencia silvestre contiene una C. No obstante, este cambio se traduce en una mutación conservada, pues los codones para valina pueden presentar cualquier base en la tercera posición. La segunda mutación también es conservada. En este caso el codón cambia de CGG a AGG, pero ambos codifican para arginina. Con lo anterior, se confirmó que nuestro fragmento mutante contenía la secuencia y mutación deseada.

El siguiente paso consistió en cortar dicho fragmento con las enzimas *Nhe I* y *Sfi I*, para las cuales existe un sitio de corte en los nucleótidos 1487 y 1763, respectivamente, tanto en la secuencia de la subunidad  $\alpha_{1G}$ , como en la del fragmento mutante. Como resultado de esta digestión se obtuvieron dos fragmentos, uno de 276 pb correspondiente al fragmento mutado, el cual además contenía únicamente la mutación deseada. El otro fragmento fue de 4.2 kb, que corresponde al vector pCR® 4Blunt-TOPO (de 3.9 kb) más los remanentes 300 pb del fragmento mutante clonado en este vector originalmente (TOPO-617) (Fig. 10B). Finalmente, El fragmento mutado (276 pb) fue clonado en el sitio *Nhe I* (1487)-*Sfi I* (1763) del plásmido  $\alpha_{1G}$ -pcDNA3. A la construcción resultante se le denominó mutante Y514W. Para comprobar la identidad de esta última, se realizó otra secuenciación automatizada de la región mutante, ahora con los *primers* candado (Cs y Cas), lo cual confirmó la presencia de la mutación deseada (nucleótidos 1541 y 1542) y ninguna otra modificación en la secuencia de la mutante Y514W (datos no mostrados).



**Figura 10. Clonación del fragmento mutante en el vector pCR® 4Blunt-TOPO®.** **A)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la digestión del plásmido TOPO-617 con la enzima *EcoR I*. Se observan dos bandas de DNA, una de 635 pb que corresponde al fragmento mutante liberado y otra de 3.9 kb correspondiente al vector pCR® 4Blunt-TOPO. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la digestión del plásmido TOPO-617 con las enzimas *Nhe I* y *Sfi I*. La banda de 276 pb corresponde al fragmento que contiene el triptófano en el lugar de la tirosina 514 de la subunidad  $\alpha_{1G}$ . La banda de 4.2 kb corresponde al vector pCR® 4Blunt-TOPO. A la izquierda de cada gel están los tamaños moleculares de los marcadores (M) y a la derecha se encuentran el tamaño de las bandas del DNA esperado. También a la derecha en **(B)** se señalan las bandas correspondientes al marcador de 300 y 100 pb.



**Figura 11.** Alineamiento de las secuencias de  $\alpha_{1G}$  silvestre y del fragmento mutante de 617 pb. La caja IP indica las bases que forman parte del poro de conducción del dominio uno del canal. La caja IS6 corresponde al segmento seis del dominio uno. La caja con bordes rojos marcada como AID indica las bases que forman la región homóloga al dominio AID de los canales HVA. La secuencia de 276 pb resaltada en amarillo corresponde al fragmento mutado obtenido con las enzimas *Nhe I* y *Sfi I*, mismo que fue clonada en el plásmido  $\alpha_{1G}$ -pcDNA3. En verde se muestra el cambio del codón que codifica para Y en la secuencia silvestre por el codón que lo hace para W en la secuencia mutante. Nótese que dentro de esta región de 276 pb no se encuentran mutaciones adicionales a la deseada.

## 2. Electrofisiología

La segunda etapa del presente trabajo consistió en obtener registros electrofisiológicos de células HEK-293 transfectadas de manera transitoria con diferentes subunidades silvestres ( $\alpha_{1G}$ ,  $\beta_{1a}$ ,  $\beta_{2a}$ ,  $\beta_{3}$ ,  $\beta_{4}$ ,  $\alpha_{2\delta 1}$  y  $\alpha_{2\delta 2}$ ) y la construcción mutante (Y514W). Dichos registros se realizaron con la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa y utilizando como acarreador de carga 5 mM de  $Ca^{2+}$ . De manera general, las células transfectadas (identificadas por la emisión de

florescencia verde a longitudes de onda entre 510 y 560 nm) mostraron corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  durante los primeros cuatro días después de la transfección, donde la amplitud de la corriente mostró un comportamiento gaussiano, con un pico máximo de amplitud a las 48-60 h después de iniciada la transfección.

## 2.1. Caracterización de la corriente de $\text{Ca}^{2+}$ generada por la mutante Y514W

Con el propósito de estudiar si la mutación de la tirosina por el triptófano en la subunidad  $\alpha_{1G}$  modifica *per se* las propiedades biofísicas de esta última, nuestra primera serie de experimentos de patch clamp estuvieron encaminados a resolver esta incógnita. Para ello se compararon las características de las corrientes generadas por la subunidad  $\alpha_{1G}$  silvestre y la mutante Y514W. En estos experimentos se transfectaron dos grupos de células para cada canal, uno con Lipofectamina y otro con fosfato de calcio. El análisis de los resultados reveló que independientemente del método de transfección, las características de las corrientes registradas fueron prácticamente idénticas, a excepción de la cinética de activación e inactivación, cuyo curso temporal fue más lento en las células transfectadas con lipofectamina (véase más adelante). Por tal razón, los resultados que se presentan en esta primera sección agrupan los datos de células transfectadas con ambos métodos, a menos que se indique lo contrario.

### 2.1.1. Relación corriente-voltaje

La relación corriente-voltaje ( $I-V$ ) representa la correspondencia que existe entre el voltaje y la magnitud de la corriente que se activa a dicho voltaje y es una característica distintiva de los diferentes tipos de canales iónicos dependientes de voltaje que se conocen a la fecha. A partir de la relación  $I-V$  se obtienen parámetros importantes que sirven para la caracterización de una corriente iónica, como son: el potencial de membrana al cual se activa la corriente, el valor de

voltaje al cual alcanza la máxima amplitud de corriente (pico de la curva), y el potencial de membrana al cual se invierte la dirección de la corriente ( $V_{inv}$ ). Así mismo con los valores de corriente de esta relación se puede calcular la conductancia para cada valor de voltaje explorado y así determinar la dependencia al voltaje de activación.

En el presente trabajo se aplicaron protocolos de voltaje para determinar la relación  $I-V$  de las células investigadas con la técnica de patch clamp que consistieron en una serie de pulsos de voltaje despolarizantes de 100 ms de duración que llevaron el  $V_m$  a valores de -80 hasta +80 mV en incrementos de 10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV. En la Fig. 12A se muestran familias de corrientes de calcio representativas obtenidas de dos células HEK-293 transfectadas con la subunidad del canal  $\alpha_{1G}$  y con la del canal mutante Y514W. Las corrientes fueron evocadas con el protocolo de voltaje ya descrito, mismo que se muestra en la parte baja de los registros. Se puede observar que ambas familias de corrientes son muy parecidas en cuanto a su amplitud y cinética. Como es bien sabido, la corriente generada por los canales tipo T ó LVA, se activa rápidamente alcanzando un valor máximo de corriente (pico), para posteriormente decaer en amplitud, conforme la inactivación de los canales tiene lugar. El curso temporal con el que ocurren estos eventos de activación e inactivación se acelera conforme el valor de  $V_m$  se hace más positivo, lo cual genera un patrón de entrecruzamiento de los registros de corriente, tal y como se puede observar en ambas familias de registros (Fig. 12A). Para un análisis más cuantitativo de las corrientes de ambos canales, procedimos a medir la amplitud de la corriente al pico registrada a cada uno de los valores de  $V_m$  explorados en cada célula. Para eliminar el tamaño de las células como una variable, la amplitud de la corriente se dividió entre el valor de capacitancia membranal ( $C_m$ ). Debido a que las membranas biológicas presentan una capacitancia específica de 1.0  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$  (Hille, 2001), entonces la cantidad de corriente por unidad de capacitancia (densidad de corriente) es una forma de estimar la cantidad de corriente por unidad de área de la membrana plasmática. El

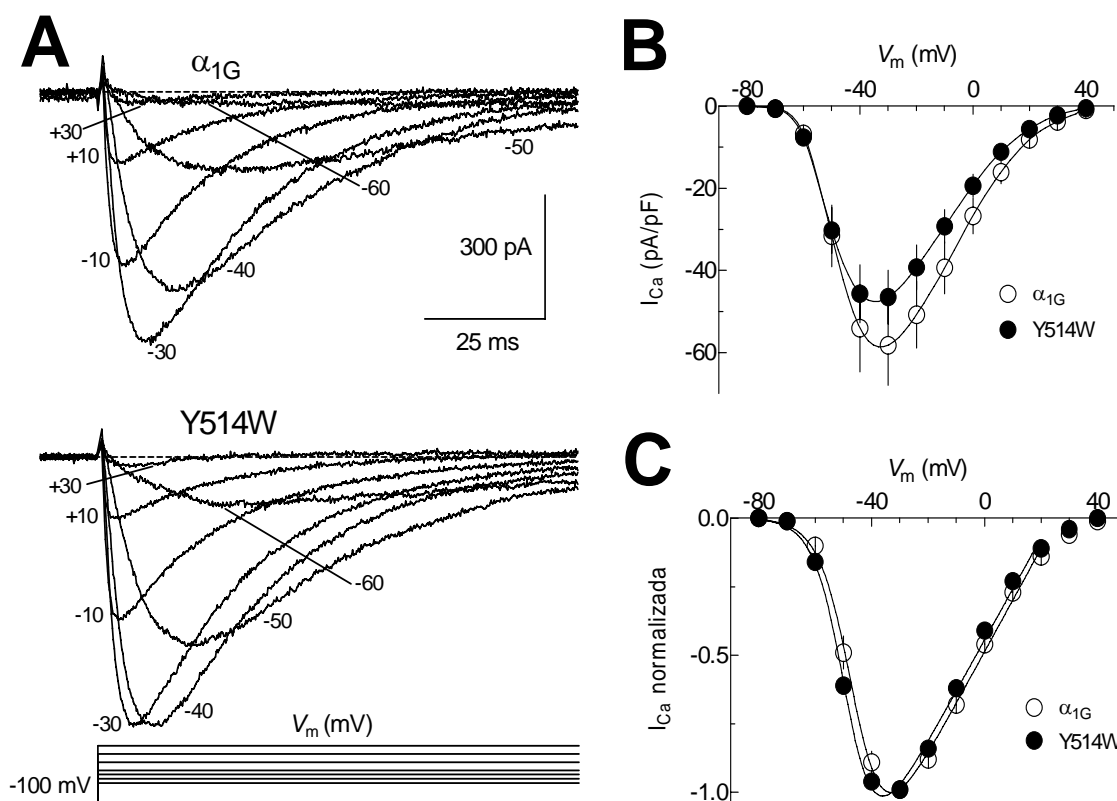


valor de densidad de corriente así obtenido se promedió a partir de todas las células estudiadas (8 con el canal silvestre y 11 con el mutante) y se graficó en función del voltaje correspondiente (Fig. 12B). La corriente transportada por ambos canales,  $\alpha_{1G}$  y el mutante Y514W, comienza a ser detectable a -70 mV y alcanza su pico máximo a -30 mV. A voltajes más positivos la amplitud de la corriente disminuye y cambia de dirección, de entrante a saliente, alrededor de +40 mV. No obstante que la densidad de corriente generada por los canales  $\alpha_{1G}$  silvestres fue ~25% más abundante que la de los mutantes ( $58 \pm 10$  pA/pF contra  $46 \pm 6$  pA/pF), esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Los datos experimentales de la relación  $I-V$  fueron normalizados y ajustados con una ecuación de Boltzmann modificada (véase Métodos). Los parámetros obtenidos a partir de dicho ajuste ( $V_{1/2}$  y  $V_{inv}$ , principalmente) nos confirmaron cuantitativamente la observación inicial de que la relación  $I-V$  de ambos canales es prácticamente la misma. No obstante, aunque el valor de  $V_{inv}$  fue sólo 1.8 mV más negativo en el caso de la corriente del canal mutante en comparación con la del silvestre, dicha diferencia fue estadísticamente significativa a un valor de  $P < 0.05$  (Tabla 3).

### 2.1.2. Curva conductancia-voltaje de los canales $\alpha_{1G}$ y Y514W

Existen varias estrategias para caracterizar la dependencia al voltaje de la activación de los canales iónicos dependientes de voltaje. En particular para los canales de calcio, el cálculo de la conductancia cuerda (véase Ecuación 2 en Métodos), es decir, aquella que se calcula tomando en cuenta la amplitud de la corriente y la fuerza impulsora (esta última es la diferencia entre el  $V_m$  y el potencial de Nernst del ión  $Ca^{2+}$ ,  $V_{Ca}$ ), se complica debido a que el potencial de inversión de la corriente transportada por los canales de calcio está determinado por otros cationes (en las presentes condiciones experimentales por el  $Cs^+$ ), por lo cual no puede ser considerado como el  $V_{Ca}$  más acertado. En consecuencia se han propuesto otras alternativas para conocer la

conductancia de la corriente macroscópica de los canales de calcio. Una de ellas es la de ajustar los datos de la curva  $I-V$  con una función Boltzmann que toma en consideración la fuerza impulsora (véase Ecuación 1 en Métodos). No obstante, al igual que con la conductancia cuerda, este último procedimiento también subestima el potencial de inversión del ion  $\text{Ca}^{2+}$ . La ventaja es que se puede obtener un valor de conductancia sin mayor manipulación de los datos de corriente de la  $I-V$ ,



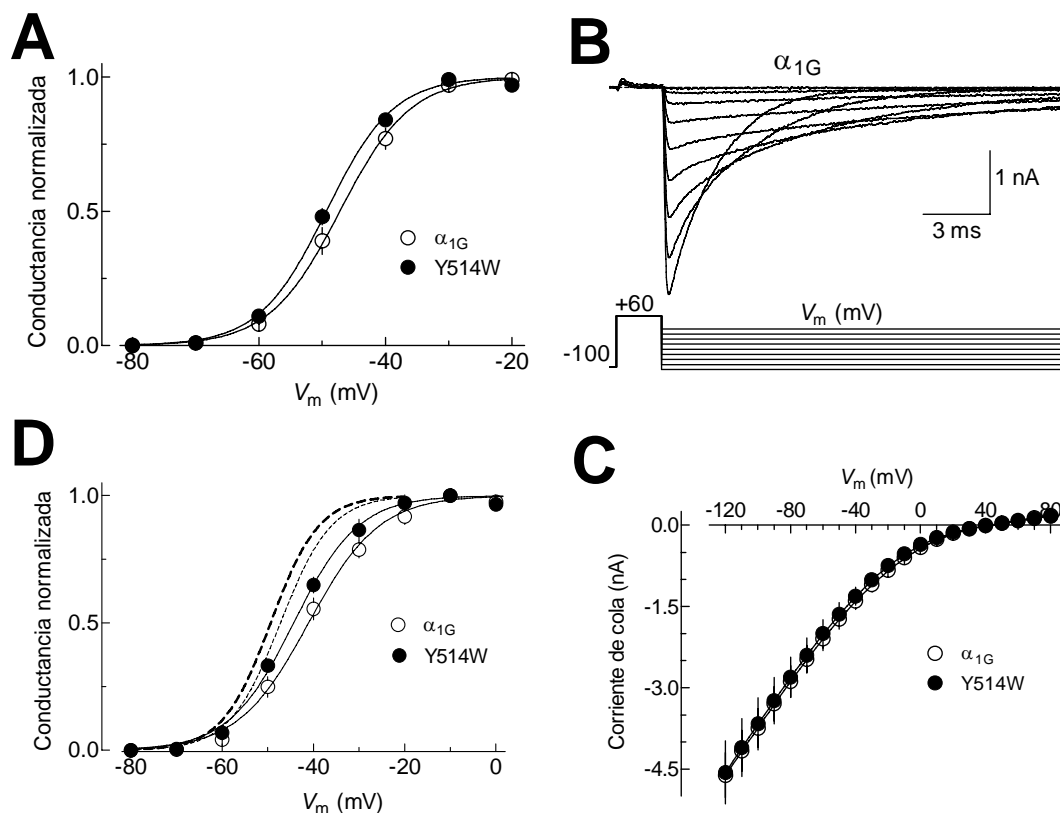
**Figura 12. Relación  $I-V$  de los canales  $\alpha_{1G}$  y Y514W.** **A)** Trazos representativos de corrientes de calcio registradas a los voltajes indicados de una célula transfectada con el canal  $\alpha_{1G}$  silvestre y otra con el canal mutante. En los ejemplos ilustrados, el  $V_m$  durante los pulsos varió entre -60 y +30 mV, como se indica en la parte baja de los registros. Al igual que en las subsecuentes figuras, los registros mostrados corresponden a células transfectadas con Lipofectamina. **B)** Relación  $I-V$  para ambos canales. Los puntos experimentales muestran el promedio  $\pm$  el error estándar de la densidad de corriente al pico en función del valor de  $V_m$  para 8 células transfectadas con el canal  $\alpha_{1G}$  silvestre y 11 con el canal mutante. **C)** Comparación de las curvas  $I-V$  del panel C normalizadas respecto al valor máximo de corriente de cada una de ellas. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos experimentales con la ecuación de Boltzmann modificada como se describe en Métodos.

Tabla 3. Resumen de las propiedades biofísicas de  $\alpha_{1G}$  y Y514W

	$\alpha_{1G}$	Y514W
1) Densidad de $I_{Ca}$ (pA/pF)	$-58.2 \pm 9.8$	$-46.5 \pm 6.5$
2) $V_{inv}$ (mV)	$25.8 \pm 0.4$	$24.0 \pm 0.6^*$
3) $V_{1/2}$ y $k$ de activación (mV)		
a) $I-V$	$-46.0 \pm 1.3; 5.4 \pm 0.1$	$-48.4 \pm 0.7; 5.3 \pm 0.1$
b) $G-V$	$-47.1 \pm 1.3; 5.1 \pm 0.1$	$-49.4 \pm 0.6; 5.1 \pm 0.1$
c) $I-V \div IIV$	$-40.2 \pm 1.3; 8.2 \pm 0.9$	$-42.6 \pm 1.4; 8.1 \pm 0.9$
4) $V_{1/2}$ y $k$ de inactivación (mV)	$-76.4 \pm 1.4; 4.6 \pm 0.1$	$-78.8 \pm 0.7; 4.6 \pm 0.3$
5) $\tau_{act}$ (ms)	$2.8 \pm 0.3$	$2.5 \pm 0.2$
6) $\tau_{inact}$ (ms)	$20.4 \pm 1.0$	$19.3 \pm 0.8$
7) $\tau_{desact}$ (ms)	$3.8 \pm 0.4$	$3.3 \pm 0.3$
8) $\tau_h$ (ms)	$118 \pm 6$	$122 \pm 4$

Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar. 1) Valores a  $-30$  mV; 2)  $V_{inv}$  obtenido del ajuste de las relaciones  $I-V$  con la ecuación de Boltzmann modificada. 3) Parámetros,  $V_{1/2}$  y  $k$ , empleados para el ajuste con la ecuación de Boltzmann de la activación de los canales a partir de los datos de (a) las curvas  $I-V$ ; (b) la ecuación de conductancia cuerda y (c) del cociente  $I-V \div IIV$ . 4) Mismos parámetros para describir la inactivación en el estado estacionario. 5), 6) Constantes de tiempo ( $\tau$ ) de activación e inactivación proporcionadas por el ajuste biexponencial de los trazos de corriente a  $-30$  mV. 7)  $\tau$  de desactivación obtenida con el ajuste exponencial simple de las colas de corriente generadas a  $-100$  mV. 8) Constante de tiempo para la recuperación de la inactivación proporcionada por el ajuste de una exponencial simple a los datos correspondientes (Fig. 17). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con (\*),  $p < 0.05$ . El número de células investigadas fueron 8 para  $\alpha_{1G}$  y 11 para Y514W, excepto en (c) donde fueron 6 y 9; en (7) 5 y 9; y en (8) 7 y 9, respectivamente.

que puede utilizarse para comparar entre diferentes tratamientos experimentales, manteniendo las condiciones de registro constantes. En el presente trabajo, utilizando la Ecuación 1 para ajustar los datos experimentales de la corriente de calcio se observó que los parámetros que determinan la conductancia ( $V_{1/2}$  y  $k$ ) son muy parecidos entre los canales  $\alpha_{1G}$  silvestres y los mutantes Y514W (Fig. 12C y Tabla 3). Al utilizar la Ecuación 2 para calcular los valores de conductancia a cada voltaje se obtuvieron los datos que se muestran en la Fig. 13A. La información presentada en esta figura se obtuvo de las mismas células con las que se construyeron las curvas  $I-V$  de la Fig. 12C. El



**Figura 13. Conductancia y curvas  $I$ - $V$  instantáneas de  $\alpha_{1G}$  y Y514W.** **A)** Relaciones conductancia-voltaje para ambos canales. Los valores de conductancia obtenidos con la Ecuación 2 (véase Métodos) 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. Mismas células de la Fig. 13B. **B)** Colas de corriente representativas obtenidas en respuesta a la aplicación del protocolo que se muestra en la parte inferior de los mismos. Los registros se obtuvieron de una célula HEK-293 transfectada con el cDNA para el canal  $\alpha_{1G}$  silvestre. Para mayor claridad sólo se muestran los trazos obtenidos a -120, -100, -80, -60, -40, -20, 0, 20, 40, 60 y 80 mV. **C)** Curvas  $I$ - $V$  instantáneas. Amplitud promedio de las colas de corriente generadas por los canales  $\alpha_{1G}$  ( $n = 6$ ) y Y514W ( $n = 9$ ) en función del voltaje al cual fueron registradas. La permeación del acarreador de carga a través del canal abierto no se modifica por la mutación Y514W. **D)** Curvas conductancia-voltaje construidas con los datos normalizados obtenidos a partir del cociente  $I$ - $V \div IIV$  para los canales  $\alpha_{1G}$  silvestre y mutante. Mismas células que en panel C. Los datos fueron ajustados con la ecuación de Boltzmann (líneas continuas, Ecuación 3) con los parámetros que se presentan en la Tabla 3. Para fines comparativos se sobreponen los ajustes (líneas punteadas) correspondientes del panel A.

ajuste de los datos experimentales con una función Boltzmann (véase Ecuación 2 en Métodos) arrojó valores de  $V_{1/2}$  y  $k$  muy similares a los obtenidos con la Ecuación 2 (Tabla 3, comparar valores de la 3ª y 4ª líneas de datos). Las diferencias en los valores de  $V_{1/2}$  se limitan a 1 mV entre

los dos diferentes ajustes y alrededor de 2 mV entre los canales  $\alpha_{1G}$  y los Y514W. Estos resultados indican, por un lado, que ambos ajustes proporcionan una estimación muy similar de los parámetros de conductancia macroscópica de la corriente de calcio, aunque se utilice un valor de  $V_{Ca}$  subestimado. Por otra parte, la limitada diferencia entre los valores de  $V_{1/2}$  para la activación de ambos canales ( $\sim 2$  mV, no significativa) sugiere que la mutación de la tirosina por el triptófano en la posición 514 de la secuencia de aminoácidos del canal  $\alpha_{1G}$ , no modifica la dependencia al voltaje de la activación de éste canal (Fig. 13A).

Una tercera aproximación (y probablemente más realista que las anteriores dos) es la de calcular la conductancia a partir del cociente entre los datos de la relación  $I-V$  y los de la curva conocida como  $I-V$  instantánea (Curva IIV; Hodgkin & Huxley, 1952b). Esta última es una medida experimental de la fuerza impulsora que permite al ion  $Ca^{2+}$  permear a través del canal abierto y proporciona información de la forma en que el ion permeante interactúa con el filtro de selectividad del canal (Serrano et al., 1999). El protocolo de voltaje utilizado para construir la curva IIV se esquematiza en la parte baja de la Fig. 13B. El primer pulso de voltaje a +60 mV, es un pulso breve de 2 ms que tiene como finalidad activar, pero no inactivar, a prácticamente todos los canales presentes en la membrana plasmática de la célula de estudio. Posteriormente, se aplica un segundo pulso que fija el potencial de membrana a valores de  $V_m$  desde -120 hasta +80 mV en pasos de +10 mV. Estos pulsos fueron más largos (18 ms) con la finalidad de registrar casi en su totalidad la transición de los canales del estado abierto (como se encuentran al final del pulso a +60 mV) al estado cerrado y/o inactivado promovido por el voltaje del segundo pulso. Los registros de corriente obtenidos mediante este protocolo se conocen como colas de corriente y se generan por el incremento en la fuerza impulsora para la entrada del acarreador de carga (en este caso el  $Ca^{2+}$ ) debido a la repolarización de la membrana, y su curso temporal transitorio indica la velocidad con la que los canales se cierran a un determinado voltaje. La Fig. 13B ilustra registros representativos

obtenidos en respuesta a la aplicación de este protocolo en una célula HEK-293 que expresa canales  $\alpha_{1G}$ . Se puede observar que la corriente durante el pulso despolarizante a +60 mV es prácticamente nula debido a la cercanía con el potencial de inversión de la corriente, aunque la mayoría de los canales hayan sido abiertos por el pulso a +60 mV. Posteriormente, al repolarizar la membrana con el segundo pulso a diferentes valores de  $V_m$ , se incrementa la fuerza impulsora para la entrada de  $Ca^{2+}$  y los canales que se encontraban abiertos al final del pulso a +60 mV conducen corriente de manera transitoria antes de que se cierren, generando así las colas de corriente. Como se puede apreciar en la Fig. 13B, la amplitud de las colas de corriente disminuye conforme el potencial de repolarización es más positivo. Esto se aprecia más claramente en la Fig. 13C en la que se grafica la amplitud promedio de las colas de corriente en función del voltaje del segundo pulso registradas en células transfectadas con canales  $\alpha_{1G}$  y Y514W. Debido a que la cantidad de canales abiertos por el pulso a +60 mV siempre es la misma, la única razón para la disminución en la amplitud de las colas de corriente es el cambio en la fuerza impulsora para el transporte de  $Ca^{2+}$  a través del canal abierto. Por ello, la curva IIV es una estimación experimental de la fuerza impulsora que promueve el transporte del ion  $Ca^{2+}$  a través de los canales en estudio. Se puede observar que la corriente sigue un comportamiento casi lineal (ohmico) a voltajes más negativos que -20 mV; sin embargo a voltajes más positivos que -20 mV, la amplitud de la corriente cambia muy poco, indicando que la interacción del ion con el filtro de selectividad del canal a estos voltajes se hace más compleja. Finalmente, la corriente se vuelve saliente a voltajes entre +40 y +50 mV. Una vez más, ambos canales presentaron el mismo comportamiento para esta característica biofísica.

Tomando en cuenta las consideraciones del párrafo anterior, procedimos a calcular la conductancia dividiendo los valores de corriente obtenidos de las curvas  $I-V$  (Fig. 12B) entre los valores correspondientes obtenidos de las curvas IIV (Fig. 13C). Los valores de conductancia así

obtenidos se normalizaron respecto al valor máximo y se graficaron en función del voltaje respectivo en la Fig. 13D. Los datos experimentales se ajustaron a una función de Boltzmann (Ecuación 3) con los parámetros de  $V_{1/2}$  y  $k$  mostrados en la Tabla 3. Comparando los valores de dichos parámetros con los obtenidos con las otras dos estrategias para determinar la conductancia, resulta que para ambos canales ( $\alpha_{1G}$  y Y514W) el voltaje al cual se alcanza el 50% de la conductancia máxima ( $V_{1/2}$ ) es  $\sim 7$  mV más positivo cuando se calculó mediante el cociente  $I-V \div IIV$ . Con base en los argumentos expuestos anteriormente, concluimos que estos valores son más próximos al comportamiento real de estos canales. Los valores de  $k$ , que determinan el grado de inclinación o pendiente de la relación, también son diferentes con respecto a los otros dos procedimientos con los que se calculó este parámetro (Tabla 3). Este parámetro fue de  $\sim 8$  mV mientras que en los otros se mantuvo cercano a los 5 mV. La diferencia se puede apreciar en la Fig 13D, donde se sobreponen las curvas (ahora punteadas) de la Fig. 13A para fines comparativos. Nótese que la pendiente de las curvas punteadas es más pronunciada que la de las líneas continuas. El hecho de que los valores de  $k$  obtenidos con los primeros dos procedimientos ( $I-V$  y conductancia cuerda) sean muy parecidos puede deberse a que en ambos casos se utiliza el valor de  $V_{Ca}$  determinado experimentalmente por el potencial de inversión de la corriente, lo cual como ya hemos descrito subestima la fuerza impulsora del ion  $Ca^{2+}$ .

Para concluir este apartado, podemos decir que a pesar de su limitación, los parámetros de conductancia calculados a partir de procedimientos que involucran un valor de  $V_{Ca}$ , son útiles cuando se pretende comparar diferentes tratamientos experimentales; sin embargo, el cálculo de los valores de conductancia mediante el cociente  $I-V \div IIV$  es una mejor aproximación del funcionamiento real de los canales, concretamente de los canales de calcio de bajo umbral estudiados en la presente disertación. Finalmente, los resultados obtenidos con los diferentes

procedimientos descritos aquí indican que la mutante Y514W presenta prácticamente la misma dependencia al voltaje para la activación de su conductancia que el canal  $\alpha_{1G}$  silvestre.

### 2.1.3. Cinética de las corrientes generadas por los canales $\alpha_{1G}$ y Y514W

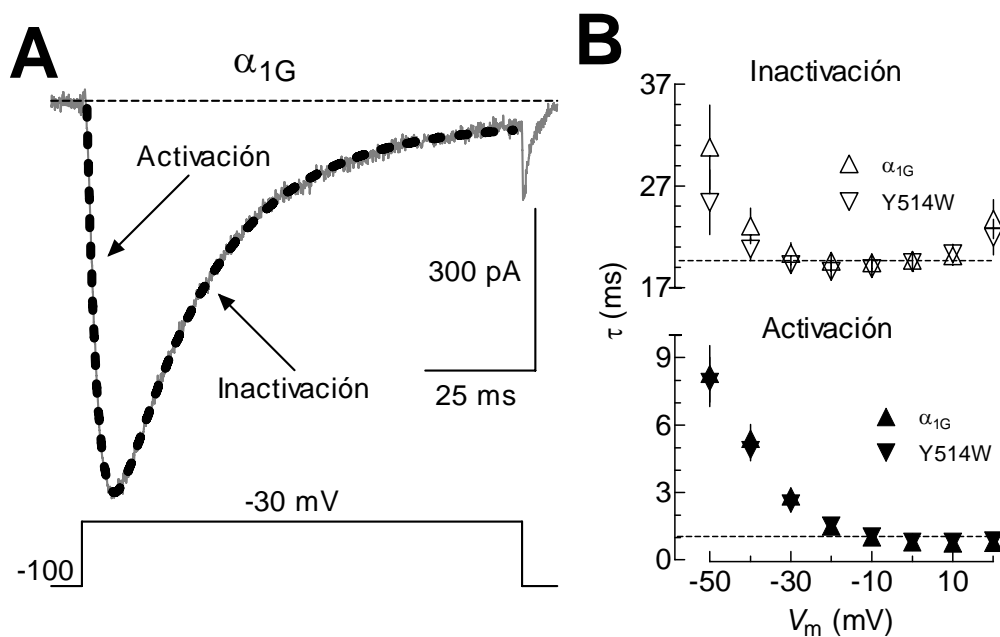
#### 2.1.3.1. Activación e inactivación

Para determinar si la mutación del triptófano en la posición 514 de  $\alpha_{1G}$  modifica el curso temporal con el que se desarrollan los procesos de activación e inactivación de los canales, procedimos a analizar los registros de corriente obtenidos con los protocolos de voltaje utilizados para construir las curvas  $I-V$  (como aquellos que se muestran en la Fig. 12A). Cada uno de los trazos de corriente registrados a los diferentes voltajes (desde -80 hasta +40 mV) fueron ajustados con funciones biexponenciales como se ejemplifica en la Fig. 14A. Una exponencial se ajustó al período de activación (es decir, la fase rápida de la señal de corriente que va de la línea basal al pico máximo de corriente) y otra al período de inactivación (la fase lenta en la que la señal de corriente tiende a regresar a la línea basal). A partir de este ajuste se obtuvieron las constantes de tiempo ( $\tau$ ) de activación e inactivación, mismas que se presentan en función del voltaje en la Fig. 14B. Ninguna de las dos fases de la corriente se modificó de manera significativa por la mutación Y514W (Tabla 3). Para ambos canales, la constante de tiempo de la activación de la corriente fue claramente afectada por el voltaje en el intervalo de -50 a -20 mV, pero a voltajes más positivos (de -20 a +20 mV) la corriente se activó con una constante de tiempo independiente del voltaje cercana a 1 ms. Por su parte, la cinética de inactivación fue menos sensible al voltaje, pues la constante de tiempo respectiva no se modificó de manera sustancial a partir de voltajes más positivos que -40 mV.

No obstante que la cinética de las corrientes generadas por los canales  $\alpha_{1G}$  y Y514W no fue diferente entre una y otra, es importante mencionar que si hubo diferencias en las constantes de tiempo debidas al método de transfección empleado. En general, las corrientes expresadas por las



células transfectadas con Lipofectamina presentaron una cinética más lenta que la de aquellas transfectadas por el método de fosfato de calcio. El efecto se presentó en ambos tipos de canales y fue más evidente en la constante de tiempo de inactivación. Por ejemplo, a  $-30$  mV, la  $\tau$  respectiva fue de  $21.5 \pm 0.8$  ms con Lipofectamina y  $17.4 \pm 0.8$  ms con fosfato de calcio. En comparación, datos no publicados del Dr. Gómora muestran que el valor promedio de la tau respectiva calculada a partir de registros de corriente expresada por células HEK-293 que expresan de manera estable los canales  $\alpha_{1G}$  es de  $15.3 \pm 0.6$  ( $n = 15$ ) cuando se utiliza 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  como acarreador de



**Figura 14. Constantes de tiempo de activación e inactivación de las corrientes expresadas por los canales  $\alpha_{1G}$  y Y514W.** **A)** Trazo de la corriente de calcio registrada a  $-30$  mV en una célula HEK-293 transfectada con canales  $\alpha_{1G}$  silvestres. La línea discontinua indica el ajuste del registro de corriente con una función exponencial doble que describe la fase de activación y de inactivación, como se indica por las flechas. **B)** Constantes de tiempo de activación (parte inferior) e inactivación (parte superior). Las constantes de tiempo se obtuvieron de los ajustes como se muestra en A, a los voltajes indicados en el eje de las abscisas. Mismas células que en la figura 12B.

carga, mientras que cuando se utiliza 10 mM de  $Ba^{2+}$  la cinética es aún más rápida ( $\tau$  de inactivación:  $13.4 \pm 1.7$  ms; Cribbs et al., 2000). A la fecha, no tenemos una explicación para este efecto debido a la Lipofectamina; sin embargo, teniendo en cuenta los trabajos recientes sobre la importancia de los tipos de lípidos en el funcionamiento de los canales dependientes de voltaje (Schmidt et al., 2006), es probable que la mezcla de lípidos contenidos en la Lipofectamina modifiquen el entorno de la proteína del canal reflejándose en el curso temporal con el que se activa e inactiva la corriente. Cualquiera que sea la razón de este efecto, para los fines del presente trabajo las constantes de tiempo promedio de ambos métodos de transfección no fueron diferentes entre los dos tipos de canales. Además, para los experimentos posteriores en los que se estudia el efecto de las subunidades de los canales HVA sobre el canal silvestre y el mutante, todas las transfecciones se realizaron con Lipofectamina para eliminar, la variabilidad debida al método de transfección.

### 2.1.3.2. Desactivación

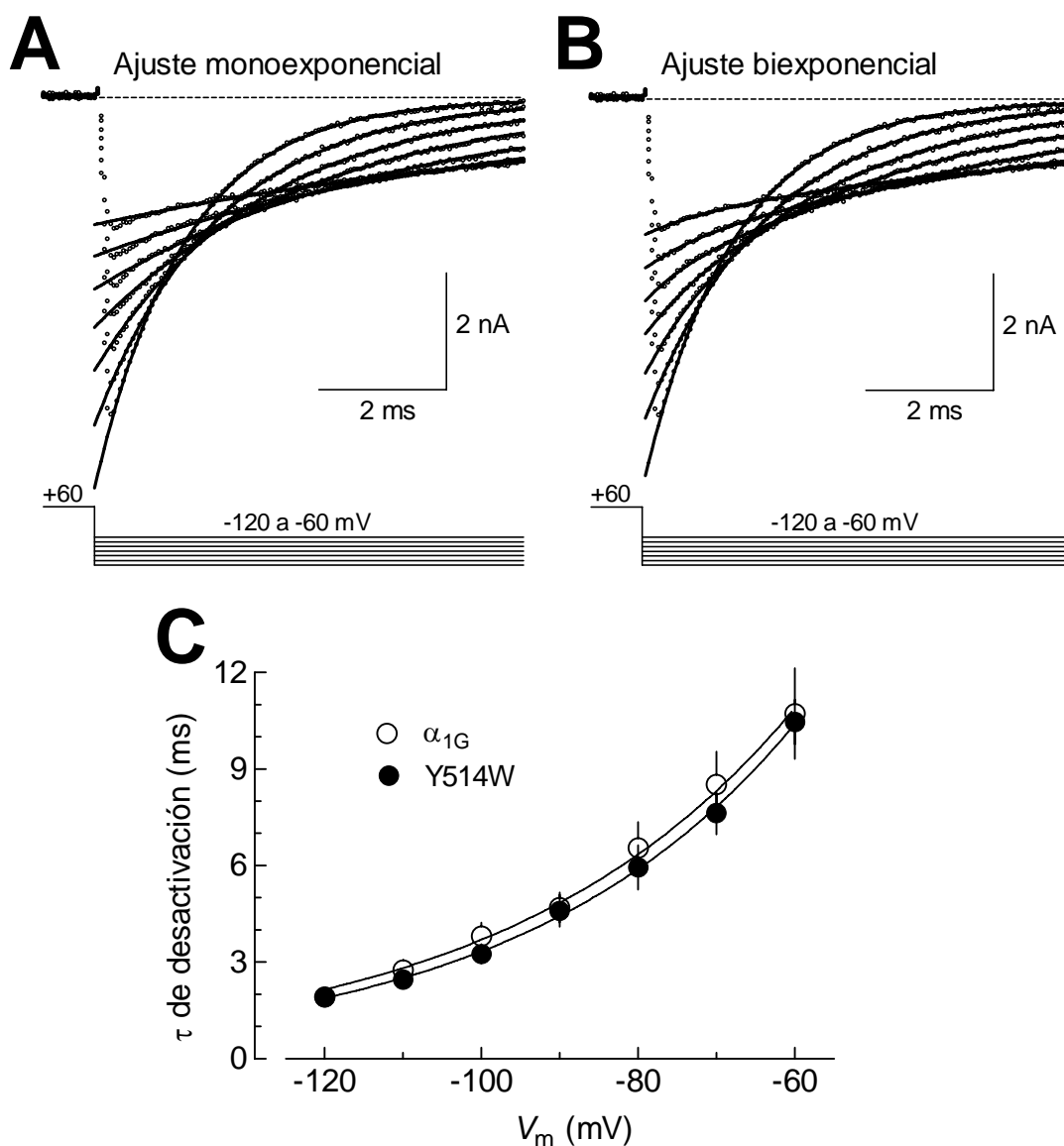
Las colas de corriente registradas para construir las curvas  $I-V$  instantáneas (Fig. 13) también fueron utilizadas para estudiar el curso temporal con el que se cierran los canales (desactivación)  $\alpha_{1G}$  silvestres y determinar si esta característica es modificada por la mutante Y514W.

Debido a la rapidez con la que se desarrollan las colas de corriente, su adquisición requiere de un sistema de fijación de voltaje lo suficientemente rápido de tal manera que no se pierda mucha información durante la captura de la señal de este tipo de corrientes. Como se mencionó previamente en Métodos, los factores que determinan la velocidad del sistema de fijación de voltaje son la capacitancia de la membrana celular ( $C_m$ ), la cual esta directamente relacionada con el tamaño de la célula bajo estudio; y la resistencia en serie ( $R_s$ ) que involucra la resistencia de los electrodos de registro empleados en serie con la resistencia de acceso de la membrana celular. El

producto de  $C_m$  (en pico Faradios, pF) y  $R_s$  (en Mega Ohmios,  $M\Omega$ ) proporciona la constante de tiempo,  $\tau$  (en microsegundos,  $\mu s$ ) que determina la velocidad con la que el amplificador de patch clamp fija un nuevo voltaje en la célula completa. Resulta pues muy deseable que los valores de ambos parámetros sean tan pequeños como sea posible, sobre todo para registrar colas de corriente. En nuestras condiciones experimentales procuramos que dicho producto se mantuviera por debajo de 60  $\mu s$ , cuando excedió este valor, se recurrió al circuito respectivo del amplificador para compensar el valor de  $R_s$  en un 40-60%. Con tales condiciones, logramos que en un tiempo de  $\sim 300 \mu s$  después de haber inducido cualquier cambio en el valor de  $V_m$  éste se hubiera alcanzado en un 99.3%. Además, las colas de corriente se registraron utilizando una frecuencia de corte más alta (10 kHz), en lugar de los 5 kHz que se utilizó para el resto de los registros de corriente. Las colas de corriente así registradas fueron ajustadas con funciones exponenciales utilizando el algoritmo de Chevishev incluido en el programa Clampfit del paquete pClamp 9.2. La región incluida en el ajuste comenzó al pico máximo de la cola de corriente, usualmente a los 0.20 - 0.35 ms después del corte del pulso y se extendió hasta los 15 ms. Las colas de corriente fueron mejor ajustadas con dos exponenciales que con una sola, sobretodo aquellas generadas a voltajes más positivos que -90 mV (Fig. 15A y B). El componente rápido ( $A_1$ ) predominó a potenciales entre -90 y -120 mV, mientras que el componente lento ( $A_2$ ) contribuyó en mayor medida conforme la repolarización progresó hacia voltajes menos negativos. Con la idea de simplificar el análisis de las colas de corriente se calculó una tau ponderada de la siguiente forma:

$$\tau \text{ ponderada} = A_1\tau_1 + A_2\tau_2,$$

donde  $A_1$  y  $A_2$  son la amplitud normalizada de los componentes rápido y lento, mientras que  $\tau_1$  y  $\tau_2$  son las constantes de tiempo respectivas. Previamente se ha mostrado que la tau ponderada es una muy buena aproximación a 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



**Figura 15. Comparación de la tau de desactivación de  $\alpha_{1G}$  y Y514W.** Colas de corriente generadas por canales  $\alpha_{1G}$  a los voltajes indicados, ajustadas con una (A) o dos (B) funciones exponenciales. El protocolo utilizado fue el mismo que se describe en la Fig. 13B, aunque en esta ocasión sólo se muestra 0.8 ms del pulso a +60 mV y 6.7 ms de la repolarización. Con fines ilustrativos, la información de la señal de corriente se redujo de 5 a 1, es decir, cada uno de los puntos vacíos mostrados representa la información de 5 puntos muestreados originalmente. Las líneas continuas son los ajustes exponenciales, mismos que se extrapolaron al tiempo de repolarización. **C)** Tau de desactivación de  $\alpha_{1G}$  ( $n = 5$ ) y Y514W ( $n = 9$ ). Los datos son los promedios de la constante de tiempo ponderada calculada como se indica en el texto (véase pagina 58).

constante de tiempo ponderada así calculados, se graficaron en función del potencial de repolarización y se presentan en la Fig. 15C. No obstante que las colas de corriente se registraron a voltajes desde -120 y hasta +80 mV, en la Fig. 15C se presentan únicamente los datos para el rango de voltajes entre -120 y -60 mV, es decir, los voltajes donde las colas de corriente reflejan exclusivamente el cierre de los canales. A voltajes más positivos (-50 a +80 mV), las colas de corriente incluyen la inactivación de los canales a tales potenciales de membrana. Los resultados presentados en la Fig. 15C indican que la desactivación de los canales  $\alpha_{1G}$  no se modifica por la mutación de la Y por el W en la posición 514.

#### **2.1.4. Inactivación en estado estacionario de $\alpha_{1G}$ y Y514W**

La disponibilidad de los canales dependientes de voltaje para ser activados a los diferentes valores de  $V_m$  por los que transita una célula es una propiedad biofísica que se utiliza para caracterizar el funcionamiento de los canales en estudio. En el presente trabajo investigamos el posible efecto de la mutante Y514W sobre dicha característica de los canales  $\alpha_{1G}$  silvestres. Para tal propósito, utilizamos un protocolo de voltaje de dos pulsos similar al desarrollado por Hodgkin y Huxley (1952c) para determinar la inactivación en estado estacionario dependiente del voltaje de los canales de  $Na^+$ . Brevemente, nuestro protocolo consistió en un largo prepulso de 10 s de duración a diferentes voltajes (desde -110 hasta -40 mV), cuya finalidad es promover la inactivación de los canales, posteriormente, se aplicó un pulso de prueba a -30 mV y 200 ms de duración. La corriente evocada por el pulso de prueba es proporcional a la fracción de canales que no se inactivaron durante el prepulso, es decir, es una medida de la proporción de canales que se encuentran disponibles para ser activados después de un largo período al voltaje del prepulso respectivo.

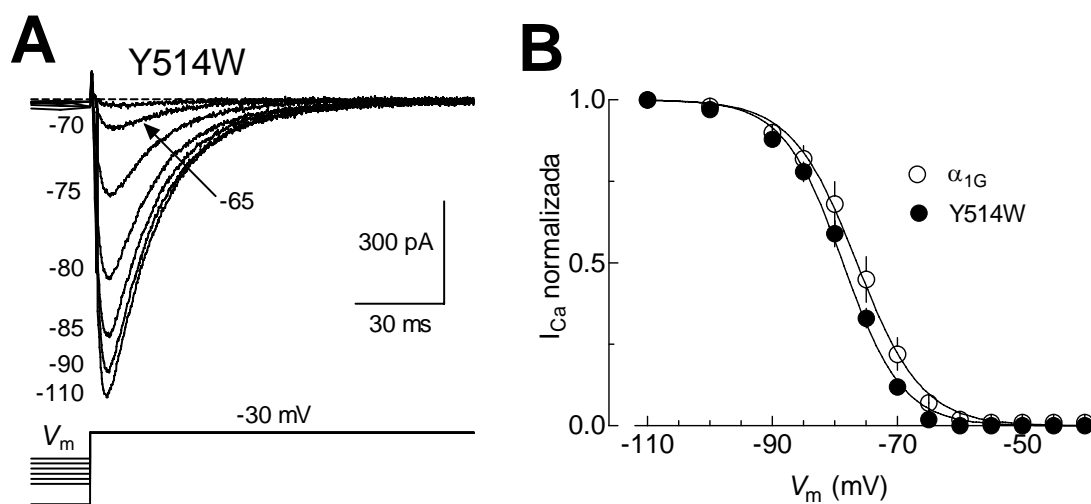
En la figura 16A se muestra una familia típica de corrientes de calcio generada por los canales Y514W en respuesta al mencionado protocolo, mismo que se ilustra en la parte de inferior

de los registros de corriente. Es evidente que la amplitud de la corriente disminuye a medida que el  $V_m$  del prepulso se hace más positivo. La amplitud de la corriente registrada durante el pulso de prueba se normalizó respecto a su máxima amplitud ( $I_{Ca} \div I_{Ca}$  máxima), después se obtuvo el valor promedio de todas las células estudiadas para ambos tipos de canales, y se graficó en función del  $V_m$  del prepulso. El resumen de los resultados se presenta en la Fig. 16B. A simple vista se puede intuir que la inactivación en el estado estacionario es prácticamente la misma para ambos tipos de canales,  $\alpha_{1G}$  y Y514W. Los datos experimentales fueron ajustados con la ecuación de Boltzmann, a partir del cual se concluyó que el voltaje al cual se inactivan el 50% de los canales es 2.4 mV más negativo en los canales mutantes que en el canal silvestre (Tabla 3). Las diferencias entre las medias, no sólo del  $V_{1/2}$  sino también de la pendiente de la relación ( $k$ ), no fueron estadísticamente significativas.

### 2.1.5. Recuperación de la inactivación de $\alpha_{1G}$ y Y514W

La última propiedad biofísica que comparamos entre los canales  $\alpha_{1G}$  silvestres y los mutantes fue el curso temporal de la recuperación de la inactivación. Esta característica es determinante en la excitabilidad celular de diferentes tipos neuronales como las neuronas tálamo-corticales de relevo, cuyo disparo en ráfagas durante la fase delta del sueño depende de la actividad de los canales  $\alpha_{1G}$  (Huguenard, 1996; Kim et al., 2001). Con el objetivo de conocer si la mutación generada en  $\alpha_{1G}$  modifica la recuperación de la inactivación de estos canales, registramos la corriente de calcio a -30 mV antes y después de diferentes intervalos de tiempo comprendidos entre 0.001 y 2 s, en que el  $V_m$  se mantuvo a -100 mV. El primer pulso (prepulso) tiene la finalidad de activar e inactivar los canales que se abren a -30 mV ( $V_m$  al cual se obtiene la máxima amplitud de la  $I_{Ca}$ ), mientras que el segundo pulso (pulso de prueba) nos permite conocer la fracción de corriente que se ha logrado recuperar de la inactivación durante el período de tiempo respectivo a -100 mV. El protocolo junto

con registros representativos de canales Y514W se presentan en la Fig. 17A. En ella se presentan sobrelapados seis registros de corriente, cada uno compuesto por dos señales de corriente a -30 mV. En la primera (a la extrema izquierda), se observa tanto la activación como la inactivación de la  $I_{Ca}$ . Mientras que la segunda sólo incluye la activación y desactivación (ilustrado por las colas de corriente) de la  $I_{Ca}$ . Ambas señales de corriente están separadas por el período de tiempo que se indica arriba de los trazos. El protocolo de voltaje en su totalidad exploró intervalos de tiempo hasta 2 s, aunque a partir de los 0.8 s la corriente se recuperó casi al 100% (es decir, la corriente del segundo pulso fue prácticamente de la misma amplitud que la del primero). Para una mejor



**Figura 16. Inactivación en el estado estacionario de  $\alpha_{1G}$  y Y514W.** **A)** Familia de corrientes de calcio generadas por canales Y514W durante pulsos de 200 ms a -30 mV, después de la aplicación de prepulsos 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, como se indica en el protocolo al pie de la figura. **B)** Curvas de inactivación en estado estacionario. Los datos son el promedio de la amplitud de la corriente de calcio a +30 mV normalizada respecto al valor de corriente máxima. Las líneas continuas son el ajuste con la función de Boltzmann (Ecuación 4, véase Métodos). El número de células estudiadas fue de 8 con canales  $\alpha_{1G}$  silvestres y de 11 con canales Y514W.

apreciación del curso temporal con el que se recuperó la corriente de la inactivación inducida por el primer pulso a -30 mV, en la parte inferior de la Fig. 17A se presentan magnificados los registros de corriente obtenidos durante los pulsos de prueba a -30 mV correspondientes a cada uno de los tiempos indicados. Nótese que después de 40 ms, la fracción de corriente recuperada ya es del 30%, lo que significa que 1 de cada 3 canales inactivados por el pulso a -30 mV, regresa al estado cerrado promovido por el potencial de -100 mV, y en menos de un segundo el 100% de los canales ya se encuentran en posibilidad de ser activados nuevamente. El porcentaje de  $I_{Ca}$  recuperada en función del tiempo que la membrana permaneció a -100 mV se muestra en la Fig. 17B. Los datos se obtuvieron de 9 células HEK-293 transfectadas con canales  $\alpha_{1G}$  y de otro tanto con canales Y514W. Los puntos experimentales se ajustaron con una función exponencial, cuya constante de tiempo ( $\tau_h$ ) fue de  $109 \pm 7$  ms para los canales silvestres y de  $122 \pm 4$  para los mutantes (Tabla 3). Esto indica que la recuperación de la inactivación de los canales  $\alpha_{1G}$  no es afectada por la mutación de la Tyr por el Trp.

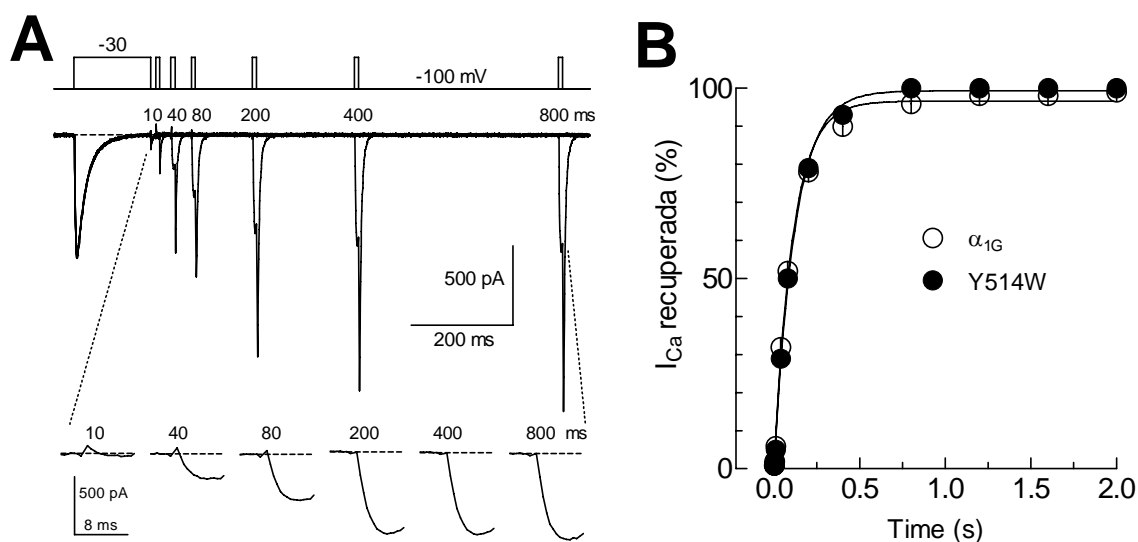
Los resultados presentados en esta primera sección indican que la mutación de la Tyr por el Trp en la posición 514 de la subunidad  $\alpha_{1G}$  no introduce *per se* cambios significativos en las propiedades biofísicas investigadas en el presente trabajo. En consecuencia, la siguiente serie de experimentos se enfocó a investigar si los canales mutantes Y514W pueden ser regulados por las subunidades  $\beta$  de los canales HVA.

## 2.2. Efecto de las subunidades $\beta$ sobre las propiedades biofísicas de los canales $\alpha_{1G}$

A la fecha se conocen cuatro subunidades  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_4$ ) que regulan la actividad de las subunidades  $\alpha_1$  de los canales HVA; sin embargo, como se describió en la Introducción, una gran cantidad de evidencias experimentales indica que las subunidades  $\beta$  no regulan a las subunidades  $\alpha_1$  de los canales LVA. Por otro lado, con base en diferentes tipos de estudios se ha



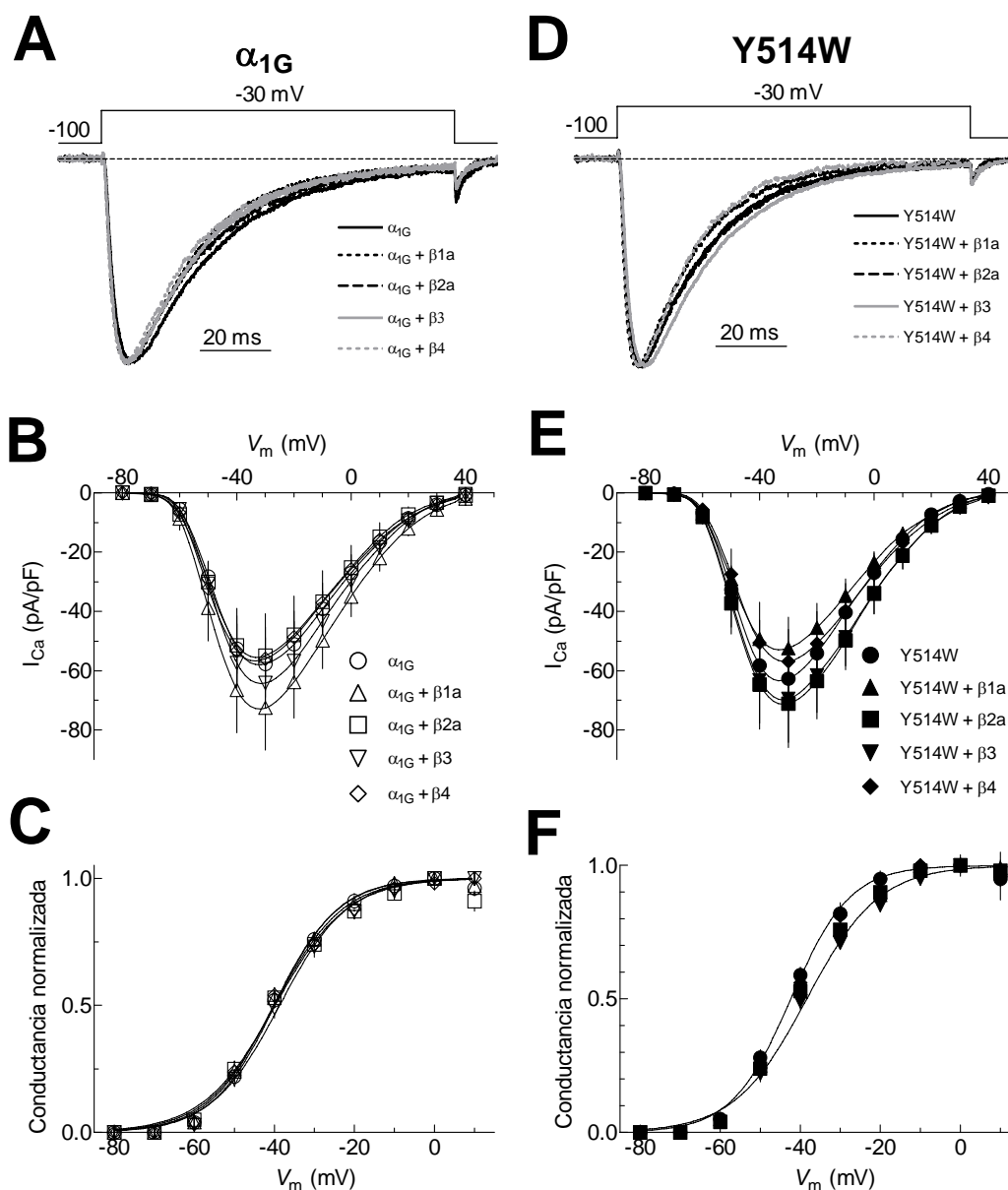
demostrado que el Trp, junto con la Tyr y la Ile, presentes en la región AID de la subunidad  $\alpha_1$  de los canales HVA son cruciales para la regulación por parte de las subunidades  $\beta$ , por ello la mutante que construimos en este trabajo (Y514W) tiene la finalidad de completar dicha serie de tres aa en la región equivalente al AID en la subunidad  $\alpha_1$ , e investigar de esta manera si dicha maniobra le confiere la capacidad de ser regulada por las subunidades  $\beta$  de los canales HVA. Mediante la coexpresión de la mutante Y514W con las diferentes subunidades  $\beta$  con las que contamos en el laboratorio procedimos a determinar el efecto de estas últimas sobre las características biofísicas de los canales que fueron abordadas en la primera parte de este trabajo. Las corrientes de calcio registradas de esta manera se compararon contra aquellas generadas por la coexpresión de la subunidad  $\alpha_{1G}$  silvestre con la correspondiente subunidad  $\beta$ .



**Figura 17. Comparación de la recuperación de la inactivación entre  $\alpha_{1G}$  y Y514W.** **A)** Trazos representativos de corrientes registradas en células HEK-293 que expresan el canal mutante Y514W. 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)** Curso temporal de la recuperación de la inactivación. 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 investigadas fue de 5 para ambos tipos de canales.

En la Fig. 18 y 19 se presenta un resumen de los resultados referentes a la dependencia al voltaje de la activación e inactivación de los canales  $\alpha_{1G}$  silvestres y mutantes en presencia o ausencia de las diferentes subunidades  $\beta$ . Así mismo, las Tablas 4 y 5 condensan los resultados de esta sección de manera cuantitativa. En primer lugar, se puede apreciar en los registros normalizados de corriente a -30 mV, que la cinética de activación e inactivación de ambos canales no sufrió cambios sustanciales por la presencia de las subunidades  $\beta$  (Fig. 18A y D). No obstante que el análisis estadístico indica que las subunidades  $\beta_{1a}$  y  $\beta_4$  aceleran la cinética de inactivación del canal silvestre, mientras que la  $\beta_{2a}$  hace lo mismo con la activación (Tabla 4), dichos cambios (aproximadamente del 20%), son muy discretos comparados con los efectos (mayores del 100%) provocados por las mismas subunidades en los canales HVA (Birnbaumer et al., 1998; Olcese et al., 1994; Wei et al., 1991). En segundo lugar, la densidad de corriente generada por la subunidad  $\alpha_1$  sola fue estadísticamente la misma a la registrada cuando ésta se coexpresó junto con cualquiera de las subunidades  $\beta$  investigadas en el presente trabajo (Fig. 18 B y E). Aunque se presentaron algunas diferencias discretas en la densidad de corriente, ninguna de ellas fue significativa como se puede apreciar en las tablas correspondientes. De manera consistente, la subunidad  $\beta_3$  provocó un pequeño aumento en la corriente por unidad de área de ambos canales. Por lo demás, las características generales de la curva  $I-V$ , es decir, voltaje de activación, voltaje al pico y el  $V_{inv}$ , no se modificaron por la presencia de las subunidades  $\beta$  (Fig. 18B y E; Tablas 4 y 5).

El ajuste con una función Boltzmann de las curvas  $G-V$  construidas con los datos de la Fig. 18B y E, indican que el voltaje al cual se activa el 50% de la corriente es prácticamente el mismo en presencia de cualquiera de las subunidades  $\beta$  (véase Tablas 4 y 5, renglones  $G-V$ ). No obstante, cuando se calculó la conductancia dividiendo los datos de la curva  $I-V$  entre los de la curva  $IIV$  (Fig. 18C y F), se encontró una diferencia significativa de 4.3 mV entre la curva  $G-V$  del canal mutante Y514W sólo y cuando se expresa en presencia de la subunidad  $\beta_3$  (mismas tablas,



**Fig. 18. Activación de la corriente expresada por los canales  $\alpha_{1G}$  en presencia de las subunidades  $\beta$ .** A, D) Trazos típicos de la corriente de calcio registrada a  $-30$  mV en células HEK-293 transfectadas con los cDNAs de las subunidades indicadas por los símbolos. En ambos paneles, los registros se normalizaron respecto al pico máximo de la corriente expresada por los canales  $\alpha_{1G}$  ó Y514W en ausencia de subunidades  $\beta$ . Para mayor claridad algunos de los trazos se muestran con líneas punteadas y en color gris. B, E) Densidad de  $I_{Ca}$  en función del voltaje para cada una de las condiciones experimentales indicadas. Las líneas continuas suaves sólo unen los datos experimentales. Mismas células que en la Fig. 18. C, F) Activación de la conductancia en función del voltaje para las mismas células que en los paneles B y E, respectivamente. Las líneas continuas son el ajuste de los datos experimentales con funciones Boltzmann (Ecuación 3), cuyos parámetros se presentan en las Tablas 4 y 5. En F, únicamente se presentan los ajustes de los datos correspondientes a los canales Y514W y estos mismos en presencia de la subunidad  $\beta_3$ , con el propósito de resaltar la diferencia significativa de los valores de  $V_{1/2}$  entre ambas condiciones (Tabla 5).

renglones I-V ÷ IIV; Fig. 18F). Esta diferencia aunque modesta es consistente con el incremento (no significativo) en la densidad de corriente observada con esta misma subunidad. Nuevamente, es importante aclarar que estos cambios son muy discretos en comparación con los cambios inducidos por estas mismas subunidades en canales HVA, por lo que resulta difícil proponer que dichos cambios sean debidos a una regulación específica por parte de la subunidad  $\beta 3$  hacia el canal mutante.

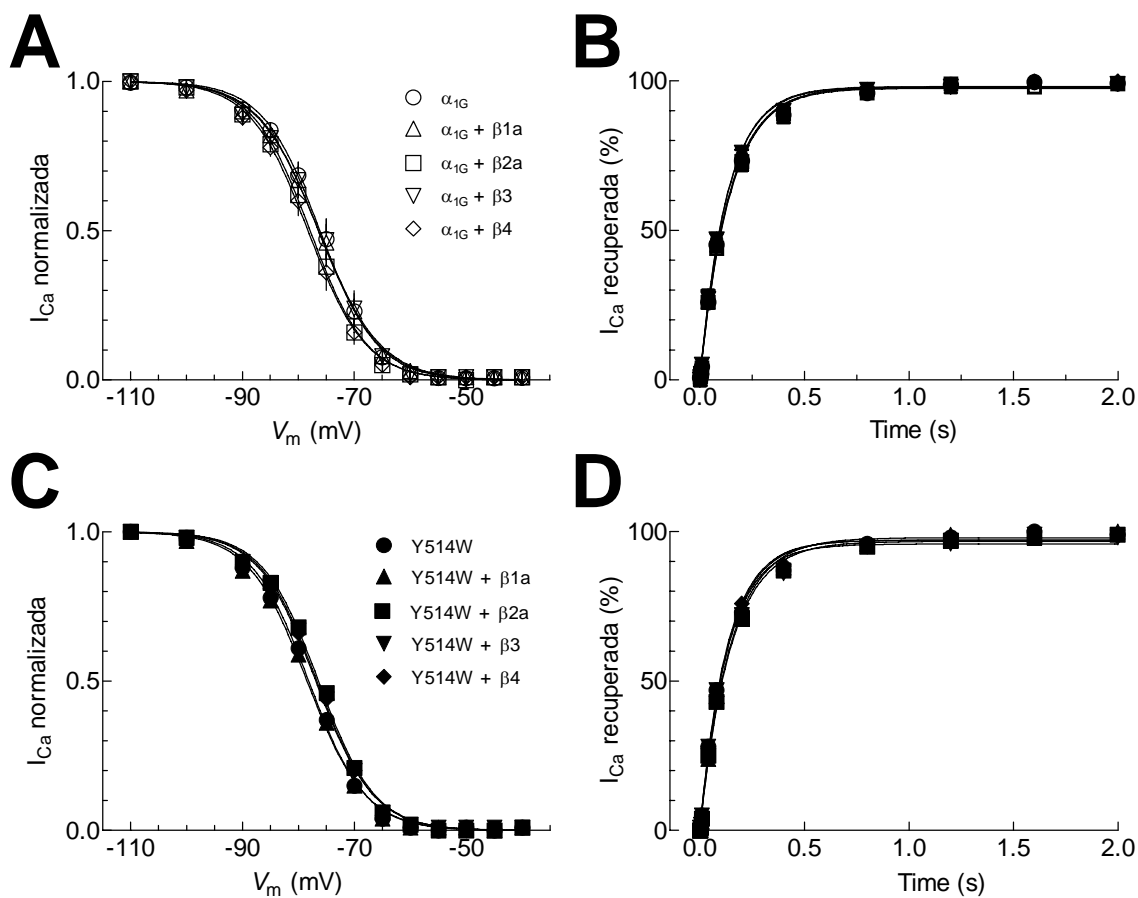
Por otra parte, la diferencia significativa en el  $V_{1/2}$  de activación entre el canal mutante solo y en presencia de la subunidad  $\beta 3$ , únicamente aparece cuando se calcula la conductancia con base a los dos protocolos experimentales (I-V e IIV) y no con los datos de la curva  $G-V$  (Tabla 5, renglón  $G-V$ ). Como ya hemos discutido en la sección anterior, esta última forma de calcular la conductancia de los canales de calcio, es particularmente deficiente, por lo que consideramos que la diferencia observada con los  $V_{1/2}$  obtenidos a partir del procedimiento I-V ÷ IIV refleja más fehacientemente el comportamiento de la conductancia de los canales en cuestión.

En la Fig. 19 se presenta un resumen de los resultados obtenidos al estudiar la inactivación de los canales  $\alpha_{1G}$  silvestre y mutante en presencia de las diferentes subunidades  $\beta$ . Se puede observar que las curvas de inactivación en el estado estacionario de ambos canales no se modificó significativamente por la presencia de las subunidades  $\beta$  (Fig. 19A y C, Tablas 4 y 5). El mismo resultado se observó en el curso temporal con el que ambos canales se recuperan de la inactivación (Fig. 1B y D, Tablas 4 y 5).

En las Tablas 4 y 5 se puede apreciar también que la constante de tiempo con la cual se cierran los canales  $\alpha_{1G}$  silvestres y mutantes ( $\tau_{desact}$ ) no se modificó de manera significativa por la co-expresión con cualquiera de las subunidades  $\beta$ .

### 2.3. Efecto de las subunidades $\alpha_2\delta$

Algunos autores como Dubel y col. (1994) han reportado que la corriente expresada por los canales  $\alpha_{1G}$  se incrementa en un 100% cuando esta subunidad se co-expresa con las subunidades auxiliares  $\beta_{1b}$  y  $\alpha_2\delta_1$  en conjunto. Esto podría sugerir que es necesaria la presencia de ambas subunidades accesorias para ejercer una regulación sobre los canales LVA. Con el objetivo de investigar esta posibilidad, realizamos una última serie de experimentos en los que se transfectaron células HEK-293 con 1  $\mu$ g de cDNA de cada una de las siguientes subunidades:  $\alpha_{1G}$  mutante (Y514W),  $\alpha_2\delta_1$  y la respectiva  $\beta$ . Paralelamente, se transfectaron células HEK-293 con las mismas subunidades pero utilizando la subunidad  $\alpha_{1G}$  silvestre en lugar de la mutante. Además, debido a que en el laboratorio contamos con dos diferentes subunidades  $\alpha_2\delta$  ( $\alpha_2\delta_1$  y  $\alpha_2\delta_2$ ), se realizaron transfecciones para investigar el efecto de cada una de ellas. Los resultados obtenidos a partir de 22 células transfectadas con el canal  $\alpha_{1G}$  silvestre y 24 con el canal mutante Y514W indicaron que aún en presencia de ambas subunidades auxiliares ( $\beta$  y  $\alpha_2\delta$ ), la subunidad  $\alpha_{1G}$  silvestre y mutante no sufren cambios significativos en las propiedades biofísicas de sus corrientes, al menos en aquellas que se estudiaron en el presente trabajo (datos no mostrados).



**Fig. 19. Inactivación de la corriente expresada por los canales  $\alpha_{1G}$  en presencia de las subunidades  $\beta$ .** A, C) Inactivación en el estado estacionario de los canales  $\alpha_{1G}$  y Y514W, respectivamente, en ausencia y presencia de las subunidades  $\beta$  indicadas. Las líneas continuas son el ajuste de los datos experimentales con funciones Boltzmann (Ecuación 3), cuyos parámetros se presentan en las Tablas 4 y 5. B, D) Curso temporal de la recuperación de la inactivación a -100 mV para los canales  $\alpha_{1G}$  silvestres y mutantes. Las líneas continuas son el ajuste de los datos experimentales con funciones exponenciales, cuyos valores de constante de tiempo ( $\tau_h$ ) se presentan en las Tablas 4 y 5. En este caso, el número de células HEK-293 estudiadas en cada condición experimental fue de 6-7 con los canales  $\alpha_{1G}$  silvestres y de 6-8 con los canales Y514W.

Tabla 4. Efecto de las subunidades  $\beta$  sobre las propiedades biofísicas de  $\alpha_{1G}$ 

	$\alpha_{1G}$	$\alpha_{1G} + \beta_{1a}$	$\alpha_{1G} + \beta_{2a}$	$\alpha_{1G} + \beta_3$	$\alpha_{1G} + \beta_4$
1) pA/pF	-57.7 $\pm$ 8.9	-72.6 $\pm$ 14.3	-54.9 $\pm$ 14.1	-64.2 $\pm$ 8.3	-56.0 $\pm$ 10.7
2) $V_{inv}$ (mV)	26.3 $\pm$ 0.6	27.6 $\pm$ 0.5	25.0 $\pm$ 0.8	26.6 $\pm$ 0.6	26.3 $\pm$ 0.8
3) $V_{1/2}$ de activación (mV)					
a) $G-V$	-47.0 $\pm$ 0.9	-46.6 $\pm$ 1.2	-47.8 $\pm$ 1.2	-46.5 $\pm$ 1.1	-47.6 $\pm$ 1.2
b) $I-V \div IIV$	-40.5 $\pm$ 0.8	-41.2 $\pm$ 1.4	-42.1 $\pm$ 1.2	-39.7 $\pm$ 1.5	-41.7 $\pm$ 1.3
4) $V_{1/2}$ de inactivación (mV)	-76.1 $\pm$ 1.0	-76.3 $\pm$ 1.6	-77.9 $\pm$ 0.8	-76.3 $\pm$ 1.5	-78.1 $\pm$ 1.2
5) $\tau_{act}$ (ms)	3.6 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 0.3*	3.4 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.2
6) $\tau_{inact}$ (ms)	23.6 $\pm$ 1.3	19.6 $\pm$ 1.0*	21.8 $\pm$ 0.9	20.5 $\pm$ 1.1	19.5 $\pm$ 1.1*
7) $\tau_{desact}$ (ms)	3.6 $\pm$ 0.3	3.7 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 0.6
8) $\tau_h$ (ms)	139 $\pm$ 5	129 $\pm$ 10	140 $\pm$ 4	131 $\pm$ 6	142 $\pm$ 8

Tabla 5. Efecto de las subunidades  $\beta$  sobre las propiedades biofísicas de Y514W

	Y514W	Y514W + $\beta_{1a}$	Y514W + $\beta_{2a}$	Y514W + $\beta_3$	Y514W + $\beta_4$
1) pA/pF	-62.8 $\pm$ 6.0	-52.5 $\pm$ 6.3	-71.2 $\pm$ 14.9	-69.6 $\pm$ 14.6	-56.9 $\pm$ 14.9
2) $V_{inv}$ (mV)	24.3 $\pm$ 0.7	25.6 $\pm$ 0.4	26.5 $\pm$ 0.8	27.3 $\pm$ 0.5	24.8 $\pm$ 1.6
3) $V_{1/2}$ de activación (mV)					
a) $G-V$	-48.4 $\pm$ 0.9	-48.2 $\pm$ 0.7	-46.5 $\pm$ 1.6	-47.0 $\pm$ 1.2	-46.6 $\pm$ 0.9
b) $I-V \div IIV$	-42.0 $\pm$ 1.0	-38.5 $\pm$ 1.6	-38.1 $\pm$ 1.9	-37.7 $\pm$ 1.2*	-39.2 $\pm$ 1.6
4) $V_{1/2}$ de inactivación (mV)	-78.1 $\pm$ 1.4	-78.4 $\pm$ 1.0	-76.3 $\pm$ 0.8	-76.9 $\pm$ 0.9	-76.8 $\pm$ 1.4
5) $\tau_{act}$ (ms)	3.0 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.4
6) $\tau_{inact}$ (ms)	21.3 $\pm$ 1.4	20.2 $\pm$ 2.2	22.3 $\pm$ 1.4	20.3 $\pm$ 1.2	19.5 $\pm$ 1.6
7) $\tau_{desact}$ (ms)	2.9 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.5	3.4 $\pm$ 0.4	2.9 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.3
8) $\tau_h$ (ms)	133 $\pm$ 6	144 $\pm$ 7	146 $\pm$ 8	131 $\pm$ 9	128 $\pm$ 11

En ambas tablas los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar. 1) Valores a -30 mV. 2)  $V_{inv}$  obtenido del ajuste de las relaciones  $I-V$  con la Ecuación 1. 3) Valores de  $V_{1/2}$  de activación utilizados en el ajuste con la Ecuación 3 a partir de los datos de (a) la ecuación de conductancia cuerda y (b) del cociente  $I-V \div IIV$ . Para fines de claridad, en esta tabla no se presentan los valores de  $k$ , mismos que fueron muy similares a los mostrados en la Tabla 3, y no fueron estadísticamente diferentes entre las diferentes condiciones experimentales. 4) Valores de  $V_{1/2}$  de inactivación en el estado estacionario. 5-8) Taus de activación, inactivación, desactivación y recuperación de la inactivación obtenidas como se describió en la Tabla 3. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con (\*),  $p < 0.05$ . El número de células investigadas osciló entre 6 y 10 para cada condición experimental.

## VII. DISCUSIÓN

Los CCDV son complejos multiproteicos que permiten el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  al interior de las células en respuesta a cambios en el  $V_m$  de las células. Los canales de calcio intervienen en procesos de vital importancia para la célula, no obstante aspectos fundamentales de su estructura y función continúan sin ser entendidos a plenitud. En particular, la regulación de las subunidades  $\beta$  sobre los canales HVA que ha sido ampliamente documentada no ha podido ser claramente evidenciada en los canales LVA. Las razones de ello son varias. En primer lugar, las subunidades  $\alpha_1$  de los canales LVA no contienen la región denominada AID en el asa que une los dominios I y II, la cual es indispensable para la interacción con la subunidad  $\beta$ . En segundo lugar, varios grupos de investigación (incluido el nuestro) han mostrado que la co-transfección de ambas subunidades en sistemas heterólogos de expresión (ovocitos y células de mamífero) no es suficiente para inducir una regulación de la subunidad  $\alpha_1$  por parte de la subunidad  $\beta$ . Los efectos observados se limitan a un incremento (máximo) del 100% en la densidad de corriente registrada en presencia de la subunidad  $\beta$ , sin que las propiedades dependientes de voltaje sufran modificación alguna (Arias et al., 2005; Dolphin et al., 1999; Dubel et al., 2004; Higueldo, 2007; Lacinova et al., 1999; Leuranguer et al., 1998). Comparado con los efectos que producen en los canales HVA, los efectos de las subunidades  $\beta$  sobre la actividad de los canales LVA pueden deberse a un efecto inespecífico o, en el mejor escenario, una regulación parcial por parte de las subunidades  $\beta$ .

Trabajos encaminados a estudiar con mayor detalle la interacción entre las subunidad  $\alpha_1$  y  $\beta$  de los canales HVA han concluido que tres aminoácidos son determinantes para que ésta ocurra. Ellos son la Tyr, el Trp y la Ile, en las posiciones 437, 440 y 441, respectivamente, que forman parte de los 9 aminoácidos conservados en la región AID de todos los canales HVA (De Waard et al., 1996; Pragnell et al., 1994). Notablemente, la subunidad  $\alpha_1$  de los canales LVA contiene la Tyr



y la Ile en una región del asa I-II que puede considerarse equivalente a la región AID de los canales HVA. Por lo cual, en el presente trabajo nos propusimos como objetivo introducir el Trp faltante en dicha región de la subunidad  $\alpha_{1G}$ , unos de los tres canales LVA descritos a la fecha. Nuestra hipótesis de trabajo fue que en presencia de los tres residuos determinantes para la interacción de las subunidades  $\beta$  y  $\alpha_1$  descrita en los canales HVA, deberíamos de observar una regulación del canal  $\alpha_{1G}$  por parte de las subunidades  $\beta$ . A continuación se discuten los resultados obtenidos.

### **1. La subunidad $\alpha_{1G}$ silvestre no es regulada por las subunidades $\beta$**

El primer grupo en proponer la regulación de los canales LVA por parte de las subunidades  $\beta$  de los canales HVA fue el de Lacerda y cols. (1994). Este grupo encontró que en presencia de las subunidades  $\beta_2$  y  $\beta_4$ , la inactivación de la corriente tipo T endógena de ovocitos de *Xenopus* presentaba una cinética más lenta. Años más tarde, dos grupos diferentes reportaron que la depleción de subunidades  $\beta$  con oligonucleótidos antisentido reduce la actividad de los canales HVA sin afectar significativamente la corriente LVA en neuronas y células NG108-15 (Lambert et al., 1997; Leuranguer et al., 1998). Posteriormente, con la clonación de las subunidades  $\alpha_1$  que codifican para canales LVA se han realizado varios estudios para esclarecer esta controversia. Algunos de estos trabajos ya se han discutido en los párrafos anteriores. Lo que es importante resaltar en este apartado es que nuestra primera serie de experimentos de este trabajo de tesis confirma que la subunidad  $\alpha_{1G}$  silvestre no es regulada por ninguna de las cuatro subunidades  $\beta$  empleadas aquí.

### **2. Las propiedades biofísicas del canal $\alpha_{1G}$ no se modifican por la sustitución de la Tyr por el Trp**

El efecto de mutaciones puntuales en la región AID de los canales HVA ha sido bien estudiado y se ha observado que una mutación puntual dentro del AID puede modificar las propiedades biofísicas

del canal cuando se expresa en ausencia de las subunidades  $\beta$  (Cornet et al., 2002; Geib et al., 2002; Gerster et al., 1999), aunque estos efectos no son iguales en todos los canales (Berrou et al., 2005; Dafi et al., 2004). En el caso de los canales LVA, el presente es el primer trabajo que explora el efecto de mutaciones puntuales en la región homóloga al AID de los canales LVA. La mutante construida en el presente trabajo consistió en sustituir la tirosina 514 de esa región por un triptófano. La comparación de las propiedades biofísicas, incluida la densidad de corriente, de los canales  $\alpha_{1G}$  y las de la mutante Y514W, ambas expresadas en células HEK-293, no fueron diferentes significativamente (Tabla 3). De forma interesante, los resultados más recientes de nuestro grupo de trabajo indican que sustituciones de aminoácidos posteriores a la Ile 515 en el canal  $\alpha_{1H}$ , el tercer miembro de la familia de canales LVA, modifica drásticamente la dependencia al voltaje de dicho canal (Arias et al., manuscrito en preparación).

### **3. La mutante Y514W no es regulada por subunidades $\beta$**

El objetivo central del presente trabajo consistió en investigar si la mutación de la tirosina 514 de la subunidad  $\alpha_{1G}$  por triptófano era suficiente para adquirir la capacidad de ser regulado por subunidades  $\beta$  de canales HVA. Nuestros resultados muestran fehacientemente que la densidad de corriente y las propiedades biofísicas de los canales  $\alpha_{1G}$  son estadísticamente iguales cuando se expresan solos o en presencia de las diferentes subunidades  $\beta$  (Tabla 5). Por lo tanto, nuestra hipótesis de trabajo es rechazada y concluimos que la mutación de la tirosina 514 de la subunidad  $\alpha_{1G}$  por triptófano no es suficiente para adquirir la capacidad de ser regulada por las subunidades  $\beta$  de canales HVA.

El único efecto significativo producido por la presencia de las subunidades accesorias fue el producido por la subunidad  $\beta_3$  sobre la dependencia al voltaje de la activación de la conductancia de la mutante Y514W. El voltaje al cual se activa el 50% de la conductancia fue 4.3 mV más

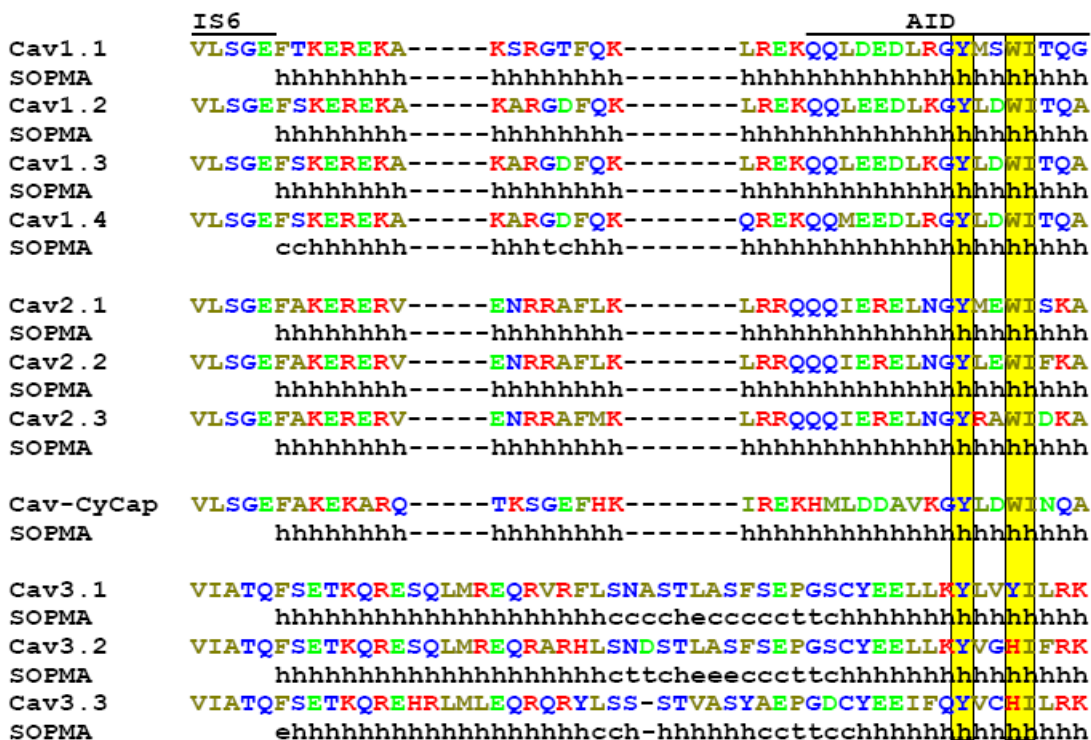
negativo cuando se co-expresaron la mutante y la subunidad  $\beta 3$  en comparación al obtenido cuando la mutante se expresó sola. (Fig. 18F y Tabla 5). No obstante, este efecto, aunque estadísticamente significativo, es modesto en comparación con los efectos de esta misma subunidad en canales HVA. Por ejemplo, en canales  $\alpha_{1E}$  expresados en células HEK-293 y ovocitos de *Xenopus* el pico de la curva  $I-V$ , así como el  $V_{1/2}$  de la inactivación en el estado estacionario se desplaza 15 mV hacia voltajes más negativos (Jones et al., 1998; Olcese et al., 1994). Ambos reportes muestran además incrementos de hasta 500% en la densidad de corriente registrada en presencia de la subunidad  $\beta 3$ . Por lo tanto, el efecto que se reporta en el presente trabajo sobre la dependencia al voltaje de la activación de los canales mutantes Y514W no debe ser considerado como una evidencia definitiva de la modulación de canales LVA por parte de las subunidades  $\beta 3$ .

Experimentos adicionales del presente estudio, en los que se registró la  $I_{Ca}$  de células HEK-293 co-transfectadas con la subunidad  $\alpha_{2\delta}$ , además de las subunidades  $\alpha_1$  y  $\beta$ , indicaron que las propiedades biofísicas de la  $I_{Ca}$  generada por la subunidad  $\alpha_{1G}$  (silvestre y mutante) no sufre modificaciones significativas por la presencia conjunta de las subunidades auxiliares  $\beta$  y  $\alpha_{2\delta}$ . Al igual que con las subunidades  $\beta$ , existen datos en la literatura que sugieren un efecto regulador de las subunidades  $\alpha_{2\delta}$  sobre los canales LVA silvestres, sin embargo, dichos efectos nuevamente se limitan a incrementos en la densidad de corriente menores al 100% (Dolphin et al., 1999; Dubel et al., 2004; Hobom et al., 2000), y en un sólo caso se modificó la dependencia al voltaje de la inactivación 4 mV hacia voltaje mas negativos (Hobom et al., 2000). Es importante mencionar que en este último trabajo las diferencias significativas se observaron con las variante  $\alpha_{2\delta 2a}$  y  $\alpha_{2\delta 2b}$ , pero no cuando se utilizó la subunidad  $\alpha_{2\delta 1}$ . Interesantemente en el presente trabajo utilizamos la subunidad  $\alpha_{2\delta 2c}$ , con la que Hobom no contó para sus experimentos. En resumen, bajo nuestras condiciones experimentales, las subunidades  $\alpha_{2\delta}$  ( $\alpha_{2\delta 1}$  y  $\alpha_{2\delta 2c}$ ) co-transfectadas con las

subunidades  $\beta$ , no indujeron cambios significativos en la  $I_{Ca}$  generada por la mutante Y514W y tampoco en la expresada por la subunidad  $\alpha_{1G}$  silvestre.

#### 4. Papel de la estructura del asa I - II en la regulación de la subunidad $\alpha_1$ por las subunidades $\beta$

Los resultados de la presente tesis de licenciatura indican claramente que la presencia del Trp en la posición 514 del canal  $\alpha_{1G}$  no es suficiente para que sea regulado por las subunidades  $\beta$ . Dicho resultado es un tanto inesperado, pues como se mencionó en la Introducción existen antecedentes que sugieren que la regulación por las subunidades  $\beta$  requiere únicamente de tres aa: la Tyr 437, el Trp 440 y la Ile 441, en las posiciones 437, 440 y 441. Esto se ha observado incluso en el canal de calcio HVA de la medusa, cuya subunidad  $\alpha_1$  presenta una región AID contiene únicamente cuatro de los 9 aa que se conservan en todos los canales HVA de vertebrados, interesantemente, tres de ellos son los aa ya mencionados (Jeziorski *et al.*, 1998). Aún más importante, esta subunidad  $\alpha_1$  sí es regulada por subunidades  $\beta$  de medusa y de mamífero (Jeziorski *et al.*, 1999). Por lo tanto, con la idea de encontrar explicaciones a la falta de dicha regulación, procedimos a analizar con mayor detalle la secuencia de aminoácidos del asa que une los dominios I y II de los canales de calcio. Particularmente la región que une el AID con el segmento S6 del primer dominio (IS6). Para ello, utilizamos un programa de predicción de estructura secundaria de proteínas llamado SOPMA ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)). Los resultados de dicho análisis se presentan en la Fig. 20. El análisis indica que existen diferencias estructurales importantes entre los canales LVA y HVA. Todos los canales HVA incluyendo el de la medusa, presentan una estructura secundaria caracterizada por una  $\alpha$ -hélice continua desde la región del AID hasta el inicio del segmento S6 del dominio I, por el contrario, la estructura secundaria predicha con base en la secuencia de canales LVA, indica que existen dos  $\alpha$ -hélices separadas por



**Fig. 20. Alineamiento del amino terminal del asa I - II de los canales de calcio.** Se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos comprendido entre el segmento S6 del dominio I y la región AID para cada canal (CavX.X), así como la estructura secundaria predicha por el programa SOPMA para cada uno de las secuencias (SOPMA). También se muestra el alineamiento del canal de calcio HVA de invertebrados (Cav-CyCap). h =  $\alpha$ -hélice; c = *hairpin* (tallo y burbuja); t = giro; e = hebra extendida. En los rectángulos amarillos se indican los tres aminoácidos más determinantes (Y, W e I) de la región AID de la subunidad  $\alpha_1$  en la interacción con la subunidad  $\beta$ . Nótese que en los canales LVA (Cav3.1-3.3) el W está ausente.

una estructura conocida como *hairpin* (tallo y burbuja). Los aa que forman dicha estructura en estos canales no se encuentran en los HVA. Por lo tanto, además de las diferencias en secuencia en la

Con base en este análisis, es posible sugerir que la sustitución del Trp por la Tyr en la subunidad  $\alpha_{1G}$  promovió la interacción de ésta con las subunidades  $\beta$  de los canales HVA, pero debido a la ausencia de una  $\alpha$ -hélice continua entre la región AID y el segmento IS6, dicha interacción no se reflejó en cambios significativos de las propiedades biofísicas de los canales mutantes Y514W. Esta nueva hipótesis ha sido abordada (parcialmente) con un trabajo reciente de Arias y cols.

(2005), en el que lograron transferir la regulación por subunidades  $\beta$  de canales HVA a canales LVA mediante la sustitución de la región IS6-AID del canal  $\alpha_{1G}$  por la del canal  $\alpha_{1B}$ . Contrariamente, la regulación no se observó en una quimera que intercambia el AID y la parte carboxilo del asa I-II, es decir, la región que une el AID con el segmento S1 del dominio II (IIS1). Otra evidencia de que la interacción física entre las dos subunidades no es suficiente para que se lleve a cabo la regulación surge del trabajo de Takahashi y cols. (2005), quienes mostraron mediante transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET) que aunque existe la unión entre las subunidades  $\beta$  y el dominio I-II de la subunidad  $\alpha_{1C}$ , las propiedades del canal no sufren mayores modificaciones. En este sentido, será importante investigar si en experimentos de co-transfección como los realizados en el presente trabajo, la subunidad  $\beta$  de canales HVA interacciona o no con el canal mutante, aún y cuando no se manifieste la regulación como tal.

Otro aspecto interesante que muestra el análisis con el programa SOPMA (Fig. 20), es que el canal  $\alpha_{1I}$  es el más parecido a los canales HVA en cuanto a la estructura de dicha región, ya que sólo 6 residuos interrumpen la  $\alpha$ -hélice continua entre la región AID y el segmento IS6. En futuros experimentos resultará importante investigar la posibilidad de que al sustituir los aa que interrumpen la  $\alpha$ -hélice continua por otros que la promuevan, se logre conferir a los tres tipos de canales LVA la regulación por las subunidades  $\beta$ . Además, para constatar que la presencia del Trp (junto con la Tyr 437 y la Ile 441) no es suficiente para conferir la regulación por subunidades  $\beta$  en los canales LVA será necesario realizar las mutaciones correspondientes en las subunidades  $\alpha_{1H}$  y  $\alpha_{1I}$ .

## VIII. CONCLUSIONES

1. El presente trabajo es el primero en utilizar mutaciones puntuales para explorar la posible interacción entre las subunidades  $\alpha_1$  de los canales LVA y las subunidades  $\beta$  de los canales HVA.
2. Mediante la construcción de la subunidad mutante Y514W y la co-transfección de ésta con subunidades  $\beta$  en células HEK-293 se investigó el efecto sobre las propiedades biofísicas del canal mutante.
3. La mutación del Trp por la Tyr en la posición 514 de la subunidad  $\alpha_{1G}$  no modificó el funcionamiento del canal.
4. La mutante Y514W, al igual que la subunidad  $\alpha_{1G}$  silvestre, no es regulada por las subunidades  $\beta$  de los canales HVA. La subunidad  $\beta_3$  fue la única en inducir un cambio significativo en las propiedades biofísicas del canal mutante; concretamente, desplazó la curva de activación (4.3 mV) hacía voltajes más negativos. Este cambio no se acompañó de alteraciones en la densidad de corriente ni en la cinética de las corrientes. Las subunidades  $\alpha_2\delta_1$  y  $\alpha_2\delta_2c$ , solas o en presencia de las subunidades  $\beta$  no regulan el funcionamiento de los canales mutantes Y514W.
5. Los resultados sugieren que además de la presencia de los aminoácidos Tyr, Trp e Ile en la región del AID de la subunidad  $\alpha_{1G}$ , se requiere una estructura secundaria en forma de  $\alpha$ -hélice que una el segmento IS6 y la región AID, para que las subunidades  $\beta$  puedan regular a los canales LVA.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Agnew, W.S., Levinson, S.R., Brabson, J.S., & 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.
- Arias, J.M., Murbartian, J., Vitko, I., Lee, J.H., & Perez-Reyes, E. 2005. Transfer of beta subunit regulation from high to low voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *FEBS Lett* 579:3907-3912.
- Arikath, J. & Campbell, K.P. 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13:298-307.
- Armstrong, C.M. 2007. Life Among the Axons. *Annu Rev Physiol* 69:1-18.
- Bean, B.P. 1985. Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity, and pharmacology. *J Gen Physiol* 86:1-30.
- Bean, B.P. 1989. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 51:367-384.
- Berrou, L., Dodier, Y., Raybaud, A., Tousignant, A., Dafi, O., Pelletier, J.N., & Parent, L. 2005. The C-terminal residues in the alpha-interacting domain (AID) helix anchor CaV beta subunit interaction and modulation of CaV2.3 channels. *J Biol Chem* 280:494-505.
- Berrou, L., Klein, H., Bernatchez, G., & 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* 83:1429-1442.
- Birnbaumer, L., Qin, N., Olcese, R., Tareilus, E., Platano, D., Costantin, J., & Stefani, E. 1998. Structures and functions of calcium channel beta subunits. *J Bioenerg Biomembr* 30:357-375.
- Bootman, M.D., Lipp, P., & Berridge, M.J. 2001. The organisation and functions of local Ca (2+) signals. *J Cell Sci* 114:2213-2222.
- Carbone, E. & Lux, H.D. 1984. A low voltage-activated, fully inactivating calcium channel in vertebrate sensory neurons. *Nature* 310:501-502.
- 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 Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Chen, Y.H., Li, M.H., Zhang, Y., He, L.L., Yamada, Y., Fitzmaurice, A., Shen, Y., Zhang, H., Tong, L., & Yang, J. 2004. Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* 429:675-680.
- Comet, V., Bichet, D., Sandoz, G., Marty, I., Brocard, J., Bourinet, E., Mori, Y., Villaz, M., & De Waard, M. 2002. Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum. *European Journal of Neuroscience* 16:883-895.
- Cribbs, L.L., Gomora, J.C., Daud, A.N., Lee, J.H., & Perez-Reyes, E. 2000. Molecular cloning and functional expression of Ca (v) 3.1c, a T-type calcium channel from human brain. *FEBS Lett* 466:54-58.
- Cribbs, L.L., Lee, J.H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., & Perez-Reyes, E. 1998. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family. *Circ Res* 83:103-109.
- Dafi, O., Berrou, L., Dodier, Y., Raybaud, A., Sauve, R., & Parent, L. 2004. Negatively charged residues in the N-terminal of the AID helix confer slow voltage dependent inactivation gating to CaV1.2. *Biophys J* 87:3181-3192.
- De Waard, M., Scott, V.E., Pragnell, M., & Campbell, K.P. 1996. Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *FEBS Lett* 380:272-276.
- Doering, C.J. & Zamponi, G.W. 2003. Molecular pharmacology of high voltage-activated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:491-505.



- Dolphin, A.C. 2003. Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35:599-620.
- Dolphin, A.C., Wyatt, C.N., Richards, J., Beattie, R.E., Craig, P., Lee, J.H., Cribbs, L.L., Volsen, S.G., & Perez-Reyes, E. 1999. The effect of  $\alpha 2\delta$  and other accessory subunits on expression and properties of the calcium channel  $\alpha 1G$ . *J Physiol* 519 Pt 1:35-45.
- Dubel, S.J., Altier, C., Chaumont, S., Lory, P., Bourinet, E., & Nargeot, J. 2004. Plasma membrane expression of T-type calcium channel  $\alpha 1$  subunits is modulated by high voltage-activated auxiliary subunits. *J Biol Chem* 279:29263-29269.
- Eberst, R., Dai, S., Klugbauer, N., & Hofmann, F. 1997. Identification and functional characterization of a calcium channel gamma subunit. *Pflugers Arch* 433:633-637.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W., & Catterall, W.A. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
- Felix, R., Gurnett, C.A., De Waard, M., & Campbell, K.P. 1997. Dissection of functional domains of the voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel  $\alpha 2\delta$  subunit. *J Neurosci* 17:6884-6891.
- Franciolini, F. & Petris, A. 1989. Evolution of ionic channels of biological membranes. *Mol Biol Evol* 6:503-513.
- Geib, S., Sandoz, G., Cornet, V., Mabrouk, K., Fund-Saunier, O., Bichet, D., Villaz, M., Hoshi, T., Sabatier, J.M., & De Waard, M. 2002. The interaction between the I-II loop and the III-IV loop of Cav2.1 contributes to voltage-dependent inactivation in a beta-dependent manner. *J Biol Chem* 277:10003-10013.
- Gerster, U., Neuhuber, B., Groschner, K., Striessnig, J., & Flucher, B.E. 1999. Current modulation and membrane targeting of the calcium channel  $\alpha 1C$  subunit are independent functions of the beta subunit. *J Physiol* 517 (Pt 2) :353-368.
- Goldin, A.L., Barchi, R.L., Caldwell, J.H., Hofmann, F., Howe, J.R., Hunter, J.C., Kallen, R.G., Mandel, G., Meisler, M.H., Netter, Y.B., Noda, M., Tamkun, M.M., Waxman, S.G., Wood, J.N., & Catterall, W.A. 2000. Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 28:365-368.
- Gomora, J.C., Daud, A.N., Weiergraber, M., & Perez-Reyes, E. 2001. Block of cloned human T-type calcium channels by succinimide antiepileptic drugs. *Mol Pharmacol* 60:1121-1132.
- Gomora, J.C., Murbartian, J., Arias, J.M., Lee, J.H., & Perez-Reyes, E. 2002. Cloning and expression of the human T-type channel  $Ca_v 3.3$ : insights into prepulse facilitation. *Biophys J* 83:229-241.
- Gurnett, C.A., De Waard, M., & Campbell, K.P. 1996. Dual function of the voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel  $\alpha 2\delta$  subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* 16:431-440.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hanlon, M.R. & Wallace, B.A. 2002. Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory beta subunits. *Biochemistry* 41:2886-2894.
- Henderson, R. & Wang, J.H. 1972. Solubilization of a specific tetrodotoxin-binding component from garfish olfactory nerve membrane. *Biochemistry* 11:4565-4569.
- Higueldo, J.F. Efecto de las subunidades beta de los canales HVA sobre el canal Cav3.3. 2007. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, UAEM. México.
- Hille, B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Hobom, M., Dai, S., Marais, E., Lacinova, L., Hofmann, F., & Klugbauer, N. 2000. Neuronal distribution and functional characterization of the calcium channel  $\alpha 2\delta-2$  subunit. *Eur J Neurosci* 12:1217-1226.

- Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. 1952a. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500-544.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. 1952b. The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:473-496.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. 1952c. The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:497-506.
- Huguenard, J.R. 1996. Low-threshold calcium currents in central nervous system neurons. *Annu Rev Physiol* 58:329-348.
- Jan, L.Y. & Jan, Y.N. 1990. A superfamily of ion channels. *Nature* 345:672.
- Jay, S.D., Sharp, A.H., Kahl, S.D., Vedvick, T.S., Harpold, M.M., & Campbell, K.P. 1991. Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel alpha 2-subunit and the associated delta peptides. *J Biol Chem* 266:3287-3293.
- Jeziorski, M.C., Greenberg, R.M., & Anderson, P.A. 1999. Cloning and expression of a jellyfish calcium channel beta subunit reveal functional conservation of the alpha1-beta interaction. *Receptors Channels* 6:375-386.
- Jeziorski, M.C., Greenberg, R.M., Clark, K.S., & Anderson, P.A. 1998. Cloning and functional expression of a voltage-gated calcium channel alpha1 subunit from jellyfish. *J Biol Chem* 273:22792-22799.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., & MacKinnon, R. 2003a. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423:33-41.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., & MacKinnon, R. 2003b. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* 423:42-48.
- Jones, L.P., Wei, S.K., & Yue, D.T. 1998. Mechanism of auxiliary subunit modulation of neuronal alpha1E calcium channels. *J Gen Physiol* 112:125-143.
- Kang, M.G. & Campbell, K.P. 2003. Gamma subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 278:21315-21318.
- Kang, M.G., Chen, C.C., Felix, R., Letts, V.A., Frankel, W.N., Mori, Y., & Campbell, K.P. 2001. Biochemical and biophysical evidence for gamma 2 subunit association with neuronal voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 276:32917-32924.
- Kim, D., Song, I., Keum, S., Lee, T., Jeong, M.J., Kim, S.S., McEnery, M.W., & Shin, H.S. 2001. Lack of the burst firing of thalamocortical relay neurons and resistance to absence seizures in mice lacking alpha (1G) T-type Ca (2+) channels. *Neuron* 31:35-45.
- Klugbauer, N., Lacinova, L., Marais, E., Hobom, M., & Hofmann, F. 1999. Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* 19:684-691.
- Klugbauer, N., Marais, E., & Hofmann, F. 2003. Calcium channel alpha2delta subunits: differential expression, function, and drug binding. *J Bioenerg Biomembr* 35:639-647.
- Lacerda, A.E., Perez-Reyes, E., Wei, X., Castellano, A., & Brown, A.M. 1994. T-type and N-type calcium channels of *Xenopus* oocytes: evidence for specific interactions with beta subunits. *Biophys J* 66:1833-1843.
- Lacinova, L., Klugbauer, N., & Hofmann, F. 1999. Absence of modulation of the expressed calcium channel alpha1G subunit by alpha2delta subunits. *J Physiol* 516 ( Pt 3) :639-645.
- Lambert, R.C., Maulet, Y., Mouton, J., Beattie, R., Volsen, S., De Waard, M., & Feltz, A. 1997. T-type Ca<sup>2+</sup> current properties are not modified by Ca<sup>2+</sup> channel beta subunit depletion in nodosus ganglion neurons. *J Neurosci* 17:6621-6628.

- Leuranguer, V., Bourinet, E., Lory, P., & Nargeot, J. 1998. Antisense depletion of beta-subunits fails to affect T-type calcium channels properties in a neuroblastoma cell line. *Neuropharmacology* 37:701-708.
- Marty, A. and E. Neher. 1995. Tight-seal whole-cell recording. In *Single Channel Recording*. B. Sakmann and E. Neher, editors. Plenum Press, New York. 31-52.
- Matteson, D.R. & Armstrong, C.M. 1986. Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J Gen Physiol* 87:161-182.
- McGivern, J.G. 2006. Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain. *Drug Discov Today* 11:245-253.
- Mitterdorfer, J., Grabner, M., Kraus, R.L., Hering, S., Prinz, H., Glossmann, H., & Striessnig, J. 1998. Molecular basis of drug interaction with L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Bioenerg Biomembr* 30:319-334.
- Noda, M. & Numa, S. 1987. Structure and function of sodium channel. *J Recept Res* 7:467-497.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P., & Tsien, R.W. 1985. Three types of neuronal calcium channel with different agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- Olcese, R., Qin, N., Schneider, T., Neely, A., Wei, X., Stefani, E., & Birnbaumer, L. 1994. The amino terminus of a calcium channel beta subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunit's effect on activation. *Neuron* 13:1433-1438.
- Opatowsky, Y., Chen, C.C., Campbell, K.P., & Hirsch, J.A. 2004a. Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain. *Neuron* 42:387-399.
- Opatowsky, Y., Chomsky-Hecht, O., & Hirsch, J.A. 2004b. Expression, purification and crystallization of a functional core of the voltage-dependent calcium channel beta subunit. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60:1301-1303.
- Perez-Reyes, E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83:117-161.
- Perez-Reyes, E., Cribbs, L.L., Daud, A., Lacerda, A.E., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., & Lee, J.H. 1998. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391:896-900.
- Pragnell, M., De Waard, M., Mori, Y., Tanabe, T., Snutch, T.P., & Campbell, K.P. 1994. Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature* 368:67-70.
- Prommer, E. 2006. Ziconotide: a new option for refractory pain. *Drugs Today (Barc)* 42:369-378.
- Qin, N., Olcese, R., Stefani, E., & Birnbaumer, L. 1998. Modulation of human neuronal alpha 1E-type calcium channel by alpha 2 delta-subunit. *Am J Physiol* 274:C1324-C1331.
- Qin, N., Olcese, R., Zhou, J., Cabello, O.A., Birnbaumer, L., & Stefani, E. 1996. Identification of a second region of the beta-subunit involved in regulation of calcium channel inactivation. *Am J Physiol* 271:C1539-C1545.
- Rafferty, M.A., Hunkapiller, M.W., Strader, C.D., & Hood, L.E. 1980. Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science* 208:1454-1456.
- Randall, A.D. & Benham, C.D. 1999. Recent Advances in the Molecular Understanding of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Mol Cell Neurosci* 14:255-273.
- Richards, M.W., Butcher, A.J., & Dolphin, A.C. 2004. Ca<sup>2+</sup> channel beta-subunits: structural insights AID our understanding. *Trends Pharmacol Sci* 25:626-632.
- Sambrook J and Russell D. 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Sather, W.A. & McCleskey, E.W. 2003. Permeation and selectivity in calcium channels. *Annual Review of Physiology* 65:133-159.
- Schmidt, D., Jiang, Q.X., & MacKinnon, R. 2006. Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature* 444:775-779.
- Serrano, J.R., Perez-Reyes, E., & Jones, S.W. 1999. State-dependent inactivation of the alpha1G T-type calcium channel. *J Gen Physiol* 114:185-201.
- Singer, D., Biel, M., Lotan, I., Flockerzi, V., Hofmann, F., & Dascal, N. 1991. The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 253:1553-1557.
- Strong, M., Chandy, K.G., & Gutman, G.A. 1993. Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability. *Mol Biol Evol* 10:221-242.
- Takahashi, H., Seagar, M.J., Jones, J.F., Reber, B.F., & Catterall, W.A. 1987. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5478-5482.
- Takahashi, S.X., Miriyala, J., Tay, L.H., Yue, D.T., & Colecraft, H.M. 2005. A CaVbeta SH3/guanylate kinase domain interaction regulates multiple properties of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *J Gen Physiol* 126:365-377.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., & Takahashi, H. 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-318.
- Todorovic, S.M., Jevtovic-Todorovic, V., Mennerick, S., Perez-Reyes, E., & Zorumski, C.F. 2001. Ca<sup>v</sup> 3.2 channel is a molecular substrate for inhibition of T-type calcium currents in rat sensory neurons by nitrous oxide. *Mol Pharmacol* 60:603-610.
- Todorovic, S.M., Meyenburg, A., & Jevtovic-Todorovic, V. 2002. Mechanical and thermal antinociception in rats following systemic administration of mibefradil, a T-type calcium channel blocker. *Brain Res* 951:336-340.
- Tsien, R.W., Limpson, D., Madison, D.V., Bley, K.R., & Fox, A.P. 1995. Reflections on calcium channels diversity, 1988-1994. *Trends Neurosci* 18:52-54.
- Van Petegem, F., Clark, K.A., Chatelain, F.C., & Minor, D.L., Jr. 2004. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* 429:671-675.
- Walker, D., Bichet, D., Campbell, K.P., & De Waard, M. 1998. A beta 4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1A subunit. *J Biol Chem* 273:2361-2367.
- Wei, X.Y., Perez-Reyes, E., Lacerda, A.E., Schuster, G., Brown, A.M., & Birnbaumer, L. 1991. Heterologous regulation of the cardiac Ca<sup>2+</sup> channel alpha 1 subunit by skeletal muscle beta and gamma subunits. Implications for the structure of cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *J Biol Chem* 266:21943-21947.
- Weill, C.L., McNamee, M.G., & Karlin, A. 1974. Affinity-labeling of purified acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochem Biophys Res Commun* 61:997-1003.
- Wyatt, C.N., Page, K.M., Berrow, N.S., Brice, N.L., & Dolphin, A.C. 1998. The effect of overexpression of auxiliary Ca<sup>2+</sup> channel subunits on native Ca<sup>2+</sup> channel currents in undifferentiated mammalian NG108-15 cells. *J Physiol* 510 ( Pt 2 ):347-360.
- Yang, J., Ellinor, P.T., Sather, W.A., Zhang, J.F., & Tsien, R.W. 1993. Molecular determinants of Ca<sup>2+</sup> selectivity and ion permeation in L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Nature* 366:158-161.
- Yasuda, T., Chen, L., Barr, W., McRory, J.E., Lewis, R.J., Adams, D.J., & Zamponi, G.W. 2004. Auxiliary subunit regulation of high-voltage activated calcium channels expressed in mammalian cells. *Eur J Neurosci* 20:1-13.