



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“EL ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA-
FUNCIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO
DEPENDIENTES DE VOLTAJE Ca_v3
(CONOCIDOS COMO CANALES TIPO T O LVA)”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. IMILLA ILNAMIQUI ARIAS OLGUÍN

Tutor: Dr. Juan Carlos Gómora Martínez

México, D. F.

2009



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.

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo se dividió en dos partes. La primera de ellas se llevó a cabo en el Departamento de Biofísica del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Gómora Martínez.

La segunda parte del trabajo, se realizó en colaboración con el Dr. Edward Perez-Reyes en su laboratorio del Departamento de Farmacología de la Universidad de Virginia de los Estados Unidos de América (EUA). Además, en esta etapa también se contó con la participación del Dr. Manuel Soriano-García quien pertenece al Departamento de Bioquímica del Instituto de Química de la UNAM.

El Comité tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis doctoral se formó por:

Dr. Juan Carlos Gómora Martínez
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dra. Laura Escobar Pérez
Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Luis Vaca Domínguez
Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Se reconoce la ayuda otorgada por la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, en donde se llevó a cabo la secuenciación automática de algunas de las construcciones usadas en este trabajo.

Se reconoce el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que recibí durante mis estudios de doctorado (No de becario 173795). Así, como al programa de fomento a la graduación de alumnos de posgrado de la UNAM, quien me apoyó con tres meses de beca en la fase final de mi doctorado.

El proyecto fue apoyado parcialmente por el CONACYT (Proyecto J50250Q de J. C. G.) y por el NIH (Proyecto NS038691 de E. P-R).

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN	5
A. Canales de calcio activados por voltaje.....	5
B. Clonación, distribución y relevancia fisiológica de los canales tipo T.....	9
C. Propiedades biofísicas de los canales tipo T.....	10
D. Planteamiento del problema.....	11
II. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	15
A. Hipótesis.....	15
B. Objetivos generales.....	16
III. METODOLOGÍA	18
A. Dicroísmo circular.....	18
B. Mutagénesis dirigida.....	19
C. Construcción de la quimera $GI_{S123-DIII}$	21
D. Expresión de canales $Ca_v3.2$ silvestres y mutantes en células HEK-293.....	21
E. Expresión de canales Ca_v3 silvestres y la quimera $GI_{S123-DIII}$ en células HEK-293.....	21
F. Registros electrofisiológicos con la técnica de patch clamp.....	22
G. Captura y análisis de datos electrofisiológicos.....	22
H. Modelado tridimensional de las mutantes del canal $Ca_v3.2$	24
IV. RESULTADOS	26
1. PRIMERA SECCIÓN: PAPEL DE LA PAPAÍNA Y DE LOS SEGMENTOS S1, S2 Y S3 DEL DOMINIO III EN LA INACTIVACIÓN DE LOS CANALES TIPO T.....	26
A. Efecto de la papaína en la inactivación de los canales tipo T.....	26
B. Papel de la quimera $GI_{S123-DIII}$ en la inactivación de los canales tipo T.....	29
B.1 Construcción de la quimera $GI_{S123-DIII}$	29
B.2 Estudio funcional de la quimera $GI_{S123-DIII}$	32
2. SEGUNDA SECCIÓN. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL FRENO DE LA COMPUERTA UBICADO EN LA REGIÓN INICIAL DEL ASA I-II DEL CANAL $Ca_v3.2$	37
A. Determinación de la estructura secundaria del freno de la compuerta.....	37
B. Caracterización funcional del freno de la compuerta.....	39
C. Delimitación del extremo carboxilo del freno de la compuerta.....	41
D. La relevancia de las α -hélices en el funcionamiento de los canales $Ca_v3.2$	47
E. Importancia estructural del asa en el funcionamiento del freno de la compuerta.....	49
F. Modelado tridimensional del freno de la compuerta del canal $Ca_v3.2$	51
V. DISCUSIÓN	53
1. PRIMERA SECCIÓN: PAPEL DE LA PAPAÍNA Y DE LOS SEGMENTOS S1, S2 Y S3 DEL DOMINIO III EN LA INACTIVACIÓN DE LOS CANALES TIPO T.....	53
2. SEGUNDA SECCIÓN. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL FRENO DE LA COMPUERTA UBICADO EN LA REGIÓN INICIAL DEL ASA I-II DEL CANAL $Ca_v3.2$	55

A. El freno de la compuerta presenta un alto contenido de α -hélices.....	56
B. La α -hélice 2 del freno de la compuerta afecta la actividad de los canales $Ca_v3.2$	56
C. Relevancia de la estructura de las α -hélices del freno de la compuerta.....	58
D. El freno de la compuerta se orienta específicamente con respecto al $Ca_v3.2$	59
E. La región del asa es clave en la conformación del freno de la compuerta.....	60
F. La alteración estructural del freno de la compuerta induce incrementos en la densidad de corriente.....	61
G. Comparación con la función del asa I-II de los canales HVA.....	62
VI. CONCLUSIONES	63
VII. REFERENCIAS	64
APÉNDICE.....	72

RESUMEN

El influjo de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (canales Ca_v) es crucial para varias funciones celulares incluyendo excitabilidad neuronal, contracción muscular, secreción de hormonas y neurotransmisores, diferenciación celular, y expresión génica. 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. Más recientemente se han descubierto nuevos fármacos para el tratamiento del dolor y algunos tipos de epilepsia, cuyo blanco molecular también son los canales Ca_v . Por éstas y otras razones, los canales Ca_v han sido objeto de una gran cantidad de estudios científicos a nivel básico y clínico. Existen dos clases principales de canales Ca_v , los de bajo umbral de activación o LVA (también conocidos como tipo T, y más recientemente como canales Ca_v3); y los de alto umbral de activación o HVA. Los primeros fueron curiosamente los últimos en ser clonados, por lo que el conocimiento acerca de su estructura, y como ésta se relaciona con el funcionamiento del canal, aún es incipiente.

La meta final del presente trabajo de tesis fue la de contribuir al conocimiento de la relación entre la estructura y la función de los canales tipo T, con principal énfasis en dos aspectos: a) identificación de regiones moleculares involucradas en la cinética de inactivación de la corriente generada por estos canales; y b) caracterización estructural y funcional del freno de la compuerta ubicado en el asa intracelular que une los dominios I y II de la subunidad α_1 (asa I-II) del canal $Ca_v3.2$. Para cumplir ambos objetivos se utilizaron los tres canales tipo T clonados de humano a la fecha, $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$, expresados de manera estable o transitoria en células HEK-293; y se emplearon diversas técnicas de biología molecular, así como dicroísmo circular, patch clamp y de modelado de proteínas. Los resultados fueron los siguientes:

1. La diálisis intracelular con la proteasa papaina de células HEK-293 que expresan canales tipo T no modifica la cinética de inactivación de dichos canales; lo que

sugiere que dicho proceso del canal es diferente a como sucede en otros canales, como los de sodio dependientes de voltaje.

2. Los segmentos S1, S2 y S3 del dominio III de la subunidad $\alpha 1$ de los canales tipo T no contribuyen a la cinética de inactivación rápida de los canales $Ca_v3.1$.
3. El asa I-II de los canales $Ca_v3.2$ contiene una estructura formada por dos α -hélices unidas por una pequeña asa que permite una conformación antiparalela entre ambas α -hélices, dicha estructura es referida con el nombre de freno de la compuerta.
4. El freno de la compuerta es un elemento crucial para el funcionamiento normal de los canales $Ca_v3.2$, pues la introducción de modificaciones en las α -hélices o en la región del asa de dicha estructura mediante mutaciones, inserciones o deleciones de aminoácidos, resulta en cambios sustanciales de su funcionamiento.
5. Los modelos estructurales obtenidos a partir de las diferentes mutantes estudiadas, revelaron que la integridad estructural del freno de la compuerta es importante para que los canales tipo T permanezcan cerrados a valores de voltaje cercanos al potencial de reposo característico de las neuronas (es decir, alrededor de -70 mV).

ABSTRACT

Calcium entry through voltage-gated calcium channels (Ca_v channels) plays a key role in several cellular processes such as: neuronal excitability, muscle contraction, hormone and neurotransmitter release, cell differentiation and gene expression. The clinical relevance of these channels is best exemplified by the various classes of anti-hypertensive drugs termed “calcium channel blockers”; in addition, more recently it was introduced the first intrathecal analgesic whose blank is also a Ca_v channel. There are two main classes of Ca_v channels, low voltage-activated (LVA, T-type or Ca_v3 channels), and high voltage-activated (HVA channels). The former were curiously cloned last, about 10 years ago. So, the knowledge about their structure and the relationship of this with channel function is still incipient.

The main goal of this study was to contribute to better understand the structure-function relationship of Ca_v3 channels, focusing in two main aspects, 1) to identify molecular determinants involved in the current inactivation kinetics; and 2) to functionally characterize and to provide insights into the structure of the gating brake localized in the intracellular loop that links domain I and II of the $\alpha1$ subunit of $Ca_v3.2$ channels. To achieve this goal we used the three T-type channels cloned from human so far, $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ and $Ca_v3.3$; and several molecular biology techniques (site directed mutagenesis, overlapping extension PCR, etc.), circular dichroism, structure prediction, homology modeling and patch clamp recordings for the functional analysis. The results were as follows:

Intracellular dialysis with papain of HEK-293 cell lines that were stably transfected with $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ or $Ca_v3.3$ channels did not modify the currents kinetics of inactivation, implying that inactivation process in T-type channels is different from the observed in other channels, like voltage-gated sodium channels.

SI, S2 and S3 transmembrane segments of domain III of $Ca_v3.1$ $\alpha1$ subunit do not contribute to the fast inactivation kinetics of this T-type channel.

The I-II loop of Ca_v3.2 channels contains a structure formed by two α -helices linked by a short loop, which allows the orientation of both helices in an antiparallel manner; this structure is named the gating brake.

The gating brake is a key element for the normal low-voltage activation of Ca_v3.2 channels, because mutations that disrupted the helices, or the loop region, had profound effects on channel gating (including both activation and inactivation voltage dependence, and current kinetics).

Based on *de novo* modeling of the several mutants studied here, it was found that the structural integrity of the gating brake contained within the first 60 amino acids in the I-II loop of Ca_v3.2 channels is critical for maintaining T-type channels closed at the resting membrane potential.

These findings substantially improve our knowledge about the structure-function relationship of Ca_v3 channels and help to explain the role of T-type channels in the pathogenesis of absence epilepsy.

I. INTRODUCCIÓN

Los canales iónicos son proteínas especializadas de la membrana que permiten el flujo de iones. Debido a que los iones presentan carga eléctrica neta, el flujo de iones a través de los canales genera corrientes eléctricas que inducen cambios en el potencial de membrana de las células excitables, tales como neuronas, células de músculo y secretoras (Hille, 2001). Existen diferentes clases de canales iónicos, los que se activan por un cambio en el potencial de membrana (V_m), por un ligando, o bien por cambios en la presión o temperatura. Todos ellos son, en mayor o menor grado, selectivamente permeables a diferentes tipos de iones. El presente trabajo se enfocó al estudio de los canales de calcio tipo T (Ca_v3) que pertenecen a la superfamilia de canales activados por voltaje. Dentro de esta categoría también se encuentran los canales de sodio, de potasio y de cloro (Hille, 2001).

Las bases electrofisiológicas que dieron lugar a gran parte del conocimiento funcional con el que se cuenta hoy en día acerca de los canales iónicos proviene de una serie de trabajos rigurosos realizados hace ya más de 50 años (Hodgkin et al., 1952; Hodgkin & Huxley, 1952a; Hodgkin & Huxley, 1952b; Hodgkin & Huxley, 1952c). A partir de entonces, tal información se ha enriquecido por estudios hechos con las técnicas de patch clamp, de biología molecular y, más recientemente, de cristalografía. Esta última ha revelado la estructura molecular a nivel atómico de algunas de estas proteínas. Sin embargo, el entendimiento de como funciona un canal, en particular de la relación que existe entre la estructura molecular y la función de la proteína, aún no se conoce por completo. En este contexto, el presente proyecto de investigación, tuvo como finalidad aportar información que ayude a entender mejor el mecanismo que subyace a la apertura y cierre de los canales tipo T (familia Ca_v3). En los siguientes apartados se revisarán brevemente los antecedentes respectivos.

A. Canales de calcio activados por voltaje.

En condiciones fisiológicas, las células están expuestas a un fuerte gradiente de calcio cuyas concentraciones extracelulares e intracelulares son alrededor de 2 mM y 100 nM,

respectivamente. Dicha diferencia de concentraciones, cambia cuando un canal de calcio se abre y permite que los iones entren a la célula a favor de su gradiente electroquímico, lo que lleva al incremento transitorio de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$. La entrada de los iones Ca^{2+} es importante porque estos desempeñan una multitud de funciones celulares entre los que se incluyen contracción muscular, neurotransmisión, secreción de hormonas, activación de enzimas, expresión de algunos genes y la modulación de la excitabilidad celular (Hille, 2001; Berridge et al., 2003). De esta manera, la función primordial de los canales Ca_v es acoplar la actividad eléctrica de las células excitables con el desarrollo de las funciones celulares mencionadas previamente. Además, desde hace varias décadas, se ha incrementado el uso en la clínica de fármacos “bloqueadores de canales de calcio” para el tratamiento de enfermedades como la hipertensión (Mitterdorfer et al., 1998). Asimismo, los canales Ca_v también se han involucrado en la sensación del dolor y en enfermedades como la epilepsia (Gomora et al., 2001; Kim et al., 2001; Prommer, 2006; McGivern, 2006; Jevtovic-Todorovic & Todorovic, 2006).

Los canales Ca_v se han clasificado en dos categorías principales dependiendo de sus propiedades farmacológicas, electrofisiológicas y por su similitud en secuencia de aminoácidos: los de alto umbral de activación (HVA) (Carbone & Lux, 1984; Armstrong & Matteson, 1985; Nowycky et al., 1985) y los de bajo umbral de activación (LVA), también conocidos como tipo T (Cribbs et al., 1998; Perez-Reyes et al., 1998; Lee et al., 1999). Estos últimos se abren a potenciales más cercanos al potencial de reposo de las células en comparación a los HVA. En la actualidad, los canales de calcio se designan con base en la nomenclatura propuesta por Ertel y colaboradores (Ertel et al., 2000), en la cual el término Ca_v indica el ión calcio para el cual es selectivo y como subíndice la letra “v” (voltaje) referente al estímulo bajo el cual se abren (Fig. 1).

Los canales de calcio HVA están formados por varias subunidades codificadas por múltiples genes que llevan el nombre de α_1 , $\alpha_2\delta$, β y γ (Randall & Benham, 1999; Catterall, 2000b; Catterall & Few, 2008) mientras que los canales LVA se constituyen únicamente por la subunidad α_1 . Las subunidades α_1 que generan corrientes HVA son

moduladas por las subunidades auxiliares $\alpha 2\delta$, β y γ (Arikkath & Campbell, 2003; Lacinova, 2005). Sin embargo, para el caso de los canales LVA, se ha reportado que la expresión de las subunidades $\alpha 1$ que codifican para estos canales en sistemas heterólogos (células de mamífero o en ovocitos de *Xenopus leavis*) es suficiente para generar corrientes con características muy similares a las nativas (Lee et al., 1999a). Lo anterior, sugiere que las subunidades auxiliares descritas para los canales HVA no modulan la actividad de los canales LVA o tipo T (Lacinova et al., 1999; Arias et al., 2005; Higueldo García, 2007).

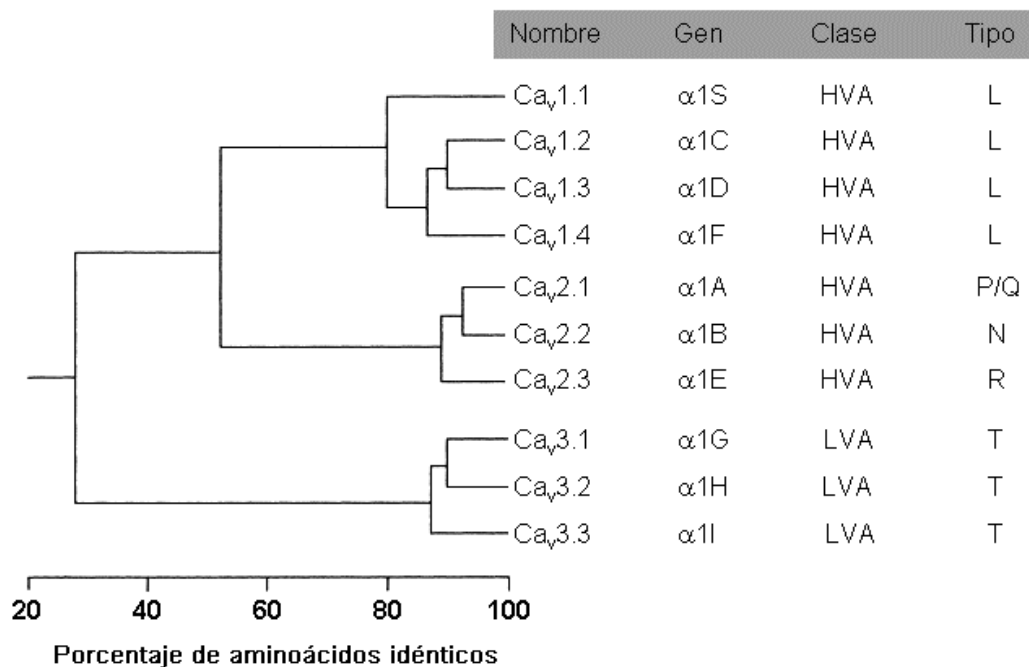


Figura 1. Clasificación y nomenclatura de los canales de calcio dependientes de voltaje. A la fecha se han clonado 10 genes diferentes que codifican para subunidades $\alpha 1$ de canales Ca_v. Los nombres de tales genes obedecieron, inicialmente, al tejido del cual fueron clonados (por ejemplo, $\alpha 1S$ de "skeletal muscle"), y posteriormente, a un orden alfabético (por ejemplo, $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$). De acuerdo a la similitud de su estructura primaria, las distintas subunidades $\alpha 1$ se agrupan en tres familias; Ca_v1, Ca_v2 y Ca_v3; las dos primeras integran la clase de canales HVA y la tercera familia corresponde a los canales LVA. Esquema adaptado de Ertel et al., (2000).

La subunidad α_1 forma el poro hidrofílico que permite el flujo de los iones y se constituye por cuatro dominios homólogos (Tanabe et al., 1987), cada uno de los cuales contiene seis segmentos transmembranales: S1 a S6 (Fig. 2).

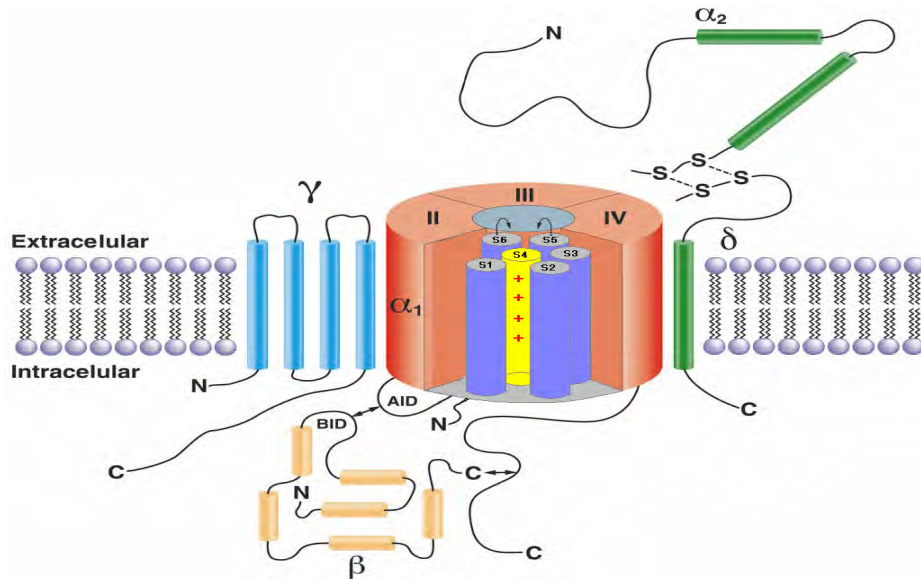


Figura 2. Representación esquemática de la topología de un canal Ca_v . La subunidad α_1 (naranja) consiste de cuatro dominios (I al IV), cada uno de ellos formado por seis α -hélices que atraviesan la membrana (S1 a S6; representados por los cilindros que se encuentran ubicados en el espacio que corresponde al dominio I). El segmento S4 (en amarillo) que contiene varios residuos con carga positiva es el sensor de los cambios en el V_m . Para el caso de los canales HVA, la subunidad β es completamente intracelular y se asocia con la subunidad α_1 a través de la interacción entre el BID y el AID (que por sus siglas en inglés se lee Binding Interaction Domain y Alpha Interaction Domain respectivamente). El AID se ubica en el asa que une los dominios I y II de la subunidad α_1 . La subunidad $\alpha_2\delta_1$ se encuentra anclada a la membrana y la subunidad gamma en el músculo esquelético se ubica de forma transmembranal (Modificada de Randall & Benham, 1999).

Con base en estudios recientes realizados en canales de potasio (Doyle et al., 1998; Jiang et al., 2003; Long et al., 2005; Long et al., 2007), se ha propuesto que los segmentos S5 y S6, además de formar la pared del poro contienen al filtro de selectividad. Por otro lado, el resto de los segmentos (S1-S4) forman el dominio del sensor del voltaje. En particular los S4, que poseen cargas positivas las cuales permiten la detección de los cambios en el potencial de membrana, conducen a la apertura de estos canales. Así, los canales dependientes de voltaje se abren en respuesta a un

pulso despolarizante, se inactivan si se mantiene la despolarización y se cierran cuando se repolariza el potencial de membrana sin permitir el influjo de iones debido a que el canal no se abre (revisado en Tombola et al., 2005; Tombola et al., 2006).

B. Clonación, distribución y relevancia fisiológica de los canales tipo T.

Las primeras evidencias de la existencia de los canales LVA o tipo T, surgieron de estudios electrofisiológicos realizados en huevos de erizo de mar (Hagiwara et al., 1975), neuronas del núcleo olivar (Llinas & Yarom, 1981), neuronas sensoriales (Veselovskii & Fedulova, 1983; Carbone & Lux, 1984) y células cardíacas (Bean, 1985), en las cuales se identificaron corrientes de calcio con propiedades biofísicas distintas a los canales HVA. Sin embargo, el misterio de la identidad molecular de los canales responsables de estas nuevas corrientes de calcio se resolvió hasta hace once años, cuando Perez-Reyes y su grupo clonaron *in silico* a los canales tipo T (Perez-Reyes, 1998; Cribbs et al., 1998; Lee et al., 1999).

De esta manera, se pudo establecer que los canales tipo T son producto de tres genes diferentes: *CACNA1G*, *CACNA1H* y *CACNA1I*, los cuales codifican para los canales $Ca_v3.1$ ($\alpha1G$), $Ca_v3.2$ ($\alpha1H$) y $Ca_v3.3$ ($\alpha1I$), respectivamente. De los tres canales tipo T, $\alpha1G$ fue el primero en ser clonado. Este canal se expresa abundantemente en el cerebro especialmente en el tálamo (Talley et al., 1999; Yunker et al., 2003) y también en tejidos periféricos aunque en una menor proporción (Perez-Reyes et al., 1998; Monteil et al., 2000). El siguiente canal tipo T que se clonó fue $\alpha1H$ a partir de una genoteca de corazón de humano (Cribbs et al., 1998). La expresión de la proteína de este canal se ha encontrado en diversos órganos como corazón, páncreas, riñón, hígado y corteza adrenal (Cribbs et al., 1998; Schrier et al., 2001), así como en neuronas del ganglio de la raíz dorsal y del núcleo reticular del tálamo (Talley et al., 1999). El canal $\alpha1I$ fue el último en ser clonado. Este canal se expresa de manera preferencial en el cerebro (Lee et al., 1999), particularmente en las neuronas del tálamo y en menor abundancia en la médula espinal (Talley et al., 1999).

Si se toma en cuenta la diversidad de tejidos en los que se expresan los canales tipo T, no es de sorprenderse que estos participen en múltiples procesos fisiológicos como el crecimiento de las neuritas (Chemin et al., 2002), en la regulación de la actividad marcapaso en el corazón (Mangoni et al., 2006), en la generación del disparo en forma de ráfagas en las neuronas (Khosravani & Zamponi, 2006), en la liberación de hormonas (Enyeart et al., 1993; Gomora et al., 2000), en la fertilización (Xiao et al., 2006; Darszon et al., 2006), en la regulación de la presión arterial (Chen et al., 2003a) y en la transmisión de señales de dolor (Jevtovic-Todorovic & Todorovic, 2006). Asimismo, a consecuencia de su importante participación en los mencionados procesos fisiológicos, los canales tipo T también se han asociado a fisiopatologías como la epilepsia de tipo ausencia (Heron et al., 2004; Khosravani et al., 2004; Vitko et al., 2005; Peloquin et al., 2006; Vitko et al., 2007), el autismo (Splawski et al., 2006), e incluso en la proliferación celular de algunos tipos de cáncer (Lu et al., 2008; Taylor et al., 2008a; Taylor et al., 2008b).

C. Propiedades biofísicas de los canales tipo T.

El nombre de los canales tipo T obedece a dos de sus características biofísicas que los distingue de los canales HVA: a su pequeña (“*tiny*”) conductancia unitaria que es de alrededor de 8 pS (pico-Siemens) y al curso temporal transitorio (“*transient*”) de sus corrientes macroscópicas debido a su rápida inactivación (Carbone & Lux, 1984). Estos canales también se caracterizan por su activación o apertura a voltajes cercanos al V_m de las neuronas, que es alrededor de -60 mV. Asimismo, su cierre o desactivación se lleva a cabo con un curso temporal exponencial con una constante de tiempo (τ , tau) 10-15 veces más lenta que la de los HVA (Armstrong & Matteson, 1985; Perez-Reyes, 2003). En cuanto a su proceso de inactivación, se puede mencionar que se encuentra acoplado a la activación de los mismos (Carbone & Lux, 1987; Talavera & Nilius, 2006), lo que resulta en un entrecruzamiento de la corriente conforme se despolariza el V_m (Fig. 3A). Dicha característica también la exhiben las corrientes generadas por los canales de sodio dependientes de voltaje, en los que la inactivación es entre 10 y 15 veces más rápida que la de los canales tipo T (Fozzard & Hanck, 1996).

Resulta interesante que entre los distintos tipos de canales tipo T, su cinética de inactivación varía aún bajo las mismas condiciones de registro. Las corrientes de los canales $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$ se inactivan con una constante de tiempo cercana a los 10 ms y las corrientes expresadas por los canales $\alpha 1I$ presentan una tau de alrededor de 80 ms a -40 mV (Fig. 3B).

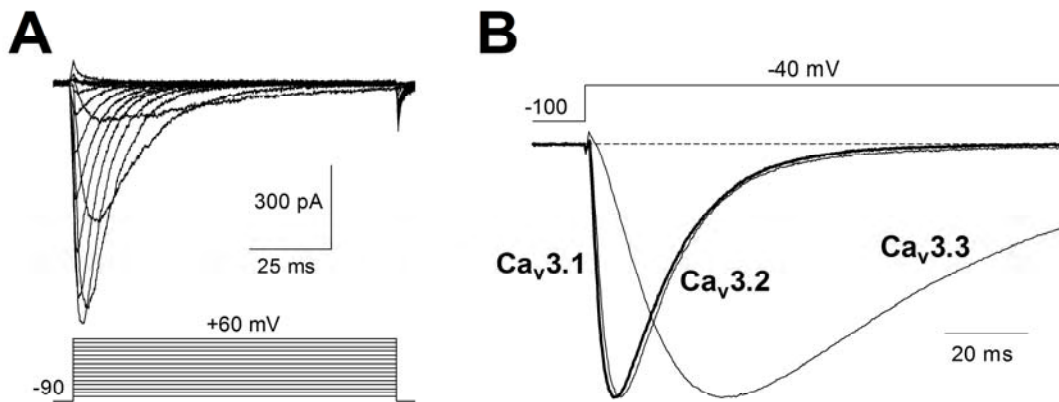


Figura 3. Propiedades biofísicas de las corrientes generadas por canales tipo T. **A**, En este panel se observa el patrón de entrecruzamiento típico de una familia de corrientes de Ba²⁺ que fueron registradas en la configuración de célula completa con la técnica de patch clamp en una célula HEK-293 establemente transfectada con la subunidad $\alpha 1G$ de humano. Los trazos de corriente se evocaron cada 10 s con incrementos de 10 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -90 mV. Figura adaptada de Cribbs et al., (2000). **B**, La figura muestra las diferentes cinéticas que distinguen a las corrientes de los canales tipo T mediante trazos normalizados de corrientes de calcio evocadas por pulsos despolarizantes a -40 mV en presencia de 2 mM de Ca²⁺ como acarreador de carga. Los registros se obtuvieron a partir de células HEK-293 establemente transfectadas con las subunidades $\alpha 1$ de los canales que se indican (datos no publicados de Gómora). Nótese que la cinética de la corriente de los canales $\alpha 1I$ es considerablemente más lenta en comparación con los canales $\alpha 1G$ y $\alpha 1H$.

D. Planteamiento del problema.

Las bases moleculares de la inactivación han sido objeto de un número considerable de estudios acerca de la relación que existe entre la estructura y la función principalmente en los canales de sodio y de potasio (revisado en Catterall, 2000a); (revisado en Tombola et al., 2005; Tombola et al., 2006). Por este motivo, se cuenta con una caracterización muy avanzada de las estructuras moleculares involucradas en el

proceso de inactivación de esos canales, contrario a lo que sucede para el caso de los canales tipo T.

En los canales de sodio el elemento estructural responsable de la inactivación se ubica en el asa intracelular que une los dominios III y IV de la subunidad $\alpha 1$ (Vassilev et al., 1988; Vassilev et al., 1989; Stuhmer et al., 1989). Debido a que estos canales y los de calcio tipo T comparten algunas similitudes en sus propiedades biofísicas, se pensaba que una sola región afectaría la inactivación de los canales tipo T. El primer trabajo que exploró dicha posibilidad fue del grupo de Nilius (Staes et al., 2001), el cual mostró que la inactivación rápida de $\alpha 1G$ (de ratón) se hace más lenta al cambiar los primeros 23 aminoácidos del extremo carboxilo por el segmento correspondiente de la subunidad $\alpha 1C$ ($Ca_v1.2$) el cual es un canal HVA. Estos mismos investigadores encontraron que la sustitución del asa que une los dominios III y IV de $\alpha 1G$ por la de $\alpha 1C$, no afectó a la inactivación de $\alpha 1G$, lo que sugiere que dicha asa en el caso de los canales tipo T, no está vinculada a la inactivación. En otro estudio realizado por Hering y colaboradores (Marksteiner et al., 2001), se demostró que el segmento S6 es importante para la inactivación de $\alpha 1G$ de rata, ya que a través de mutagénesis mostraron que la mutación de los aminoácidos F1511, V1512 y en especial la de M1510 del S6 del dominio III, modifica significativamente la inactivación de dicho canal.

Posteriormente, Lee y su grupo (Park et al., 2004) realizaron quimeras entre $\alpha 1G$ y $\alpha 1I$ de rata para intercambiar el extremo carboxilo terminal, el resto de las asas intracelulares, así como la mitad o tres cuartas partes de estos canales (expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*). Con base en esa estrategia, concluyeron que la inactivación lenta de $\alpha 1I$ no fue completamente abolida por la sustitución de alguna porción de $\alpha 1G$ en particular. Estos resultados sugirieron la posible existencia de diversas regiones involucradas en el proceso de inactivación de los canales de calcio tipo T y no una sola como sucede en los canales de sodio (revisado en Catterall, 2000a). A esta misma conclusión llegaron Zamponi y su grupo (Hamid et al., 2006), al usar clonas de humano y células de mamífero HEK-293 para su expresión.

Por otro lado, para los canales de calcio HVA, se ha identificado al extremo carboxilo terminal y al asa I-II, como dominios intracelulares que controlan la actividad y expresión de estos canales (Zhang et al., 1994; Herlitze et al., 1997; Adams & Tanabe, 1997; Cens et al., 1999; Restituito et al., 2000; Berrou et al., 2001; Stotz et al., 2004). En el asa I-II se localiza el sitio de interacción de la subunidad $\alpha 1$ o dominio AID (del inglés *Alfa Interaction Domain*) (Pragnell et al., 1994). Este dominio se forma por 18 aminoácidos, de los cuales 9 están conservados en todos los canales HVA. Mediante este dominio, la subunidad $\alpha 1$ se une e interacciona con la subunidad β (Opatowsky et al., 2004; Chen et al., 2004; Van Petegem et al., 2004), lo que se traduce en la regulación del funcionamiento de la subunidad $\alpha 1$.

El asa I-II no se había relacionado con la actividad de los canales tipo T hasta apenas recientemente, el grupo del Dr. Perez-Reyes (Arias et al., 2005) obtuvo evidencias de que dicha asa regula la actividad de los canales tipo T o LVA. Estos autores observaron que al intercambiar el asa I-II de un canal LVA por el correspondiente de un canal HVA, la quimera resultante se activó e inactivó a voltajes aún más negativos de lo que sucede en los canales LVA silvestres. Este resultado indicó que el asa I-II de los canales tipo T participa en la apertura y cierre del canal. Dado que la mayoría de las mutaciones encontradas en pacientes con epilepsia de tipo ausencia se localizaron en el asa I-II del canal $Ca_v3.2$ (Chen et al., 2003b), el grupo de Perez-Reyes analizó en detalle el papel de dichos cambios en la función de este canal. Su estudio funcional reveló que la mutación C456S (es decir, el cambio de la cisteína 456 por una serina), ubicada en la región inicial del asa I-II del canal $Ca_v3.2$, también produce un corrimiento en la curva corriente-voltaje (*I-V*) hacia potenciales más negativos (Vitko et al., 2005).

Con base en estos resultados, el grupo de Perez-Reyes realizó una serie de deleciones (eliminación de aminoácidos) en el asa I-II del canal $Ca_v3.2$ (Vitko et al., 2007) y encontraron que la parte central de esta asa está relacionada con el tráfico del canal mientras que la región inicial, podría estar vinculada a la regulación de la actividad de los canales $Ca_v3.2$. Este resultado sugirió que la alteración estructural que se indujo en la región inicial de esta asa, provocó que los canales mutantes se abrieran a valores

más negativos que en el caso de los canales silvestres. También se observó un incremento significativo en la densidad de la corriente, así como una aceleración de las cinéticas de activación e inactivación. Este conjunto de evidencias, sugirieron la existencia de un determinante molecular en el asa I-II, al que posteriormente se denominó “freno de la compuerta”, el cual regula entre otras propiedades biofísicas, la activación dependiente de voltaje de los canales tipo T.

Como lo muestran los antecedentes descritos previamente, aún está por elucidarse en su totalidad los elementos estructurales que afectan la actividad de los canales tipo T. De esta forma, surgió el interés del presente proyecto por entender con mayor profundidad como es que la estructura de los canales tipo T afecta el funcionamiento de estos canales.

II. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A. Hipótesis

Papel de la papaína y de los segmentos S1, S2 y S3 del dominio III en la inactivación de los canales tipo T.

1. Si los canales Ca_v3 presentan un mecanismo de inactivación semejante al descrito para los canales Na_v la hidrólisis enzimática causada por la perfusión intracelular con papaína promoverá la desaparición de la inactivación de los canales Ca_v3 .
2. Si las diferencias en la secuencia de los segmentos S1, S2 y S3 del dominio III entre los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ son relevantes para la inactivación de los mismos, entonces al intercambiar dichos segmentos, los primeros deberán presentar una inactivación más lenta que la usual.

Caracterización estructural y funcional del freno de la compuerta ubicado en el asa I-II del canal $Ca_v3.2$.

3. Si la integridad estructural del freno de la compuerta es importante para prevenir la apertura de los canales $Ca_v3.2$ a valores de voltaje cercanos al potencial de reposo; la alteración de su estructura producirá la apertura de los canales $Ca_v3.2$ a voltajes más negativos de los normales.
4. Debido a que la inactivación de los canales tipo T esta acoplada a su activación, como resultado de la alteración estructural del freno de la compuerta, la dependencia al voltaje de la inactivación de los canales $Ca_v3.2$ se modificará en la misma dirección que la activación.

B. Objetivos generales

1. Identificar determinantes moleculares de la inactivación de los canales tipo T.
2. Determinar la secuencia mínima del freno de la compuerta de los canales $Ca_v3.2$ y aportar evidencias acerca de su posible estructura.

C. Objetivos específicos y estrategia experimental

Para el objetivo general 1:

- 1.1 Utilizar papaína y tripsina para investigar la relevancia de las asas intracelulares en la inactivación de los canales tipo T. Para tal propósito se utilizó la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa, cuya solución interna de registro se suplementó con papaína, a varias concentraciones, y se monitoreó el efecto de la proteasa sobre la corriente de calcio generada por los diferentes canales tipo T expresados en células HEK-293. Para fines comparativos, se realizaron experimentos paralelos con células GH3, en las que el efecto de la papaína sobre la inactivación de la corriente de sodio es bien conocido.
- 1.2 Construir la quimera $Gl_{S123-DIII}$ en la cual se intercambiarán los segmentos S1, S2 y S3 del dominio III de la subunidad $\alpha1G$ ($Ca_v3.1$) por los de $\alpha1I$ ($Ca_v3.3$). Para tal fin, se empleará la técnica de extensión por sobre empalme con PCR utilizando las subunidades $\alpha1G$ y $\alpha1I$ clonadas de humano.
- 1.3 Expresar la quimera en células HEK-293 para estudiar la cinética de inactivación (además de otras propiedades biofísicas) y hacer comparaciones con la de las subunidades $\alpha1G$ y $\alpha1I$ silvestres. Al igual que en el objetivo específico 1.1, se usará la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa, utilizando Ca^{2+} como acarreador de carga en una concentración de 5 mM.

Para el objetivo general 2:

- 2.1 Construir mutantes del canal $Ca_v3.2$ por mutagénesis dirigida para estudiar la estructura de la región inicial del asa I-II, a través de substituciones, inserciones y eliminación de residuos de dicha región del canal $Ca_v3.2$.
- 2.2 Caracterizar las propiedades biofísicas de las mutantes y compararlas con las de los canales $Ca_v3.2$ silvestres. Ambos tipos de canales fueron transfectados en células HEK-293 y su expresión funcional se investigó con la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa.
- 2.3 Construir modelos tridimensionales de la región inicial del asa I-II del canal silvestre y de cada una de las mutantes de $Ca_v3.2$ con Quanta en una Silicon Graphics.

III. METODOLOGÍA

En la primera sección de resultados, se usaron tanto técnicas de biología molecular (extensión por sobre empalme con PCR) como de electrofisiología (patch clamp) y se llevaron a cabo en el laboratorio del Dr. Gómora de la UNAM. Las estrategias experimentales realizadas en el laboratorio del Dr. Perez-Reyes de la Universidad de Virginia, comprendieron el uso de mutagénesis dirigida, patch clamp, dicroísmo circular y análisis bioinformáticos con SOPMA y el MetaServer BioinfoBank. Finalmente, en el laboratorio del Dr. Soriano-García de la UNAM, se emplearon programas de computación como QUANTA y HyperChem 7.1 para construir y realizar la dinámica molecular del modelo estructural del freno de la compuerta y de las mutantes. A continuación se describen cada una de estas técnicas:

A. Dicroísmo circular.

Las predicciones de la estructura secundaria del “freno de la compuerta” se obtuvieron con el programa SOPMA (<http://pbil.ibcp.fr>) y por medio de la base de datos BioinfoBank MetaServer (http://meta.bioinfo.pl/submit_wizard.pl), ambos de libre acceso en Internet. Ambas predicciones se confirmaron mediante un estudio de dicroísmo circular (DC), en el cual, primero se clonó el fragmento de DNA que codifica para los 104 aminoácidos que comprenden a la región inicial del asa I-II del canal de calcio Ca_v3.2 (No. de acceso en el GenBank AF051946) en el vector pMAL-c2x (New England Biolabs Inc., Beverly, MA) para expresarlo como una proteína fusionada a un dominio de unión a maltosa. Para obtener una mayor cantidad de este plásmido (pMAL-c2x-Ca_v3.2-424-528) se procedió a transformarlo con células *E.coli* BL21 (Stratagene, La Jolla, CA). Las clonas positivas fueron seleccionadas por análisis de restricción y se crecieron en medio Luria-Bertani (LB) en presencia de 100 µg/ml de ampicilina. Cuando los cultivos alcanzaron una absorbancia de 0.4 a 600 nm, se indujo la expresión de la proteínas con la adición de 0.5 mM de isopropil tiogalactósido (IPTG) por 2 h a 37°C. Después, se lisaron las células con sonicación ligera y se centrifugaron a 20,000 rpm. El sobrenadante del lisado celular se aplicó a una columna de afinidad de amilosa (New England Biolabs, Inc.) y la proteína de fusión se eluyó con 10 mM de maltosa. Después,

el péptido se escindió del dominio de unión a maltosa con la proteasa Factor Xa y se purificó por FPLC (*fast performance liquid chromatography*) en una columna de exclusión molecular Superdex S200. Al llegar a este punto, se procedió a analizar el péptido por dicróismo circular. Las mediciones se hicieron a partir de una solución fresca del péptido a una concentración de 0.05 mg/ml en presencia de un amortiguador cuya composición era: 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl a pH 7.4, suplementado con 0.17 mM *n*-dodecyl- β -D-malto-piranosido o con 2, 2, 2-trifluoroetanol al 15%. Todos los espectros de DC se obtuvieron en un espectrofotómetro de dicróismo circular AVIV modelo 215 (Aviv Biomedical, Lakewood, NJ) de la Universidad de Virginia en los EUA. Se realizaron tres barridos a 25°C con una resolución de 1 nm. Las señales de DC fueron normalizadas con la señal del blanco y promediadas para analizar el contenido de las estructuras secundarias a partir de los espectros como se ha descrito previamente en otros trabajos (Rohl et al., 1996; Myers et al., 1997).

B. Mutagénesis dirigida.

Todas las mutaciones diseñadas para modificar la estructura del freno de la compuerta se llevaron a acabo mediante la estrategia de mutagénesis dirigida. Primero, se subclonó un fragmento de 1.7 kb (1,700 pares de bases; pb) de la región inicial del asa I-II del canal Ca_v3.2 (número de acceso en el GenBank: AF051946) en el vector pGEM3 (Promega, Madison, WI, EUA), y se le llamó pGEM3-asal-II-Ca_v3.2. La razón para usar este vector fue su tamaño pequeño de 2.8 kb, que facilitó el proceso de inserción de mutaciones puntuales por PCR siguiendo la estrategia de QuikChange (Stratagene, La Jolla, CA, EUA). Por otro lado, a la secuencia del canal Ca_v3.2 se le insertó un segundo sitio de restricción *BspEI* (Vitko et al., 2007) que permitió la clonación de la región inicial del asa I-II con las mutaciones de interés como un fragmento *BspEI*(880)/*BspEI*(2638) en el vector bicistrónico pEGFP-C1-Cav3.2 complete (Clontech, Mountain View, CA). Las mutaciones se realizaron en la construcción pGEM3-asal-II-Cav3.2 mediante PCR usando la DNA polimerasa *Pfu* Ultra (Stratagene, La Jolla, CA) y diferentes oligonucleótidos o *primers* (Invitrogen) cuyo diseño tuvo diferentes fines (Fig. 13): 1. Substituir por alaninas seis aminoácidos a la vez con el objeto de preservar la estructura secundaria de las α -hélices (PA61, PA62, PA63 y PA64; se nombraron

según el orden de construcción, en donde “P” significa poli y “A6” seis alaninas); 2. Substituir por prolinas y glicinas los mismos seis residuos que en las otras mutantes se cambiaron por alaninas para alterar la estructura de las α -hélices (PPG1, PPG2 y PPG4; PPG: poli prolinas-glicinas); 3. Introducir una (H1A1), dos (H1A2) o tres alaninas (H1A3) para alterar la orientación de las α -hélices (los nombres indican el número de alaninas insertadas a la hélice 1); 4. Substituir seis (PA6T1, PA6T2) o doce alaninas (PA6T12) a la vez para transformar por regiones o por completo el asa del freno de la compuerta en α -hélice (PA6: poli alaninas, T1: principio del asa, T2: final del asa y T12: principio y final del asa), 5. Eliminar los trece residuos que forman el asa (DC1) para estudiar el papel de dicha estructura en el funcionamiento global del freno de la compuerta; o para delimitar la secuencia mínima del freno de la compuerta al eliminar en diferentes mutantes, veinticuatro (D2b), diecisiete (D2c), siete (D2d) y ocho (D2e) residuos de la segunda α -hélice. En todos los casos, el diseño de los *primers* incluyó la introducción de un sitio de restricción (cambio silencioso) para poder comprobar la inserción de las mutaciones deseadas por análisis de restricción antes de ser secuenciadas. Las reacciones de PCR usadas para la generación de las mutantes se prepararon en un volumen final de 50 μ l con los siguientes componentes: pGEM3-asal-II-Cav3.2 como templado (50 ng); Buffer ThermoPol 10X (5 μ l); dNTP's (250 μ M); *primers* (125 ng de cada uno); DNA polimerasa *Pfu* Ultra (2.5 U); y la cantidad suficiente de agua destilada para completar 50 μ l. Las reacciones de PCR se realizaron en tres etapas utilizando un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El programa de PCR que se corrió para cada mutante inició con un ciclo de desnaturalización a 94°C por un minuto. Seguido de 18 ciclos consecutivos que incluyeron los siguientes pasos: desnaturalización (15 s a 94°C), alineamiento (30 s a 65°C) y extensión (5 min a 72°C). La tercera etapa del programa consistió en una extensión final de 5 min a 72°C. Cada una de las reacciones fueron tratadas con la enzima *DpnI* por una hora a 37°C para eliminar el DNA silvestre y transformar solo el DNA que lleva la mutación deseada. Se transformaron 3 μ l de cada una de las reacciones de PCR con células competentes One Shot TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para después realizar minipreparaciones con el objetivo de purificar los plásmidos modificados. Es importante mencionar, que cada una de las clonas positivas

fueron verificadas tanto por análisis de restricción como por secuenciación automática de DNA, antes de ligarlas al vector de expresión que tiene la secuencia completa del canal $Ca_v3.2$. Estas construcciones finales también fueron corroboradas por secuenciación automática de DNA.

C. Construcción de la quimera $GI_{S123-DIII}$.

Esta quimera se diseñó para incorporar los segmentos transmembranales no conservados S1, S2 y S3 del tercer dominio de $\alpha1I$ en el canal silvestre de $\alpha1G$ y se construyó con la estrategia de extensión por sobre empalme con PCR (esta técnica se explica con mayor detalle en la primera sección de resultados).

D. Expresión de canales $Ca_v3.2$ silvestres y mutantes en células HEK-293.

Los canales $Ca_v3.2$ silvestres y las mutantes generadas para estudiar la estructura del freno de la compuerta se expresaron en células de riñón de embrión humano (HEK-293) mediante transfecciones transitorias. Las transfecciones se llevaron a cabo en cajas petri de 35 mm de diámetro con una monocapa de células HEK-293 ordinarias aproximadamente al 50% de confluencia en medio DMEM/F-12 (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal de cabra, penicilina G (100 U/ml) y estreptomycin (0.1 mg/ml). Bajo estas condiciones, las células fueron transfectadas con cada uno de los plásmidos que codifican para las mutantes, siguiendo el método de transfección JET-PEI (Qbiogene, Montreal, Canadá). Aproximadamente 24 h después de la transfección, las células fluorescentes fueron seleccionadas para investigar sus propiedades biofísicas con la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa.

E. Expresión de canales Ca_v3 silvestres y la quimera $GI_{S123-DIII}$ en células HEK-293.

En este caso, las células HEK-293 se crecieron en medio DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino, penicilina G (100 U/ml) y estreptomycin (0.1 mg/ml). Se utilizaron vectores de expresión de los canales $Ca_v3.1$ (AF190860), $Ca_v3.3$ (AF393329), de las quimeras y de la proteína verde fluorescente (GFP), la cual sirvió como marcador de las células que se transfectaron. Las co-transfecciones se

realizaron con 3 μg de cDNA del canal en cuestión y 0.2 μg del de la GFP (5:1) mediante el método de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Las células que presentaron fluorescencia se estudiaron en un intervalo de 24 a 72 h después de iniciada la transfección.

F. Registros electrofisiológicos con la técnica de patch clamp.

El estudio de las corrientes iónicas se llevó a cabo utilizando la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa (Hamill et al., 1981; Marty & Neher, 1995). Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente (21-23°C). Los electrodos de registro se fabricaron con capilares de vidrio (TW150-3, WPI, Inc., Sarasota, FL) con la ayuda de un estirador horizontal (Modelo P-97, Sutter Instrument Co., Novato, CA). Posteriormente, se pulieron las puntas de los electrodos al calor con una microforja (MF-830, Narishigue Co., Japón) cuidando que la resistencia de cada uno de ellos estuviera dentro del rango de 2 a 3 $\text{M}\Omega$, una vez llenados con la solución interna de registro. La solución externa de registro estuvo compuesta de: 166 mM TEA-Cl, 5 mM CaCl_2 y 10 mM Hepes, se ajustó el pH 7.4 con TEA-OH (osmolaridad: 300-305 mOsm) y la solución de la pipeta de registro (solución interna) se compuso de: 125 mM CsCl, 10 mM EGTA, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 4 mM Mg-ATP, 0.3 mM Na_3GTP , 10 mM Hepes, pH 7.2 ajustado con CsOH (osmolaridad: 285-290 mOsm). En los experimentos para estudiar el efecto de la papaína y la tripsina sobre la inactivación, la solución de la pipeta de registro se suplementó al momento con 0.5 ó 1 mg/ml de estas proteasas (Sigma, San Louis, MO, EUA).

G. Captura y análisis de datos electrofisiológicos.

El registro de las corrientes transportadas a través de los canales de calcio tipo T se llevó a cabo utilizando un amplificador de patch clamp Axopatch 200A (Axon Instruments, Inc. Foster City, CA, EUA), el cual estuvo conectado a una interfase de marca Digidata 1200 A/D (Axon Instruments, Inc.), y ésta a su vez a una computadora equipada con el software pClamp 9.2 (Molecular Devices,). Con este último se controló la aplicación de pulsos de voltaje a las células y así mismo, se digitalizaron las señales de corriente obtenidas como respuesta a dichas despolarizaciones. Los parámetros

asociados a la configuración de célula completa, es decir, la capacitancia de la membrana, C_m , se canceló y la resistencia en serie, R_s se compensó antes de iniciar propiamente los registros de las corrientes iónicas. Ambos parámetros fueron revisados y reajustados periódicamente dependiendo de cada registro. Las corrientes membranales se digitalizaron en dos canales, uno que restó los componentes capacitivos y de fuga asociados a cada pulso de prueba con el método P/-4, y el otro que registró la corriente cruda generada por las despolarizaciones para monitorear la resistencia del sello y la estabilidad de la célula. Las señales de corriente se filtraron a 2 KHz y se digitalizaron a 5 kHz con el mismo filtro del amplificador de patch clamp, las cuales se digitalizaron con la interfase y se almacenaron en el disco duro de la computadora para su análisis. Dichos datos electrofisiológicos se analizaron y graficaron utilizando el software de pClamp 9.0 (Clampfit) en combinación con el programa Prism 4.0 (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Los datos experimentales de las curvas corriente voltaje ($I-V$) se ajustaron con la siguiente ecuación de Boltzmann modificada:

$$I_{Ca} = G_{max} (V_m - V_{inv}) / (1 + \exp ((V_{50} - V_m) / k)) \quad (\text{Ecuación 1})$$

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

Para analizar la dependencia al voltaje de la activación de la corriente de Ca^{2+} se calculó la conductancia a cada voltaje explorado utilizando la ecuación que toma en cuenta a la fuerza impulsora, y que se conoce como conductancia cuerda:

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

donde G es la conductancia, I_{Ca} es la corriente al pico, V_m es el valor de voltaje con el que se obtuvo la corriente y V_{inv} es el potencial de inversión. Los valores de G se

normalizaron respecto al valor de C_m de cada célula, para evitar errores debidos al tamaño celular.

Los datos de inactivación en el estado estacionario de los canales LVA (véase Figura 10) se ajustaron con una función de Boltzmann de la siguiente forma:

$$I_{Ca} = I_{max} / (1 + \exp ((V_m - V_{50}) / k)) \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde V_m es el potencial de membrana, V_{50} es el voltaje al cual el 50% de los canales se encuentran inactivados y k es la pendiente.

El curso temporal de las corrientes registradas a los diferentes voltajes se analizó ajustando con dos exponenciales, la primera describe la fase de activación y la segunda, la inactivación de la corriente.

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 y en algunos casos por análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue inferior a 0.05.

H. Modelado tridimensional de las mutantes del canal $Ca_v3.2$.

La construcción del modelo del freno de la compuerta del asa I-II del canal $Ca_v3.2$ junto con los modelos de las dieciocho mutantes de esta región, fueron construidos *de novo* (es decir, sin tomar como referencia ningún otro modelo) con el programa QUANTA (Molecular Simulations Inc./Accelrys Inc. San Diego, CA, EUA) en una computadora Silicon Graphics. La región que se modeló comprendió al segmento transmembranal IS6 y la región inicial del asa I-II del canal $Ca_v3.2$ silvestre (aminoácidos 394-497).

En un paso posterior a la construcción de los modelos, cada uno de éstos fue sometido a ciclos de Dinámicas Moleculares (MD que se lee Molecular Dynamics por sus siglas en inglés) para obtener el modelo de la estructura con mínima energía. Las simulaciones se realizaron con el programa computacional HYPERCHEM 7.1 (Hypercube, Inc.), en donde cada modelo fue sometido a una minimización de su energía. Esto se logró con pocos ciclos y aplicando las condiciones adecuadas (100 kcal mol⁻¹) para estabilizar la conformación del esqueleto protéico. De esta forma fue posible llegar al mínimo de energía óptimo, el cual se alcanzó cuando hubo una diferencia energética de 0.01 kcal mol⁻¹ entre los ciclos sucesivos. Finalmente, la conformación adecuada de los modelos fue confirmada con la gráfica de Ramachandran.

IV. RESULTADOS

1. Primera Sección: Papel de la papaína y de los segmentos S1, S2 y S3 del dominio III en la inactivación de los canales tipo T.

Para explorar la posibilidad de que el elemento estructural responsable de la inactivación de los canales tipo T, se pudiera encontrar en una asa intracelular como sucede en los canales de sodio y potasio; primero se estudió si la hidrólisis causada por proteasas podrían remover la inactivación tal y como se describió para los canales de sodio (Armstrong et al., 1973; Vandenberg & Horn, 1984; Cota & Armstrong, 1989) y de potasio (Hoshi et al., 1990). Después, en un segundo paso, se realizaron alineaciones entre las secuencias de aminoácidos de las subunidades $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$ de humano con el fin de conocer las regiones no conservadas y así intercambiarlas entre dichos canales por medio de la construcción de quimeras.

A. Efecto de la papaína en la inactivación de los canales tipo T.

La primera serie de experimentos encaminados a investigar el mecanismo de inactivación de los canales tipo T comprendió la adición de papaína (0.5 y 1 mg/ml) en la pipeta de registro de patch clamp para determinar su posible efecto sobre la inactivación de los canales tipo T. Los experimentos electrofisiológicos se realizaron con la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa (con 5 mM de Ca^{2+} como acarreador de carga) en células HEK-293 que expresaron canales tipo T recombinantes. Para fines comparativos, paralelamente se realizaron experimentos similares con células GH3 (amablemente donadas por el Dr. Gabriel Cota, Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Cinvestav-IPN), que expresan de forma endógena canales de sodio dependientes de voltaje (Dubinsky & Oxford, 1984; Matteson & Armstrong, 1984). El efecto que se obtuvo al exponer a los canales de sodio a 1 mg/ml de papaína se pueden observar en el panel A de la figura cuatro; en ésta se muestran los registros de la corriente de sodio (I_{Na}) obtenida a 0 mV al momento de establecer la configuración de célula completa ($t = 0$) y a los ocho minutos ($t = 8$).

El experimento del panel A, confirma que después de un periodo de tiempo, la inactivación rápida de la I_{Na} desaparece y por lo tanto, su amplitud aumenta considerablemente (Armstrong et al., 1973; Cota & Armstrong, 1989). En el panel B, se trazó la amplitud de la I_{Na} a los diferentes voltajes explorados a tres tiempos de incubación con papaína. En esta gráfica se puede observar que el voltaje al cual se alcanzó la corriente máxima, se desplaza hacia voltajes más negativos como resultado de la eliminación de la inactivación rápida de dichos canales.

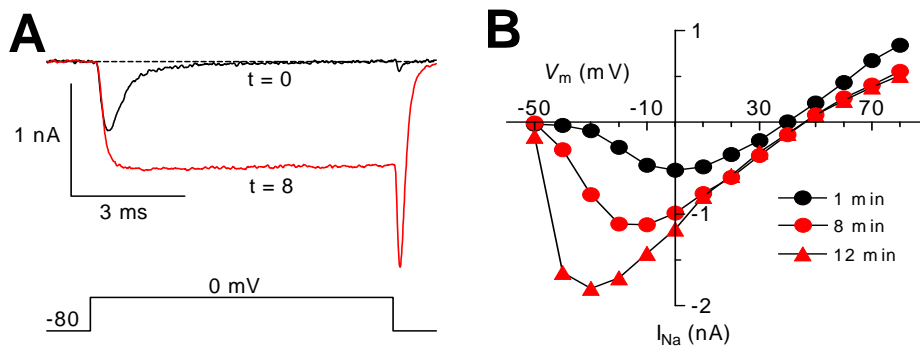


Figura 4. Remoción de la inactivación en la I_{Na} de células GH3 por papaína. **A**, Trazos representativos de la I_{Na} obtenidos al tiempo cero (trazo negro) y a los ocho minutos (trazo rojo), después de establecida la configuración de célula completa. La solución de la pipeta de registro contenía 1 mg/ml de papaína. Nótese que la eliminación de la inactivación de la I_{Na} se acompaña de un incremento significativo en la amplitud de la misma. **B**, Relación I - V de la I_{Na} a diferentes tiempos de la misma célula GH3 del panel (A). Resultados similares se obtuvieron en un total de 4 células GH3.

En experimentos similares a los descritos para las células GH3, se encontró que la presencia de papaína no modifica la inactivación de los canales de calcio tipo T expresados de manera estable en células HEK-293. Un ejemplo representativo de tal observación se muestra en la Fig. 5. En este caso, la I_{Ca} generada por canales $Ca_v3.1$ fue monitoreada con pulsos despolarizantes a -30 mV a partir de un HP de -100 mV, aplicado cada 10 s (Fig. 5A). Como se puede notar al comparar los registros control ($t = 0$) de la I_{Na} y de la I_{Ca} , ambas presentan una corriente cuya activación e inactivación son muy rápidas, aunque la cinética de la I_{Na} es aproximadamente 10 veces más rápida que la de calcio. No obstante, en claro contraste con la I_{Na} , la cinética de I_{Ca} no se modificó aún después de 13 min de incubación con papaína.

El único efecto obvio fue una drástica disminución de la amplitud de I_{Ca} conforme transcurre el tiempo de registro en la configuración de célula completa (Fig. 5A). Al multiplicar el trazo de I_{Ca} obtenido a los 13 min de registro (trazo rojo), por un factor tal que la amplitud del pico de la corriente sea la misma que la del registro obtenido al inició del experimento ($t = 0$; trazo negro), se observó que ambos registros se superponen casi perfectamente, indicando que la cinética de I_{Ca} no se modificó por la acción enzimática de la papaína.

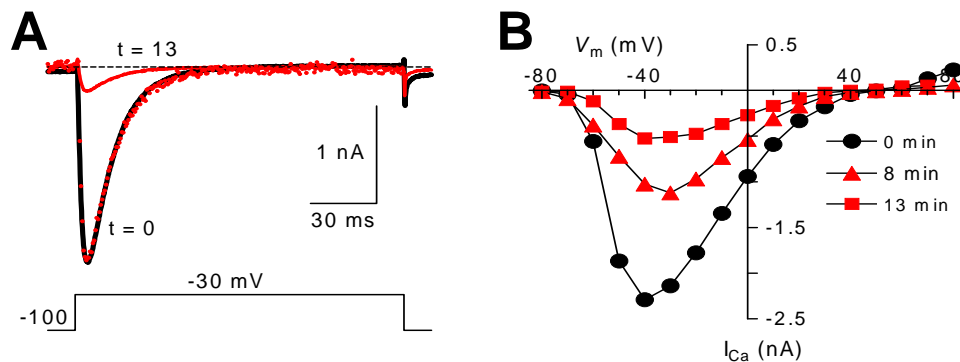


Figura 5. La papaína no modifica la inactivación de la I_{Ca} de los canales $Ca_v3.1$ expresados en células HEK-293. **A**, Trazos representativos de I_{Ca} obtenidos de una célula HEK-293 que expresa de manera estable canales $Ca_v3.1$. El trazo de corriente obtenido a los 13 min (línea roja continua) se normalizó respecto al pico de la corriente control ($t = 0$; trazo negro) y se presenta como puntos rojos. Nótese que ambos trazos son prácticamente idénticos en la cinética de la corriente. Al igual que en la Fig. 4, la solución interna de registro fue suplementada con 1 mg/ml de papaína. **B**, Relación I - V de la I_{Ca} a diferentes tiempos para la misma célula mostrada en el panel (A).

La ausencia de efecto de la papaína sobre la inactivación de los canales tipo T se corroboró en un total de 11 células transfectadas con los diferentes canales tipo T ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$). Además, en algunos experimentos se utilizaron concentraciones menores de papaína (0.2 y 0.5 mg/ml) para tratar de retardar el posible efecto sobre la funcionalidad del canal y así, poder observar algún cambio en la cinética de inactivación. Sin embargo, el resultado siguió siendo el mismo: una disminución de la corriente sin cambios aparentes en la cinética de inactivación ni en la activación dependiente de voltaje (Fig. 5). Este resultado nos condujo a plantear un abordaje molecular para estudiar la inactivación de los canales tipo T.

B. Papel de la quimera $GI_{S123-DIII}$ en la inactivación de los canales tipo T.

Debido a que Lee y su grupo publicaron resultados relacionados a la inactivación de los canales tipo T (Park et al., 2004) con algunas de las quimeras que originalmente se habían planteado para la presente tesis, se optó por realizar una nueva estrategia. La nueva estrategia consistió en saber si los determinantes moleculares vinculados a la inactivación se encontraban en regiones más delimitadas y no conservadas. Para esto se realizaron alineamientos entre las secuencias de aminoácidos de las subunidades $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ y $\alpha 1I$. El análisis de las mismas evidenció que los segmentos transmembranales S1-S3 del tercer dominio, así como el carboxilo terminal son las regiones con menor similitud entre ellas. Esto sugirió que estas regiones podrían ser las responsables de determinar las diferencias en las propiedades biofísicas de estos canales. Por lo anterior, se planteó la construcción de una quimera entre los canales $Ca_v3.1$ ($\alpha 1G$) que se inactivan rápidamente y los $Ca_v3.3$ ($\alpha 1I$) que lo hacen aproximadamente cinco veces más lento.

B.1 Construcción de la quimera $GI_{S123-DIII}$.

Para construir esta quimera, se tomó como templado el canal $Ca_v3.1$, al cual se le substituyeron los segmentos S1, S2 y S3 del dominio III por la misma región del canal $Ca_v3.3$ (clonados de humano) (Fig. 6).

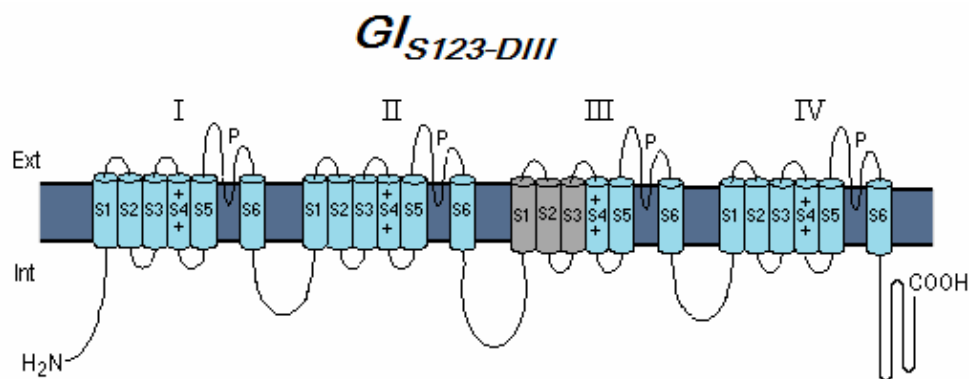


Figura 6. Representación esquemática de la quimera $GI_{S123-DIII}$. Los segmentos S1, S2 y S3 del canal $Ca_v3.1$ ($\alpha 1G$; en color azul) se intercambiaron por aquellos del canal $Ca_v3.3$ ($\alpha 1I$; en color gris). Como ya se mencionó anteriormente, la subunidad $\alpha 1$ de los canales tipo T consiste de cuatro dominios (I al IV) y cada uno contiene seis segmentos transmembranales (S1 a S6) y una asa del poro (P) que une los segmentos S5 y S6. NH_2 y $COOH$, representan los extremos amino y carboxilo de la subunidad $\alpha 1$. Ext e Int: lado extracelular e intracelular, respectivamente.

La construcción de esta quimera comprendió dos etapas: en la primera se llevó a cabo la amplificación por PCR, en forma individual, de los tres fragmentos (AB, CD y EF) que conforman a la quimera (Fig. 7A). En el caso de esta quimera, el fragmento CD comprende a los tres primeros segmentos del dominio III del canal $Ca_v3.3$. Posteriormente, en la segunda etapa, se procedió a la unión de éstos fragmentos con la estrategia de extensión por sobre empalme con la técnica de PCR (Horton et al., 1990).

Los resultados de la primera etapa se muestran en los geles de agarosa de las Figs. 7B, C y D, respectivamente. Como se puede apreciar en los geles, los productos de amplificación de los fragmentos AB, CD y EF se obtuvieron con una alta especificidad, intensidad y del tamaño esperado. Después, se procedió a realizar una segunda etapa, que consistió en unir los fragmentos CD y EF mediante PCR, obteniéndose el producto CF de 1287 pb (Fig. 7E). Finalmente, en una quinta reacción de PCR, el fragmento CF se unió al fragmento AB. La unión final de los tres fragmentos se observó como una única banda del tamaño esperado de 1518 pb (Fig. 7E). Este resultado se verificó a través de un análisis de restricción.

Para poder regresar el fragmento quimérico al vector de expresión que tiene el cDNA del canal $Ca_v3.1$, fue necesario modificarlo para eliminar el sitio *XhoI* del sitio de clonación múltiple (polilinker). De esta forma fue posible subclonar el fragmento quimérico *XhoI-BstEII* de 1.1 Kb (proveniente del fragmento AF de 1518 pb) para generar la construcción final de la quimera **GI_{S123-DIII}**. Esta subclonación se verificó por análisis de restricción de tres clonas con las enzimas previamente mencionadas para liberar el fragmento quimérico de 1.1 Kb (Fig. 7F) y también se comprobó la inserción de los segmentos S1, S2 y S3 de la subunidad $\alpha1I$ en $\alpha1G$, a través de secuenciación automática (Unidad de Biología Molecular del IFC).

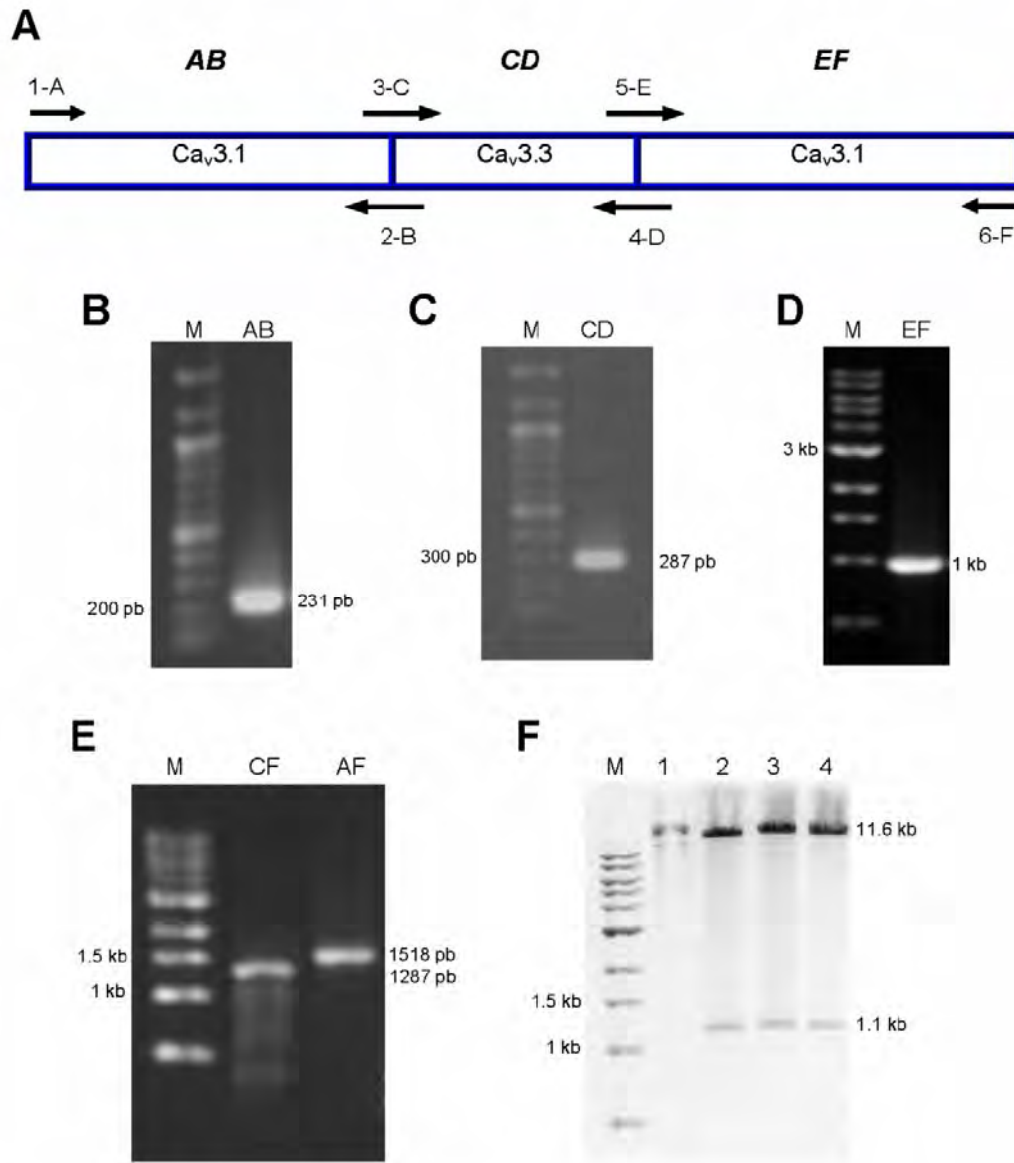


Figura 7. Construcción de la quimera $Gl_{S123-DIII}$. **A.** Esquema que muestra los tres productos (AB, CD y EF) que componen al fragmento quimérico. Los fragmentos AB y EF se amplificaron por PCR a partir del DNA del canal $Ca_v3.1$ usando los *primers* ubicados en los bordes de cada fragmento. En el caso del segmento CD, se usó como templado DNA del canal $Ca_v3.3$. **B, C, D,** En los tres geles de agarosa se aprecia en los primeros carriles el marcador de peso molecular (pb: pares de bases; kb miles de pares de bases) y en los segundos carriles, los productos amplificados para los fragmentos AB, CD y EF junto con sus tamaños. **E,** El segundo carril del gel muestra el fragmento CF que resultó de la unión por PCR de los fragmentos CD y EF y en el tercero, la unión de los fragmentos AB y CF que generaron el fragmento AF, el cual incluye a los tres fragmentos. **F,** En este panel se ilustra el análisis de restricción de tres clones de la quimera $Gl_{S123-DIII}$, en las cuales el fragmento AF ha sido ligado al vector que expresa al canal $Ca_v3.1$. En el carril 1, se muestra una clona de 12.7 Kb sin digerir y en el carril siguiente, la misma clona digerida con *Xho* y *BstEII* para liberar al fragmento quimérico final de 1.1 Kb del resto de la construcción quimérica de 11.6 Kb. Ambas enzimas también se usaron para digerir las otras dos clonas de los carriles 3 y 4.

B.2 Estudio funcional de la quimera $GI_{S123-DIII}$.

Mediante transfección con Lipofectamina 2000, la quimera $GI_{S123-DIII}$, así como los vectores control de los canales $Ca_v3.1$ ($\alpha1G$) y $Ca_v3.3$ ($\alpha1I$), fueron expresados en células HEK-293 ordinarias para estudiar y comparar sus propiedades biofísicas con la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa. El objetivo de intercambiar los segmentos S1, S2 y S3 del dominio III entre los canales $\alpha1G$ y $\alpha1I$ fue el de determinar su posible participación en el fenómeno de inactivación de los canales tipo T. Por ello, el primer aspecto biofísico que se estudió fue el curso temporal de la corriente generada por la quimera, así como el de los canales silvestres para fines de comparación. En la Fig. 8 se muestran registros representativos de I_{Ca} registrada a -30 mV de células HEK-293 transfectadas con los tres canales de interés.

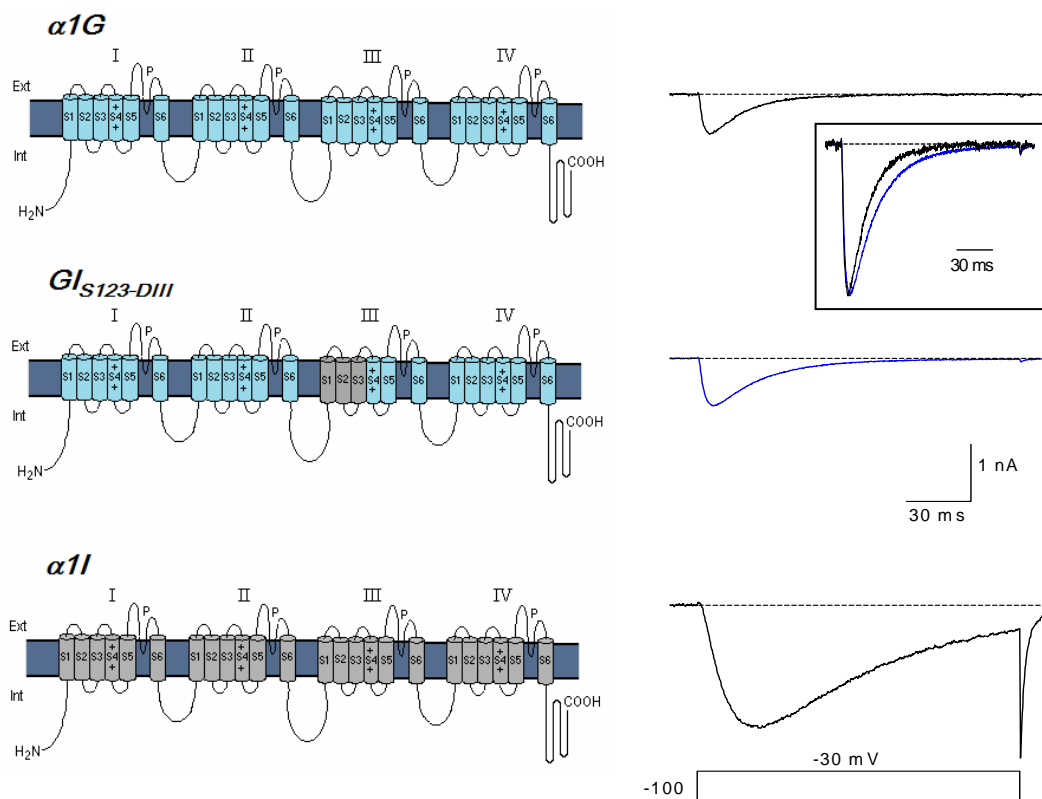


Figura 8. Esquema de $Ca_v3.1$, de $Ca_v3.3$ y de la quimera $GI_{S123-DIII}$ con su correspondiente I_{Ca} . A la izquierda se esquematiza la subunidad $\alpha1$ de los canales indicados, así como los cambios introducidos en la quimera. A la derecha se muestran trazos representativos de I_{Ca} a -30 mV de células HEK-293 transfectadas con el cDNA de las construcciones de interés. La corriente se evocó con el protocolo de voltaje indicado en la parte inferior de los trazos. En el recuadro se presentan los trazos normalizados de $\alpha1G$ y la quimera $GI_{S123-DIII}$, para sobresaltar los cambios ligeros que se observaron en la cinética de la corriente de la quimera (trazo azul). La escala aplica para todos los trazos, excepto el del recuadro.

A primera vista, se puede observar que la cinética de la I_{Ca} expresada por la quimera (trazo azul) es muy similar a la del canal $\alpha 1G$. De hecho, al normalizar la amplitud al pico de ambas corrientes (recuadro) se puede ver que el curso temporal con el que se inactivan ambas corrientes es muy parecido, siendo un poco más lenta la de la quimera. Asimismo, la rapidez con la que se activa la corriente es prácticamente la misma para ambos canales. Por lo tanto, la quimera de $\alpha 1G$ no mostró cambios en su inactivación.

La observación anterior se corroboró a diferentes valores de V_m en varias células HEK-293. El resumen de tales resultados se presenta en la Fig. 9. Los datos ahí mostrados se obtuvieron al ajustar dos funciones exponenciales al trazo completo de la I_{Ca} , una para la fase de activación y otra para la inactivación. Las constantes de tiempo (τ , tau) obtenidas de esta manera se promediaron entre los diferentes grupos de células estudiadas, tanto para la activación (Fig. 9A) como para la inactivación (Fig. 9B) y se graficaron en función del voltaje.

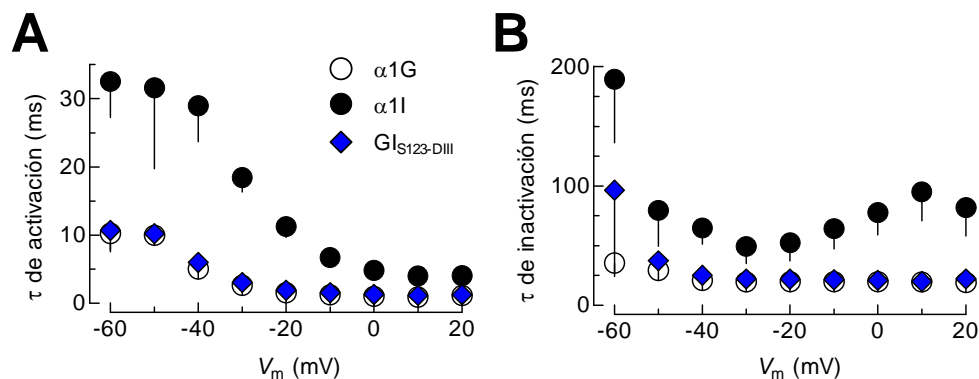


Figura 9. La cinética de la I_{Ca} expresada por la quimera $Gl_{S123-DIII}$ no es diferente de $\alpha 1G$. Gráficos del promedio (\pm error estándar) de las constantes de tiempo de la activación (A) y la inactivación (B) en función del voltaje al que se registraron las corrientes para los tres tipos de canales indicados. Nótese que en ambos parámetros cinéticos, los valores de tau son prácticamente idénticos únicamente entre la quimera y los canales $\alpha 1G$.

Los resultados de la Fig. 9 permiten concluir que los segmentos S1, S2 y S3 del dominio III del canal $\alpha 1G$ no juegan un papel importante en el proceso de inactivación de estos canales, debido a que es el mismo el curso temporal con el que se activa e inactiva la corriente generada por ambos canales. Además de su cinética, la I_{Ca}

expresada por la quimera también fue objeto de un análisis de su dependencia al voltaje de la activación e inactivación, así como el curso temporal con el que se cierran los canales en respuesta a la repolarización de la membrana. Estos resultados se resumen en la Fig. 10, en donde se muestra que la amplitud máxima de la corriente, medida al pico de cada registro, se observó cercana a -30 mV para los tres canales estudiados en esta sección, aunque para $\alpha 1G$ y la quimera, esta circunstancia ocurrió alrededor de 5 mV más negativo respecto al de $\alpha 1I$ (Fig. 10A). Esta observación se confirmó al normalizar las curvas $I-V$ de cada uno de los canales y ajustar los datos experimentales con la función de Boltzmann (Fig. 10B). Tales ajustes mostraron que la quimera mantiene la misma dependencia al voltaje para su activación que la de los canales $\alpha 1G$ (Tabla 1); también se observaron resultados similares al analizar la dependencia al voltaje de la inactivación en el estado estacionario de los mismos canales (Fig. 10C y D).

Asimismo, el curso temporal con el que se cierran los canales al repolarizar la membrana después de un pulso despolarizante a +60 mV fue estadísticamente el mismo para los canales quimérico y los canales $\alpha 1G$, siendo ambos más lentos en este aspecto que los canales $\alpha 1I$ (datos no mostrados).

Los resultados de esta sección indican que los tres primeros segmentos (S1 a S3) del tercer dominio del canal $\alpha 1G$, no afectan la cinética de inactivación ni repercuten en la activación e inactivación dependiente de voltaje de estos canales.

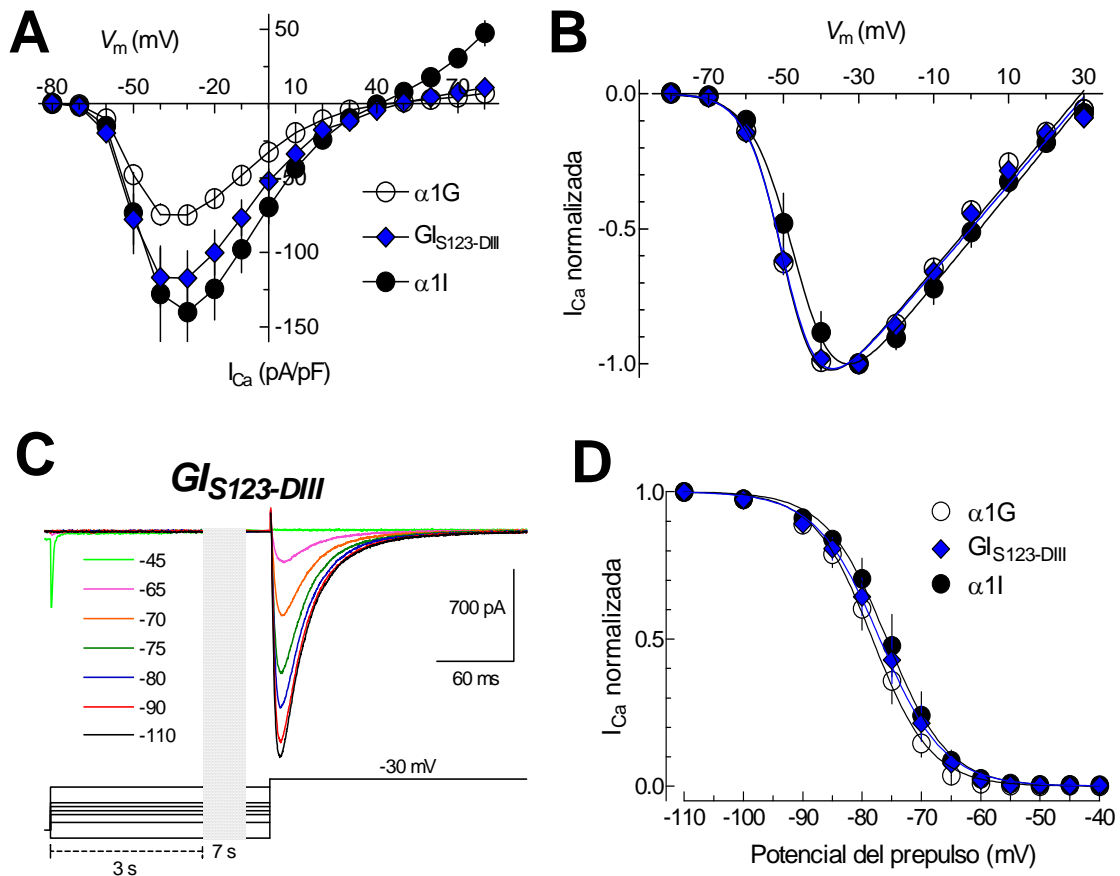


Figura 10. Activación e inactivación dependiente de voltaje de la quimera $Gl_{S123-DIII}$. **A**, Relación $I-V$ para los canales indicados. Los puntos experimentales son la densidad promedio de la I_{Ca} en función del V_m . El número de células investigadas fue de 6 para $\alpha 1G$, 10 para la quimera $Gl_{S123-DIII}$ y 4 para $\alpha 1I$. **B**, Normalización de las curvas $I-V$ presentadas en **A**, en donde las líneas continuas representan el ajuste de los datos con una ecuación de Boltzmann modificada (ver Métodos). La corriente máxima se registró al mismo voltaje tanto para la quimera como para los canales $\alpha 1G$, en el caso de los canales $\alpha 1I$, dicho valor fue alrededor de 5 mV más positivo (Tabla 1). **C**, Inactivación en el estado estacionario de los canales $Gl_{S123-DIII}$. Se ilustran trazos representativos de la I_{Ca} registrada en respuesta al protocolo de voltaje indicado. La primera parte de éste muestra los 3 segundos iniciales (de un total de 10) de las corrientes evocadas por los prepulsos a los diferentes voltajes indicados y en la segunda, se presentan las corrientes a -30 mV que fueron generadas por los canales que no se inactivaron durante el prepulso. **D**, Curvas de inactivación dependiente de voltaje. La amplitud de las corrientes como las indicadas en el panel **C** se normalizaron, promediaron y representaron en función del valor de potencial del prepulso para cada uno de los canales indicados en la figura. Los datos experimentales se ajustaron con funciones Boltzmann y el mejor ajuste se muestra con las líneas continuas (ver Tabla 1). Se puede apreciar que el comportamiento de los canales quiméricos es muy similar al de ambos canales silvestres. $n = 6$ para $\alpha 1G$; $n = 7$ para la quimera $Gl_{S123-DIII}$ y $n = 3$ para $\alpha 1I$

Tabla 1. Propiedades biofísicas de la quimera GI_{S123-DIII} en relación con los canales $\alpha 1G$ y $\alpha 1I$.

	$\alpha 1G$	GIS123-DIII	$\alpha 1I$
I_{Ca} (pA/pF)	-33.3 ± 1.9 (6)	-33.3 ± 1.9 (10)	-24.3 ± 1.2 (4)
τ de activación (ms)	2.9 ± 0.2	2.7 ± 0.1	24.1 ± 0.2
τ de inactivación (ms)	19.4 ± 1.5	22.0 ± 1.2	68.9 ± 0.6
Activación			
V_{50}	-49.7 ± 0.8	-49.7 ± 1.1	-46.3 ± 2.5
K	4.5 ± 0.3	4.5 ± 0.3	4.9 ± 0.4
Inactivación			
V_{50}	-78.2 ± 1.5 (6)	-76.8 ± 1.6 (7)	-75.7 ± 1.8 (3)
K	4.4 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.8 ± 0.3

Los datos de la tabla se presentan como la media \pm error estándar. La densidad de corriente (pA/pF), así como las taus de activación e inactivación corresponden al voltaje de -30 mV. Los parámetros de activación e inactivación están dados en mV y representan el promedio de los ajustes individuales de la relación I - V y de la inactivación en el estado estacionario, respectivamente, de cada célula con funciones Boltzmann (ver Métodos). Las constantes de tiempo (τ) de activación e inactivación se obtuvieron a partir del ajuste con dos exponenciales de los trazos de corriente obtenidos a -30 mV. En ningún parámetro estudiado existieron diferencias significativas entre la quimera y los canales $\alpha 1G$. Los datos se obtuvieron de la cantidad de células indicadas entre paréntesis.

Con el propósito de adquirir evidencia experimental acerca de la estructura secundaria predicha por los programas computacionales, se obtuvo el espectro de dicroísmo circular de un péptido purificado de los primeros 105 aminoácidos correspondientes al asa I-II (Fig. 12C). El estudio de dicroísmo circular confirmó la presencia de estructuras en α -hélice en la región del freno de la compuerta. En la Fig. 12D se muestra el espectro de DC que indica las estructuras secundarias presentes en la región inicial del asa I-II de los canales $Ca_v3.2$. A partir de la señal de DC registrada entre 200 y 260 nm se calculó el contenido de α -hélices (F_{helix}). Los cálculos indicaron que las estructura presentes en mayor porcentaje fueron las α -hélices con un 52%, las que forman giros con un 31% y solo en un 16% las que forman hojas β plegadas. Estos resultados confirmaron los porcentajes predichos por el programa SOPMA (Fig.12D).

En conjunto, los datos obtenidos a partir de la predicción del programa SOPMA, así como del DC, permitieron proponer un modelo estructural en el que el freno de la compuerta podría estar formado por dos α -hélices unidas por una asa (Fig. 12B).

B. Caracterización funcional del freno de la compuerta.

Con el objetivo de comprobar el modelo estructural propuesto en la Fig. 12, así como para definir los límites del freno de la compuerta, se construyeron dieciocho mutantes empleando la técnica de mutagénesis dirigida con PCR. Sus secuencias de aminoácidos se muestran en la figura 13 y también se indican las regiones que fueron modificadas en cada caso. La eliminación de residuos se ilustró por medio de puntos, las sustituciones con la letra A para representar a las alaninas (residuos que al tener la mínima cantidad de cadena lateral, estabilizan las α -hélices y hacen rígida la estructura del asa) o con las letras PG para denotar a las prolinas y glicinas que alteran significativamente la estructura de las α -hélices. Todas estas modificaciones se realizaron para ver su efecto sobre el funcionamiento del canal $Ca_v3.2$.

Se diseñaron las mutaciones con base en las predicciones estructurales que se obtuvieron con el programa SOPMA. Así, las mutantes en las que se eliminaron

algunos aminoácidos tuvieron como finalidad delimitar el extremo carboxilo del freno de la compuerta. En el resto de las construcciones se substituyeron aminoácidos por alaninas, prolina y glicinas para saber como se relaciona la integridad estructural del asa I-II con el funcionamiento del canal Ca_v3.2.

	<u>IS6</u>	<u>α-hélice 1</u>	<u>Asa</u>	<u>α-hélice 2</u>
Ca _v 3.2	FMINLCLVVIATQFSETKQRESQLMREQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
D2b	FMINLCLVVIATQFSETKQRESQLMREQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
D2c	FMINLCLVVIATQFSETKQRESQLMREQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
D2d	FMINLCLVVIATQFSETKQRESQLMREQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
D2e	FMINLCLVVIATQFSETKQRESQLMREQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
PA61	FMINLCLVVIATQFSETKQRA AAAAAA EQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
PPG1	FMINLCLVVIATQFSETKQ PPGPPG EQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
PA64	FMINLCLVVIATQFSETKQRES AAAAAA RRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
PPG4	FMINLCLVVIATQFSETKQRES PPGPPG RRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
PA62	FMINLCLVVIATQFSETKQRESQLMREQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELL AAAAAA ARKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
PPG2	FMINLCLVVIATQFSETKQRESQLMREQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELL PPGPPG GRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
H1A1	FMINLCLVVIATQFSETKQRA ES QLMREQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
H1A2	FMINLCLVVIATQFSETKQRA AES QLMREQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
H1A3	FMINLCLVVIATQFSETKQRA AAES QLMREQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
PA6T1	FMINLCLVVIATQFSETKQRESQLMREQRRARHLSNDSTLASF AAAAAA YEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
PA6T2	FMINLCLVVIATQFSETKQRESQLMREQRRAR AAAAAA TLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
PA6T1-2	FMINLCLVVIATQFSETKQRESQLMREQRRAR AAAAAA TLASF AAAAAA YEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
DC1	FMINLCLVVIATQFSETKQRESQLMREQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFRKVKRRSLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA
PA63	FMINLCLVVIATQFSETKQRESQLMREQRRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIF AAAAAA SLRLYARWQSRWRKVKVDP	SA	SA	SA

Figura 13. Mutaciones de la región inicial del asa I-II del canal Ca_v3.2. Se muestran las secuencias de aminoácidos de cada una de las mutantes que se construyeron y se estudiaron en el presente estudio. En negritas y subrayados se indican los aminoácidos que se introdujeron o substituyeron; y con puntos los que fueron eliminados. También se muestra la estructura secundaria predicha por SOPMA para cada una de las construcciones.

C. Delimitación del extremo carboxilo del freno de la compuerta.

Los canales $Ca_v3.2$ silvestres y mutantes se expresaron en células HEK-293 para analizarlos funcionalmente con la técnica de patch clamp en la configuración de célula completa. En todos los casos, el estudio funcional de las mutantes con dicha técnica incluyó la aplicación de protocolos de voltaje diseñados para obtener información de la activación de la corriente en función del voltaje (curvas $I-V$) y de la inactivación en estado estacionario de los canales. A partir del análisis de las corrientes evocadas por el protocolo $I-V$ se obtuvo la corriente máxima (corriente al pico) y las constantes de tiempo de la activación e inactivación de la corriente a cada voltaje explorado. La conductancia máxima normalizada respecto a la capacitancia membranal (C_m), así como el potencial de inversión se obtuvieron a partir del ajuste de los datos crudos de la corriente al pico con una ecuación de Boltzmann modificada. El mismo ajuste proporcionó el V_{50} de activación y el valor de la pendiente de la relación (k). Los protocolos para obtener las curvas de inactivación en el estado estacionario proporcionaron trazos de corriente cuyas amplitudes se normalizaron, respecto al valor máximo de corriente en cada célula y se ajustaron con funciones Boltzmann para obtener los valores de V_{50} de inactivación y de k .

En un trabajo previo del laboratorio del Dr. Perez-Reyes se demostró que la eliminación de aminoácidos de la región inicial del asa I-II (de la treonina 420 al ácido aspártico 491) afecta principalmente el *gating* (activación e inactivación dependiente de voltaje) del canal y que la eliminación del resto de los residuos del asa I-II (desde la prolina 492 hasta el 772) solo afectan la expresión del canal (Vitko et al., 2007). Con base en estos resultados, se diseñaron cuatro deleciones: D2b, D2c, D2d y D2e (Fig. 13) para delimitar el extremo carboxilo del freno de la compuerta. Los resultados de la activación dependiente de voltaje así como de la cinética de las corrientes expresadas por tales deleciones se muestran en la Fig. 14. En el panel A se exhiben los registros representativos de las corrientes de calcio obtenidas de células HEK-293 transfectadas con el canal $Ca_v3.2$ silvestre (WT; registros superiores) y con la deleción D2b (trazos inferiores).

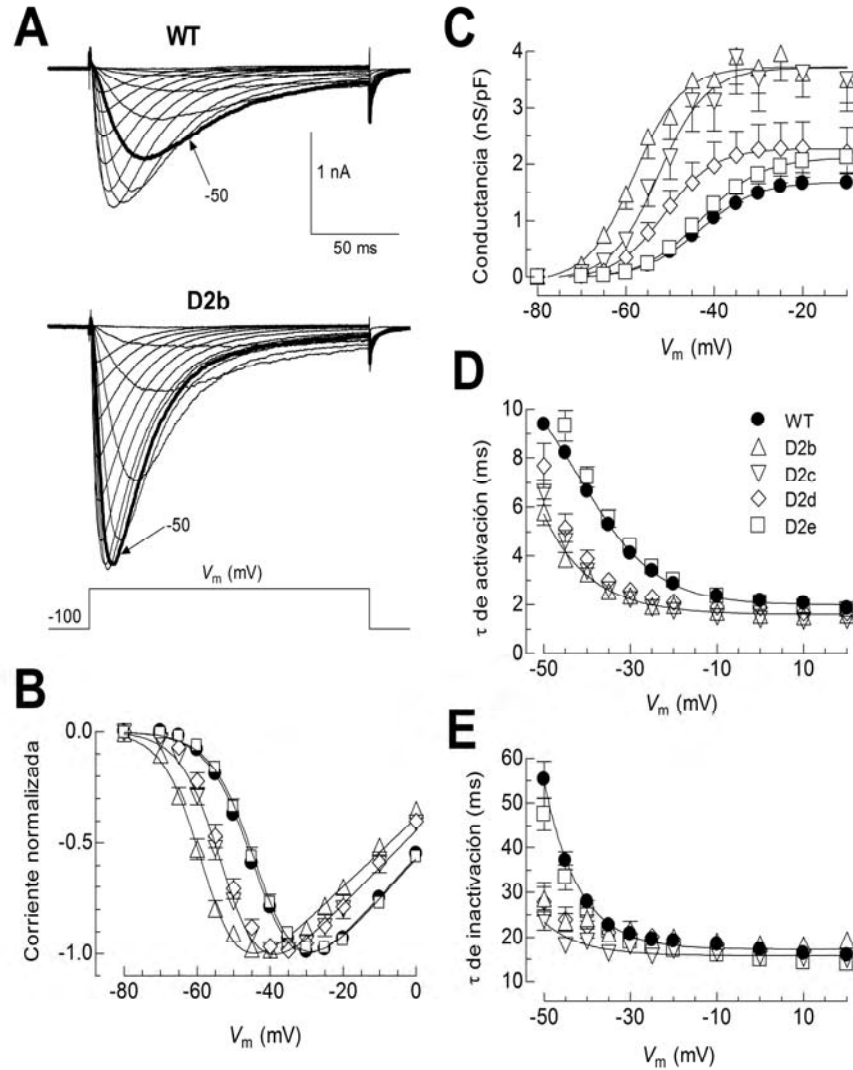


Figura 14. Delimitación del extremo carboxilo del freno de la compuerta del canal $Ca_v3.2$. **A.** Registros representativos de la I_{Ca} del canal $Ca_v3.2$ silvestre (WT) y de la delección D2b. Los trazos de corriente fueron evocados en respuesta a pulsos despolarizantes desde -80 a +20 mV en pasos de 10 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV. Las corrientes registradas a -50 mV (trazos más gruesos) ilustran el corrimiento en la activación de la corriente en función del voltaje. **B.** Curvas I - V normalizadas que muestran como la activación de los canales mutantes se desplazó alrededor de 10 mV hacia voltajes más negativos con respecto a la del canal silvestre. Las líneas continuas representan ajustes de los datos promediados con una función Boltzmann modificada (Ecuación 1; ver Métodos). El número de células estudiadas en cada caso se presentan en la Tabla 2, junto con los datos promediados de V_{50} y k obtenidos de los ajustes de los valores de corriente de cada célula individual. **C.** Curvas de conductancia normalizada respecto a la densidad de corriente en función del voltaje transmembranal. La densidad de corriente se calculó dividiendo la corriente al pico entre el valor de C_m . La conductancia se obtuvo a partir de una versión modificada de la ley de Ohm (Ecuación 2; ver Métodos). **D, E.** Constantes de tiempo (τ) de la cinética de activación e inactivación en función del valor de V_m , para el canal $Ca_v3.2$ silvestre y las mutantes indicadas. Los valores de τ se obtuvieron al ajustar los trazos de corriente con funciones biexponenciales a cada uno de los voltajes explorados. La simbología del panel (**D**) aplica para toda la figura.

Como se puede apreciar en el panel A, las líneas gruesas muestran el cambio en la dependencia del voltaje con el trazo a -50 mV. De esta forma, se puede observar que para el caso de la mutante D2b, la corriente máxima ocurre a -40 mV y en el canal silvestre esto sucede entre -30 o -20 mV. Para ilustrar más claramente este efecto sobre la activación dependiente de voltaje de los canales $Ca_v3.2$, en la Fig. 14B se muestran las curvas $I-V$ para cada una de las delecciones mencionadas así como para el canal silvestre. Las mutantes D2b, D2c y D2d afectaron significativamente la activación dependiente de voltaje, promoviendo que estos canales se activaran a valores de voltaje entre 8 y 14 mV más negativos que el canal silvestre (Tabla 2). Este corrimiento no se observó en el caso de la delección D2e, la cual se comportó de manera muy similar al canal silvestre (Fig. 14B, Tabla 2). Las mutantes D2b y D2c también presentaron un incremento significativo (más del doble) en la conductancia máxima normalizada por área de membrana (Fig. 14C). El valor promedio de conductancia máxima obtenido de las células que expresaron el canal silvestre fue de 1.7 ± 0.2 nS/pF, en cambio, en aquellas transfectadas con las mutantes D2b y D2c estos valores fueron significativamente más altos con respecto al control: de 3.8 ± 0.5 y 3.4 ± 0.6 nS/pF, respectivamente (Tabla 2). En contraste, las mutantes D2d y D2e presentaron valores de conductancia máxima ligeramente superiores a los del canal silvestre (Fig. 14C; Tabla 2).

También se estudió la cinética de los procesos de activación e inactivación de la corriente de calcio generada para cada uno de los voltajes estudiados (Fig. 14A). El ajuste con funciones biexponenciales de los registros de corriente proporcionó las constantes de tiempo para la cinética de activación y de inactivación, mismas que se representaron en función del voltaje para cada una de las delecciones y el canal $Ca_v3.2$ silvestre. De esta forma, se pudo observar que las cinéticas de activación (Fig. 14D) y de inactivación (Fig. 14E) se aceleraron en el caso de todas las delecciones, excepto en D2e, con respecto al canal silvestre (Tabla 2). Por lo regular, las mutaciones que producen cambios en la dependencia al voltaje de la activación deben mostrar también cambios similares en la dependencia al voltaje de la cinética de la corriente, tal fue el caso para las mutantes D2b, D2c y D2d (Fig. 14D y E).

Por otro lado, también se estudió la inactivación en el estado estacionario de los canales $Ca_v3.2$ con un protocolo típico de dos pulsos (Fig. 15). En el panel A de dicha figura se muestran dos familias representativas de corrientes de calcio registradas durante el pulso de prueba a -20 mV de una célula transfectada con el canal $Ca_v3.2$ silvestre (WT, trazos superiores) y de otra con la mutante D2b (trazos inferiores). En esta figura es posible observar que los canales mutantes se inactivan a voltajes más negativos que los canales silvestres.

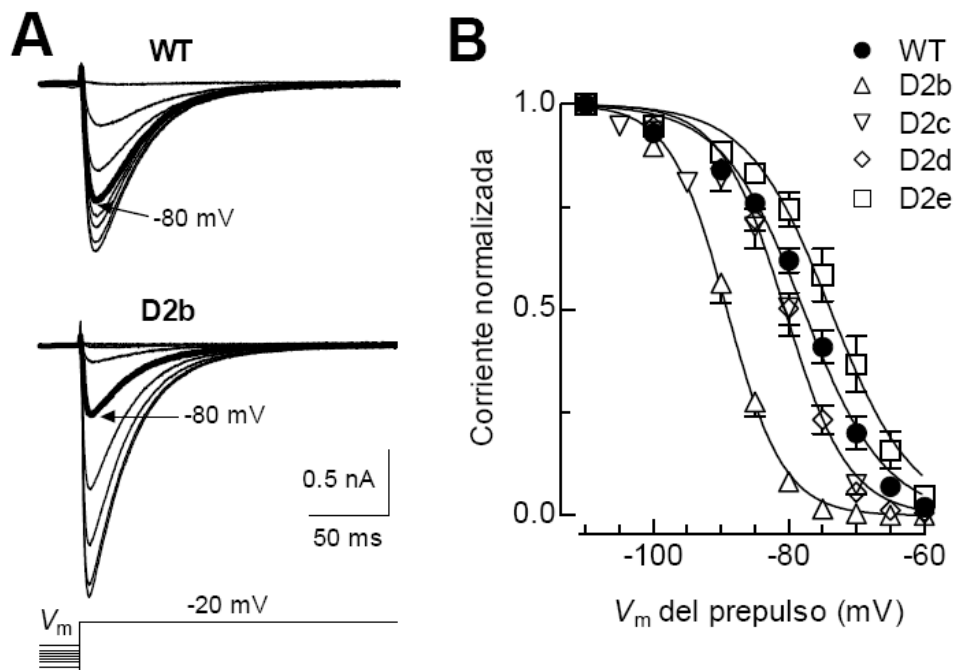


Figura 15. Efecto de las deleciones de la α -hélice 2 sobre la inactivación dependiente de voltaje del canal $Ca_v3.2$. **A**, Familias de corrientes de calcio registradas a -20 mV en células HEK-293 transfectadas con el canal $Ca_v3.2$ silvestre (WT) y con la mutante D2b. La inactivación en estado estacionario de los canales de calcio se estudió utilizando prepulsos de 15 s de duración (para promover la inactivación de los canales) a valores de V_m comprendidos entre -110 y -40 mV, seguido de un pulso de prueba a -20 mV (que permitió conocer la fracción de canales no inactivados durante el prepulso respectivo). Los registros de la I_{Ca} evocados después del prepulso a -80 mV se engrosaron para ilustrar el cambio en la dependencia al voltaje de la inactivación de los canales mutantes con respecto al canal silvestre. **B**, Curvas de inactivación en el estado estacionario de los canales indicados. La amplitud de las corrientes registradas durante el pulso de prueba se normalizó respecto a la amplitud máxima en cada célula (es decir, aquella que se evoca después del prepulso a -110 mV) y se obtuvieron los promedios a cada voltaje los cuales fueron ajustados con funciones Boltzmann (Ecuación 3; ver Métodos; líneas continuas). Los resultados del promedio de los ajustes individuales de cada célula se presentan en la Tabla 2. Nótese que la inactivación de la mutante D2b se corrió poco más de 10 mV hacia potenciales más negativos con respecto al canal silvestre (ver Tabla 2).

En esta misma figura se puede observar con claridad, el cambio en la dependencia al voltaje de la inactivación con el trazo a -80 mV. Estos cambios fueron ilustrados a través de las curvas de inactivación en el estado estacionario mostradas en la Fig. 15B en las cuales es evidente que la mutante D2b provocó un cambio significativo hacia potenciales más negativos en la inactivación dependiente de voltaje de los canales Ca_v3.2. El valor de voltaje al que se inactivaron el 50% (V_{50}) de los canales silvestres fue de -77.7 ± 0.8 mV y de -89.2 ± 0.8 mV para el caso de la mutante D2b (Tabla 2).

Ninguna de las tres delecciones restantes, D2c, D2d y D2e, tuvieron efectos significativos sobre la inactivación en el estado estacionario de los canales Ca_v3.2 silvestres (Tabla 2). La diferencia entre las mutantes D2b y D2c reside en que la primera cuenta con los siguientes siete aminoácidos: FRKVKRR, los cuales están ausentes en la mutante D2d. Como se puede apreciar en las Fig. 14B, C, y 15B, tanto la activación como la inactivación en el estado estacionario fueron muy similares entre las mutantes D2c y D2b.

Este resultado indicó que los aminoácidos FRKVKRR por sí solos no son responsables del corrimiento de más de 10 mV en el *gating* de los canales mostrado por la mutante D2b. De igual manera, debido a que las propiedades biofísicas de la mutante D2e fueron muy similares a las del canal silvestre (Fig. 14B-E, y 15B), se puede proponer que el freno de la compuerta termina en la glutamina 483 (Q483). Estos resultados también sugieren que el freno de la compuerta ejerce mayor influencia sobre la activación del canal que sobre la inactivación a partir de los estados cerrados del canal (Fig. 14B, C y 15B).

Tabla 2. Propiedades electrofisiológicas de las mutantes del asa I-II del canal Ca_v3.2.

	Activación				Inactivación			Cinética a 0 mV	
	G _{max} (nS/pF)	V ₅₀ (mV)	k (mV)	n	V ₅₀ (mV)	k (mV)	n	τ activación (ms)	τ inactivación (ms)
WT	1.7 ± 0.2	-42.7 ± 0.7	6.0 ± 0.1	16	-77.7 ± 0.8	-5.7 ± 0.2	12	2.1 ± 0.2	17.3 ± 0.7
D2b	3.8 ± 0.5**	-56.8 ± 1.1**	5.3 ± 0.2**	14	-89.2 ± 0.8**	-4.0 ± 0.2**	7	1.6 ± 0.1**	18.5 ± 1.2
D2c	3.4 ± 0.6**	-51.8 ± 0.8**	5.6 ± 0.2	13	-80.6 ± 1.4	-4.6 ± 0.3**	9	1.3 ± 0.1**	14.7 ± 1.0*
D2d	2.3 ± 0.5	-50.6 ± 1.4**	5.3 ± 0.3	5	-80.6 ± 0.7	-4.7 ± 0.1*	4	1.8 ± 0.1	17.3 ± 0.7
D2e	2.1 ± 0.3	-43.4 ± 1.6	5.8 ± 0.2	14	-73.6 ± 1.4	-5.4 ± 0.2	8	2.1 ± 0.1	15.0 ± 0.6*
PA61	3.1 ± 0.3*	-52.9 ± 0.9**	6.2 ± 0.2	12	-82.5 ± 1.2*	-4.1 ± 0.1**	8	1.7 ± 0.2*	17.2 ± 0.9
PPG1	1.9 ± 0.4	-50.4 ± 0.7**	5.9 ± 0.2	6	-82.7 ± 1.3*	-4.9 ± 0.5*	6	2.0 ± 0.2	19.8 ± 0.7*
PA62	2.6 ± 0.2*	-50.5 ± 0.9**	5.5 ± 0.1	12	-80.4 ± 0.8	-5.0 ± 0.1	8	1.8 ± 0.2	14.7 ± 0.6*
PPG2	2.4 ± 0.5	-55.5 ± 0.4**	5.9 ± 0.1	7	-86.1 ± 0.9**	-4.1 ± 0.1**	6	1.4 ± 0.1**	18.5 ± 0.6
PA64	2.2 ± 0.3	-44.6 ± 0.7	6.4 ± 0.2**	9	-73.5 ± 1.0*	-5.8 ± 0.3	6	1.3 ± 0.1**	15.2 ± 0.9
PPG4	2.0 ± 0.2	-50.7 ± 1.1**	6.0 ± 0.3	6	-81.3 ± 0.6*	-5.2 ± 0.2	4	0.9 ± 0.1**	12.3 ± 1.6**
H1A1	2.6 ± 0.3*	-51.1 ± 1.2**	5.8 ± 0.2	18	-82.3 ± 1.6**	-4.6 ± 0.2**	17	1.5 ± 0.1**	14.2 ± 0.8*
H1A2	2.1 ± 0.4	-54.5 ± 1.2**	5.7 ± 0.4	6	-86.2 ± 0.7**	-3.9 ± 0.1**	6	1.5 ± 0.2*	19.2 ± 2.3**
H1A3	3.2 ± 0.3**	-53.9 ± 1.2**	5.6 ± 0.2	16	-84.0 ± 0.8**	-4.4 ± 0.2**	16	1.4 ± 0.1**	14.3 ± 0.8**
PA6T1	2.7 ± 0.4*	-52.9 ± 1.0**	5.6 ± 0.2	12	-84.4 ± 1.1**	-4.3 ± 0.1**	9	1.2 ± 0.1**	13.5 ± 0.5**
PA6T2	2.8 ± 0.5*	-50.9 ± 0.7**	5.3 ± 0.2**	14	-81.0 ± 0.9	-4.7 ± 0.2*	9	1.4 ± 0.1**	13.1 ± 0.5**
PA6T1-2	2.1 ± 0.5	-55.0 ± 1.2**	5.7 ± 0.2	10	-88.8 ± 2.1**	-4.2 ± 0.1**	7	1.2 ± 0.1**	11.7 ± 0.5**
DC1	2.3 ± 0.3**	-57.3 ± 0.9**	5.5 ± 0.2	10	-85.6 ± 1.0**	-4.2 ± 0.1**	6	1.3 ± 0.1**	13.9 ± 0.3**
PA63	2.6 ± 0.5*	-52.7 ± 1.1**	5.3 ± 0.4	7	-82.8 ± 1.6*	3.8 ± 0.1**	4	1.1 ± 0.1**	11.6 ± 0.3**

Los datos se presentan como la media ± el error estándar de los valores obtenidos en diferentes células (*n*). La G_{max}, V₅₀ y *k* de activación, así como las constantes de activación e inactivación se obtuvieron a partir de los protocolos de las curvas I-V, por lo que para todos ellos aplica el número de células indicado en la columna de Activación. La significancia estadística (*P* < 0.05) entre las medias se determinó con la *t* de Student (*) y con el análisis de varianza seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett contra el WT (**).

D. La relevancia de las α -hélices en el funcionamiento de los canales $\text{Ca}_v3.2$.

La importancia de la estructura de las α -hélices que conforman el freno de la compuerta se investigó con la sustitución de algunos aminoácidos de las α -hélices por alaninas o por prolinas y glicinas. Como era de esperarse, las mutantes que introdujeron prolinas y glicinas en las α -hélices (PPG1, PPG2 y PPG4) produjeron cambios significativos en la dependencia al voltaje de la activación e inactivación de los canales $\text{Ca}_v3.2$ (Fig. 16 y Tabla 2). Sin embargo, en el caso de las mutantes PA61 y PA63, la presencia de las alaninas produjo cambios similares a los observados en las mutantes que tienen prolinas y glicinas (Fig. 16A y C, Tabla 2). Estos resultados inesperados se explicaron con los modelos estructurales, especialmente, el de la mutante PA61 (Fig. 19), porque ilustran que se rompe el puente salino que se forma entre el E424 de la α -hélice 1 con la K470 y la R474 de la α -hélice 2.

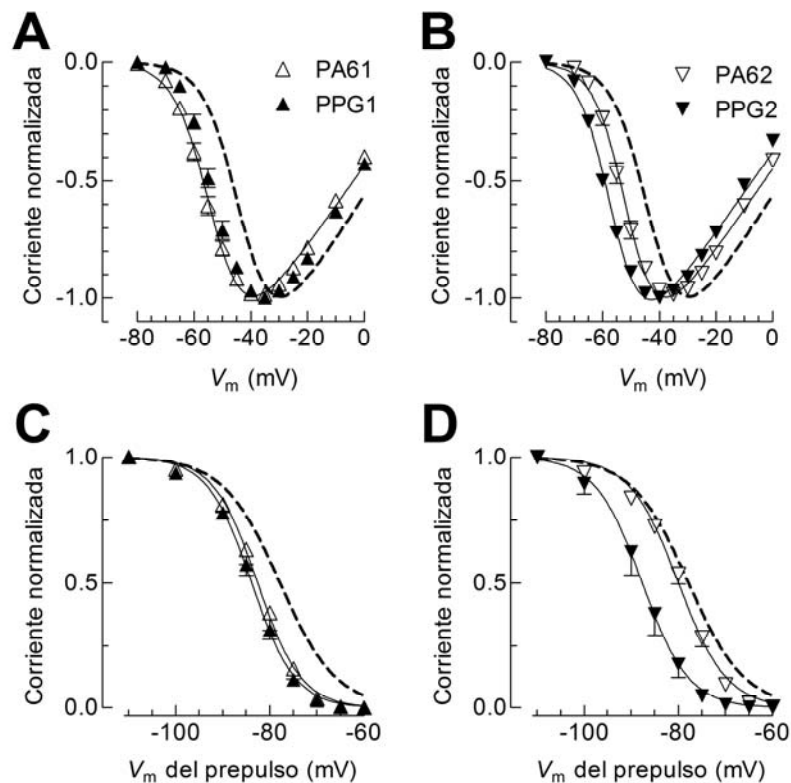


Figura 16. Dependencia al voltaje de mutantes que alteran la estructura de las α -hélices 1 y 2. Curvas I - V normalizadas de las mutantes PA61 y PPG1 al igual que de las mutantes PA62 y PPG2 realizadas en la α -hélice 1 (A) y 2 (B); y curvas de inactivación en el estado estacionario de las mismas mutantes (C) y (D). Las curvas de ambas propiedades biofísicas se desplazaron hacia potenciales más negativos con respecto al canal silvestre (representado con la línea punteada), aunque la mutante PA62 mostró cambios más discretos con respecto a PA61. Los valores promediados de V_{50} y k , así como el número de células investigadas en cada caso se presentan en la Tabla 2.

Por otro lado, la mutante PA62 mostró un funcionamiento similar al canal $Ca_v3.2$ silvestre (Fig. 16B y C, Tabla 2). En conjunto, estos resultados indicaron que la estructura de las α -hélices, así como de la interacción que se da entre ambas, son de gran relevancia para el funcionamiento correcto del freno de la compuerta. Con base en las predicciones de la estructura secundaria de SOPMA y de los experimentos del espectro de dicroísmo circular (Fig. 12), se podría pensar que la inserción de alaninas al principio de la primera α -hélice podría cambiar la orientación de la misma debido a que está conectada a la α -hélice del segmento IS6. Lo que podría afectar la apertura y cierre de los canales $Ca_v3.2$. Para probar esta posibilidad, se insertaron una (H1A1), dos (H1A2) o tres (H1A3) alaninas consecutivas en la α -hélice 1 (Fig. 13). Los resultados de estas mutantes se presentan en la Fig. 17.

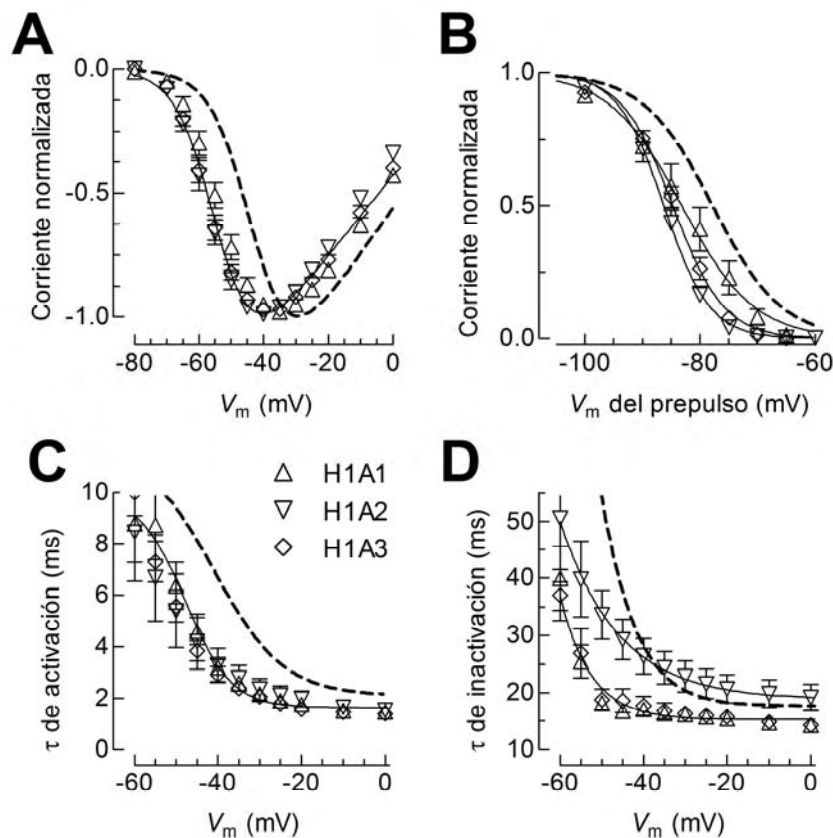


Figura 17. Efecto de la inserción de alaninas en la α -hélice 1 sobre las propiedades biofísicas del canal $Ca_v3.2$. Curvas I - V normalizadas (**A**) e inactivación dependiente de voltaje (**B**) del canal $Ca_v3.2$ silvestre (línea punteada) y de las mutantes H1A1, H1A2 y H1A3. **C** y **D**, Dependencia al voltaje de las constantes de tiempo de la cinética de activación e inactivación de las mismas mutantes. Las tres mutantes presentaron cambios significativos con respecto al canal silvestre. Los valores promediados de V_{50} y k obtenidos de los ajustes individuales de cada célula con las funciones de Boltzmann, así como el número de células investigadas en cada caso se presentan en la Tabla 2.

En comparación con el canal silvestre, los canales con mutaciones se activaron a voltajes aproximadamente 10 mV más negativos (Fig. 17A), el 50% de los canales se inactivó a un valor de V_m que fue 7 mV más negativo (Fig. 17B), y de manera significativa se aceleraron sus cinéticas de activación e inactivación en las mutantes H1A1 y H1A3 (Fig. 17C y D), mientras que la inactivación de la mutante H1A2 fue más lenta (Fig. 17D).

E. Importancia estructural del asa en el funcionamiento del freno de la compuerta.

Las predicciones de estructura secundaria obtenidas a partir del SOPMA y del espectro de DC, indicaron la presencia de una asa que une a dos α -hélices (Fig. 12A). Con el fin de explorar el papel estructural que juega dicha asa, se diseñaron mutantes para eliminar el giro (DC1), para substituir por alaninas los primeros seis residuos del giro (PA6T1) o los últimos seis residuos del giro (PA6T2) y para substituir al mismo tiempo los doce residuos (PA6T12) que se mutaron por separado en las dos mutantes previamente mencionadas (Fig. 13). Al estudiar con patch clamp las propiedades funcionales de estas mutantes, se observó que en las cuatro se modificó la dependencia al voltaje de la activación hacia potenciales más negativos, sobre todo en los casos de las mutantes DC1 y PA6T1-2, cuyo corrimiento fue de alrededor de 14 mV (Fig. 18A, Tabla 2) en comparación con el canal $Ca_v3.2$ silvestre. Asimismo, las cuatro mutantes también mostraron corrimientos significativos hacia potenciales negativos en la inactivación en el estado estacionario, hasta de 10.8 mV como sucedió para la mutante PA6T1-2 (Fig. 18B, Tabla 2).

Adicionalmente, como se puede observar en los paneles C y D de la misma Figura 18, las cinéticas de activación e inactivación de las cuatro mutantes se aceleraron en todos los voltajes estudiados. Todos los resultados que se han descrito hasta el momento, confirman por un lado, la importancia que tiene la estructura del freno de la compuerta en la apertura y cierre de los canales y por otro apoyan la hipótesis de que la región inicial del asa I-II está formada por dos α -hélices interconectadas por un asa. Estas conclusiones también son consistentes con la construcción *de novo* de dieciocho

modelos tridimensionales que sirvieron para explicar algunos de los efectos que tuvieron las mutaciones en la función del freno de la compuerta.

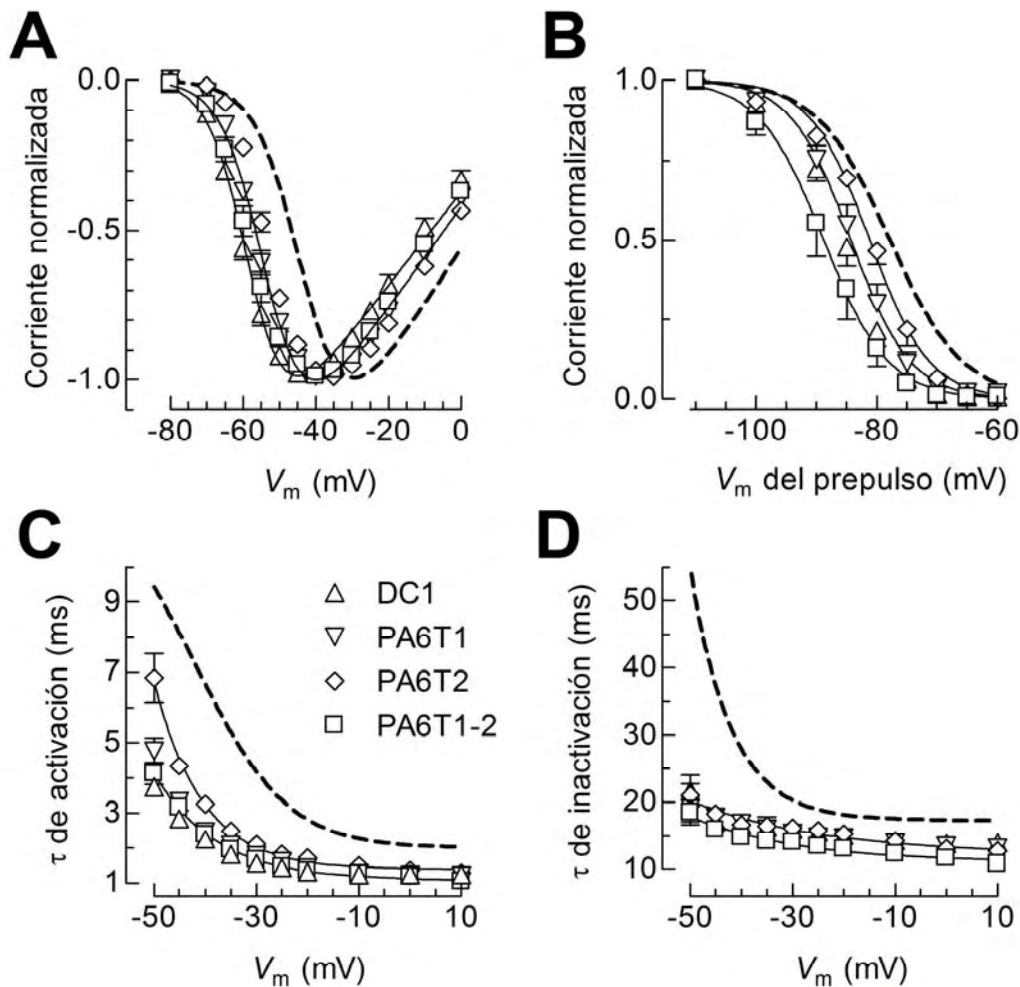


Figura 18. Propiedades biofísicas de las mutaciones hechas en la región del asa sobre las propiedades biofísicas del canal $Ca_v3.2$. Las curvas $I-V$ normalizadas de la activación (A) e inactivación dependiente de voltaje (B) del canal $Ca_v3.2$ silvestre (línea punteada) y de las mutantes PA6T1, PA6T2 y PA6T1-2, denotan que ambas propiedades se modificaron hacia potenciales más negativos con respecto al control. C y D, Dependencia al voltaje de las constantes de tiempo de la cinética de activación e inactivación de las mismas mutantes. Los valores de τ se obtuvieron de ajustes con dos exponenciales de los trazos de corriente y se graficaron contra el potencial de membrana. Los valores promediados de V_{50} y k de cada célula que fueron obtenidos de los ajustes individuales hechos con las funciones de Boltzmann, así como el número de células investigadas en cada caso se presentan en la Tabla 2.

F. Modelado tridimensional del freno de la compuerta del canal Ca_v3.2.

Las regiones que se consideraron para la construcción de los modelos estructurales comprendieron al segmento IS6 y a la región inicial del asa I-II del canal Ca_v3.2 (104 aminoácidos). Las imágenes de los modelos de las mutantes y del canal silvestre se muestran en la Fig. 19. En el panel A se enseña el modelo de la región de la compuerta, en el cual se resalta en rojo el ácido glutámico E424 de la primera α -hélice que forma un puente salino con la arginina R474 así como con la lisina K470 de la segunda α -hélice. Este puente salino mantiene cercanas a ambas hélices y en forma paralela. La importancia de su función quedó de manifiesto en los cambios observados en las propiedades biofísicas de las mutantes. En especial en la mutante D2b que mostró cambios significativos en el funcionamiento y conductancia máxima de los canales Ca_v3.2. Estos cambios son evidentes en el modelo en donde se puede ver que no se forma el puente salino en esta mutante al carecer de 24 aminoácidos de la segunda α -hélice entre ellos la arginina 474 (R474) y la lisina 470 (K470) (Fig. 19B). En el panel C se puede observar en rojo los aminoácidos de la α -hélice 1 de la mutante PA61 que fueron substituidos por alaninas. Estas modificaciones no permitieron la formación del puente salino que se forma en el canal silvestre, lo que podría explicar los efectos inesperados que tuvo esta mutante en la actividad del canal. Finalmente, en el panel D, se puede observar en rojo los doce residuos del giro que fueron substituidos por alaninas. Esta modificación provocó cambios significativos en la cinética del canal debido a que se perdió la estabilización entre ambas hélices. En conjunto, estos resultados hacen evidente la importancia del puente salino para mantener la integridad estructural del freno de la compuerta.

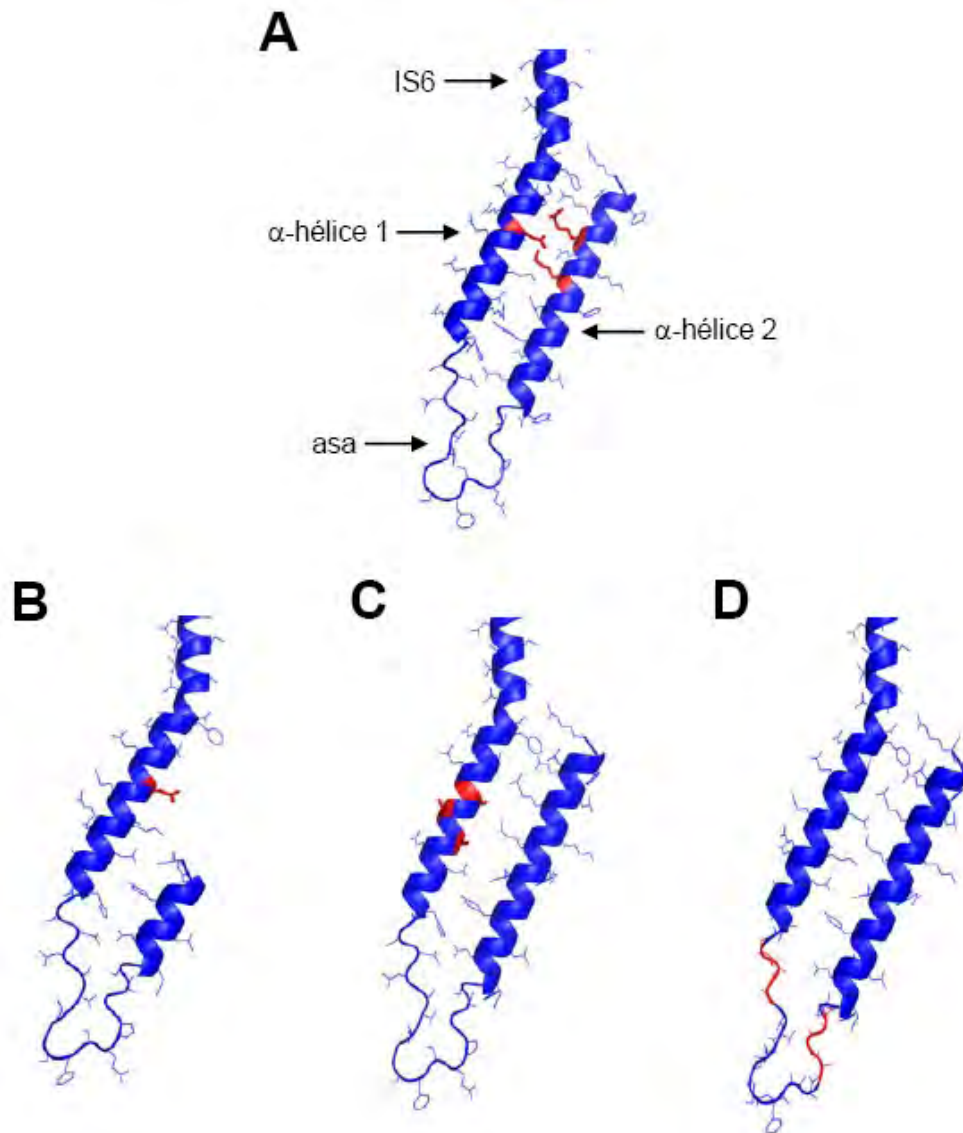


Figura 19. Modelos estructurales de las mutantes del freno de la compuerta del canal $\text{Ca}_v3.2$. (A), Modelo del freno de la compuerta del canal silvestre. Los modelos comprenden parte del segmento IS6 y toda la región inicial del asa I-II del canal $\text{Ca}_v3.2$. Cada una de las regiones que constituyen al freno de compuerta se ha indicado con flechas y en rojo el puente salino que se forma entre el E424, la R474 y la lisina K470. En los paneles (B), (C) y (D) se muestran los modelos de las mutantes D2b, PA61 y PA6T1-2. Es importante comparar con respecto al canal silvestre las modificaciones estructurales (en rojo) que caracterizan a cada mutante: en la mutante D2b, se muestra la pérdida de gran parte de la segunda α -hélice. En el modelo de PA61, se puede observar que la presencia de las alaninas provocó la pérdida de algunas de las interacciones con la segunda α -hélice, al igual que en el modelo de la mutante PA6T1-2. Estos cambios no permitieron la formación del puente salino entre ambas hélices.

V. DISCUSIÓN

1. Primera Sección: Papel de la papaína y de los segmentos S1, S2 y S3 del dominio III en la inactivación de los canales tipo T.

La participación de las asas intracelulares en la inactivación de canales de sodio y potasio se infirió a partir de experimentos clásicos de aplicación de proteasas (i.e. tripsina, papaína, pronasa). Estas enzimas evitan la inactivación ejerciendo su acción proteolítica sobre el asa III-IV de la subunidad α de los canales Na_v (Catterall, 2000a) o sobre el amino terminal de canales de potasio (revisado en Tombola et al., 2005; Tombola et al., 2006). Debido a que las corrientes de los canales tipo T se inactivan rápidamente, como en los canales de sodio, el primer objetivo del presente estudio fue el de explorar el efecto de la papaína sobre la inactivación de los canales tipo T de humano, para determinar si la región responsable de dicho proceso también se encuentra en una asa intracelular. Al llevar a cabo dicho estudio funcional con patch clamp, se encontró que el uso de la papaína (y la tripsina, en algunos experimentos) no afectó la inactivación de los canales de calcio tipo T pero disminuyó la amplitud de la corriente de calcio (Fig. 5). A pesar de que en los canales tipo T y en los de sodio existe similar número de sitios potenciales de corte para la papaína y tripsina, los efectos observados fueron diferentes. Esto se debió probablemente a que la acción de las proteasas sobre los canales tipo T resulta en la hidrólisis de regiones importantes para la integridad funcional del canal.

La participación de dominios intracelulares en el proceso de inactivación ha sido previamente estudiada por otros grupos con resultados a veces contradictorios. Por ejemplo, el grupo de Nilius, encontró que los primeros 23 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de $\text{Ca}_v3.1$ (clonado de ratón) participan en la inactivación no así el asa III-IV (Staes et al., 2001). Por otro lado, Lee, en otros estudios (Park et al., 2004; Kang et al., 2008), mostró evidencias de que el asa III-IV y el extremo carboxilo terminal del canal $\text{Ca}_v3.3$ (clonado de rata) contribuyen a la inactivación. Por su parte, el grupo de Zamponi (Hamid et al., 2006) reportó que el carboxilo terminal de canales clonados de humano, no está involucrado en la inactivación. Las diferencias funcionales entre los

resultados previamente mencionados, podrían deberse a que entre las clonas de ratón, rata y humano, existen variaciones en sus secuencias de aminoácidos. De cualquier forma, dichos análisis parecen sugerir que los determinantes moleculares responsables de la inactivación de los canales tipo T no se encuentran circunscritos a una sola región en particular.

Lo anterior se confirmó con nuestros resultados de la quimera $GI_{S123-DIII}$, los cuales indican que los primeros tres segmentos del dominio III, tampoco contribuyen a la cinética de inactivación rápida, a pesar de corresponder a las regiones de menor similitud entre los tres canales tipo T. En relación a este resultado, existe sólo un reporte previo en el que se estudió indirectamente la contribución del dominio III de los canales $Ca_v3.1$ en la inactivación rápida que exhiben estos canales (Li et al., 2004). En este trabajo se construyeron quimeras entre un canal HVA ($Ca_v1.2$) de conejo y un LVA ($Ca_v3.1$) de ratón para estudiar las diferencias en el voltaje de activación que presentan ambas clases de canales. Al substituir todo el dominio III del canal LVA por aquel del canal HVA, se observó que la cinética de inactivación de dicha quimera fue significativamente más lenta que el canal LVA silvestre, lo que sugiere una participación de dicho dominio en la inactivación rápida de los canales $Ca_v3.1$. Dicho efecto se podría atribuir al segmento S6 del dominio III (Marksteiner et al., 2001) y no a los segmentos S1, S2 y S3, como muestran los resultados obtenidos con la quimera $GI_{S123-DIII}$.

Los resultados de esta sección, muestran que los determinantes moleculares de la inactivación de los canales tipo T, no se pueden evidenciar por la acción intracelular de proteasas como la papaína y que los segmentos S1, S2 y S3 del dominio III no contribuyen a la inactivación rápida de $Ca_v3.1$.

2. Segunda sección. Caracterización estructural y funcional del freno de la compuerta ubicado en la región inicial del asa I-II del canal Ca_v3.2.

La meta de la presente sección consistió en estudiar la relación estructura-función de los canales Ca_v3.2, con particular interés en el asa que conecta los dominios I y II (asa I-II) de la subunidad α 1. Dos razones principales motivaron dicho objetivo. En primer lugar, se ha reportado que 7 de 12 mutaciones descubiertas en pacientes con epilepsia de tipo ausencia se sitúan precisamente en el asa I-II del canal Ca_v3.2 (Chen et al., 2003b). En segundo lugar, la observación de que tales mutaciones introducen severas modificaciones en el *gating* y en la expresión de los canales Ca_v3.2 (Vitko et al., 2005; Vitko et al., 2007). Estos últimos estudios también demostraron que la eliminación de la región distal del asa I-II resultó en incrementos significativos en la expresión del canal, mientras que la remoción de la región inicial de la misma asa, afectó la apertura y cierre del canal Ca_v3.2.

Por lo tanto, esta sección experimental se enfocó a estudiar con mayor detalle la región inicial del asa I-II, a la que por sus características de modificar la dependencia al voltaje de la activación del canal, así como la de acelerar el curso temporal de las corrientes, se le denominó freno de la compuerta (*gating brake*). Con base en los resultados obtenidos de técnicas computacionales y de difracción circular, se propone que la estructura del freno de la compuerta está formada por dos α -hélices paralelas que se unen por un giro. Esta hipótesis se exploró con la construcción de 18 mutantes que modificaron la estructura del freno de la compuerta. Su estudio funcional reflejó que se afectan significativamente la dependencia al voltaje así como las cinéticas de la activación e inactivación cuando se altera la integridad estructural del freno de la compuerta.

Finalmente, el modelado de la estructura tridimensional de dichas mutantes proporcionó información que permitió explicar los efectos de cada una de ellas sobre el funcionamiento del canal Ca_v3.2. A continuación se discuten estas observaciones, así como su relevancia e implicaciones.

A. El freno de la compuerta presenta un alto contenido de α -hélices.

Las predicciones de estructura secundaria realizadas con el programa computacional SOPMA y con el meta servidor BioInfoBank sugirieron que la estructura secundaria del asa I-II podría estar formada por dos α -hélices interconectadas por una asa con un plegamiento paralelo similar al que se presenta en la proteína fumarasa (Fig. 12B). Para apoyar esta predicción, se realizó un estudio de dicroísmo circular a un péptido correspondiente a los primeros 105 aminoácidos del asa I-II del canal $Ca_v3.2$. Los resultados de este estudio mostraron que, en efecto, la estructura de la región proximal del asa I-II del canal $Ca_v3.2$ se encuentra constituida principalmente por α -hélices (Fig. 12D). Para probar que la estructura secundaria del asa I-II está formada por dos α -hélices interconectadas por una asa con un plegamiento paralelo se realizaron dieciocho mutantes (Fig. 13) que permitieron además estudiar y dilucidar la contribución de cada región del freno de la compuerta en el control de la actividad del canal $Ca_v3.2$.

Cabe mencionar que con la intención de obtener más detalles de la estructura del freno de la compuerta, se intentó realizar resonancia magnética nuclear; sin embargo, debido a problemas de agregación de la proteína durante su purificación, dicho estudio no se pudo llevar a cabo.

B. La α -hélice 2 del freno de la compuerta afecta la actividad de los canales $Ca_v3.2$.

Las consecuencias funcionales debidas a las modificaciones estructurales hechas en la α -hélice 2 del freno de la compuerta, se observaron principalmente en la activación de los canales $Ca_v3.2$. Los resultados obtenidos con las deleciones D2b, D2c, D2d y D2e indicaron que el freno de la compuerta se localiza en la región que abarca desde los primeros residuos del asa I-II hasta la serina 484 (S484).

Las dos primeras deleciones y en especial D2b, modificaron significativamente la dependencia al voltaje de la activación (Fig. 14B), la inactivación en el estado estacionario (Fig. 15B) y la cinética de activación e inactivación (Fig. 14C y D). Estos cambios dramáticos en la actividad de la mutante D2b se pueden explicar con su

modelo tridimensional (Fig. 19B). En este último es posible observar que en la mutante D2b se perdió la presencia del puente salino existente en los canales silvestres entre el ácido glutámico E424 (α -hélice 1) y la arginina R474 así como con la lisina K470 (α -hélice 2).

Es de particular interés, notar que las mutantes PA62 y PPG2, mostraron aceleramientos similares en la activación pero no en la inactivación (Figs. 16B y D). En general, las mutaciones que produjeron cambios significativos en la cinética de activación también modificaron de forma significativa la activación dependiente de voltaje. Esto no siempre ocurrió para el caso de la inactivación, ya que algunas mutantes afectaron drásticamente la cinética de inactivación de los canales $Ca_v3.2$, pero causaron efectos menos significativos en la inactivación dependiente de voltaje (por ejemplo, la delección D2c; Fig. 14E y 15B). Los efectos concomitantes observados en la activación e inactivación en el estado estacionario observados en el presente estudio, pueden explicarse por el acoplamiento que existe entre la inactivación y la activación en los canales tipo T (Carbone & Lux, 1987; Talavera & Nilius, 2006).

Por otro lado, al estudiar la mutante PA63, se encontró que debido a la sustitución por alaninas de los aminoácidos FRKVKRR de la α -hélice 2 (que en su mayoría cuentan con carga positiva), se afectaron significativamente la dependencia al voltaje y las cinéticas de la activación e inactivación (Tabla 2). Este resultado comprobó una vez más, la importancia de la lisina 470 (K470) y de la arginina 474 (R474) en la formación del puente salino entre ambas hélices. Este grupo de residuos con carga positiva fueron eliminados en la mutante D2d, sin embargo, en este caso no se afectó significativamente la dependencia al voltaje de la curva de inactivación ni las cinéticas de la corriente (Tabla 2). Con base en el modelo de esta mutante, se podría especular que el puente salino se podría restaurar con alguna de las siguientes argininas, la R477 o la R481. Cabe mencionar que la mutante D2e, a la que le faltan los ocho aminoácidos más distales de la región estudiada (Fig. 13) se caracterizó por presentar un comportamiento prácticamente idéntico al del canal silvestre (Fig. 14, 15 y Tabla 2), lo que sugiere que la región eliminada en esta mutante ya no afecta la función de los canales $Ca_v3.2$ (Arias-Olguin et al., 2008). En consecuencia es posible concluir que el

freno de la compuerta termina justo después de esta región densamente cargada, y que la misma desempeña un papel crítico en la función del canal Ca_v3.2.

C. Relevancia de la estructura de las α -hélices del freno de la compuerta.

Para determinar el papel que juega la estructura de las α -hélices en el funcionamiento del freno de la compuerta se substituyeron los seis residuos centrales de cada hélice por alaninas (PA6) o por prolinas y glicinas (PPG). Estos residuos fueron seleccionados debido a que las prolinas desestabilizan la estructura de la α -hélice (Macarthur & Thornton, 1991) y las glicinas porque promueven una mayor flexibilidad en las regiones localizadas justo por debajo de estos residuos (Labro et al., 2003). En cambio, las alaninas se usaron por su característica de preservar la estructura de α -hélice (O'Neil & DeGrado, 1990; Blaber et al., 1993). Conforme a lo esperado, la presencia de prolinas y glicinas, provocaron cambios en la apertura y cierre (gating) (Fig. 16A y C), así como en las cinéticas de las corrientes de los canales Ca_v3.2. El ejemplo más representativo fue el de la mutante PPGI cuya cinética de inactivación ocurrió más lentamente y también, en forma significativa, se corrieron la dependencia al voltaje de la inactivación y activación hacia potenciales más negativos con respecto al control (Tabla 2). Estos cambios sugieren que la integridad estructural de la parte media de las α -hélices es importante en el funcionamiento de los canales Ca_v3.2. Algo inesperado fue que también las substituciones por alaninas provocaron cambios significativos en la apertura y cierre de los canales Ca_v3.2 (Fig. 16A y C). Tal fue el caso para la mutante PA61, que mostró incrementos significativos en su conductancia máxima (Tabla 2). Este incremento podría deberse a que las substituciones de los aminoácidos de la región media de la hélice 1 por alaninas, no permitieron la formación del puente salino que se establece entre la primera y segunda α -hélice como se ilustra en el modelo estructural de esta mutante (Fig. 19C). Cabe mencionar, que los residuos que forman el puente salino (E424, R474 y K470) además de conservarse en los tres canales de mamífero que forman a la familia Ca_v3, también se encuentran presentes en el homólogo de *Drosophila* (No. de acceso el GenBank NP_572296).

La importancia del puente salino en la función de los canales $Ca_v3.2$, también se verificó al recorrer las mutaciones hechas en las mutantes PA61y PPG1, tan solo dos posiciones hacia el extremo carboxilo terminal de la primera α -hélice. En estas mutantes denominadas PA64 y PPG4, también se substituyeron residuos por alaninas o por prolinas y glicinas. En el caso de la mutante PA64, se observó que sus propiedades biofísicas fueron muy similares al control y que en el caso de la mutante PPG4, la presencia de las prolinas y glicinas afectaron significativamente la función de los canales $Ca_v3.2$ porque se corrieron sus curvas de activación e inactivación dependientes de voltaje hacia potenciales más negativos y se aceleraron las cinéticas de sus corrientes. En resumen, tanto los resultados electrofisiológicos, así como los modelos estructurales indican que la integridad del puente salino y por lo tanto, de la estructura de las α -hélices del freno de la compuerta es crítica para el funcionamiento normal de los canales $Ca_v3.2$ (Arias-Olguin et al., 2008).

D. El freno de la compuerta se orienta específicamente con respecto al $Ca_v3.2$.

Con el propósito de conocer el papel que juega la orientación del freno de la compuerta, se insertaron alaninas al principio de la α -hélice 1 (mutantes H1A). Las alaninas fueron seleccionadas debido a que, por su pequeño tamaño y a su naturaleza hidrofóbica, tienden a asociarse entre ellas y a minimizar la superficie de contacto con solventes polares y con otras regiones (Senes et al., 2004) (Fig. 19C y D). Con base en esto, se propuso que la inserción de una, dos o tres alaninas, afectarían por ende la orientación del freno de la compuerta en relación al canal $Ca_v3.2$. Además, se propuso que cada aminoácido introducido alteraría la rotación que estabiliza a la cadena principal de la α -hélice 1 (alrededor de 100°) y propiciaría extensiones de 1.5 \AA de la misma (Pestko, 2004).

De acuerdo con esta predicción, la inserción de alaninas provocó que en estas mutantes los puntos medios de activación e inactivación se corrieran significativamente hacia potenciales negativos (Fig. 17A y B; Tabla 2). Esto significa que en dichas mutantes se necesita una menor despolarización para que se abran los canales o para incrementar la fracción de canales inactivados desde el estado cerrado. También se

observó que las cinéticas de activación e inactivación se aceleraron significativamente en las mutantes H1A1 y H1A3, mientras que la cinética de inactivación de la mutante H1A2 fue significativamente más lenta (Fig. 17D, Tabla 2). En el panel D de esa figura, se puede observar que las constantes de tiempo de las mutantes H1A1 y H1A3 se caracterizaron por casi no mostrar dependencia al voltaje (Tabla 2). Estos resultados sugieren que al perderse la integridad estructural del inicio de la α -hélice 1 así como su orientación relativa a condiciones normales, se provocan cambios en la actividad de los canales $Ca_v3.2$.

Una propiedad similar se ha demostrado para los canales HVA, en donde se ha visto que es importante que se mantenga la orientación precisa de la subunidad beta en relación a estos canales de calcio, para que pueda ser regulada su función (Vitko et al., 2007; Vitko et al., 2008; Baumgart et al., 2008). También, en los canales de potasio, se sabe que las regiones citoplasmáticas de los segmentos S6, contribuyen al funcionamiento de la compuerta de activación al orientarse de forma adecuada (Jiang et al., 2002a; Jiang et al., 2002b). En conclusión, el freno de la compuerta está orientado en forma precisa en relación al canal $Ca_v3.2$, lo que repercute a su vez, sobre la función de estos canales.

E. La región del asa es clave en la conformación del freno de la compuerta.

El papel que juega el asa se dedujo a partir de mutantes que reemplazaron los residuos de ésta por alaninas, convirtiendo a dicha región en una α -hélice (Fig. 13). A consecuencia de estas modificaciones, se vieron afectadas la dependencia al voltaje así como las constantes de tiempo en la activación e inactivación de estas mutantes. Estos cambios significativos se hicieron aún más evidentes en las mutantes PA6T12, donde se reemplazaron al mismo tiempo doce residuos del asa por alaninas, y DC1 en la cual la región del asa se eliminó por completo (Fig. 18, Tabla 2). Las cinéticas de activación e inactivación, de las cuatro mutantes analizadas en este contexto, se aceleraron en todos los voltajes estudiados (Figs. 18C y D). Incluso, dicha aceleración se acentuó en el rango independiente de voltaje (entre los -30 y 0 mV). Esto puede explicarse por cambios en la apertura y cierre del canal y no por aquellos inducidos por

los corrimientos en las curvas de la dependencia al voltaje de la activación. Estos datos indican que la región del asa es importante para mantener las interacciones que se forman entre ambas α -hélices, así como su conformación antiparalela.

Los modelos estructurales generados para las mutantes del giro, están de acuerdo con los resultados previamente descritos. En particular, el modelo de la mutante PA6T1-2 puede explicar algunos de los efectos que fueron observados sobre sus propiedades biofísicas (Fig. 19D). En este modelo, es posible ver que la pérdida del ácido aspártico 444 (D444) y del ácido glutámico 452 (E452) junto con la presencia de las alaninas (Senes et al., 2004), hicieron del asa una región muy hidrofóbica que favoreció que la distancia entre las hélices 1 y 2 se modificara con respecto a los canales silvestres. También el modelo de la mutante DC1, ilustró muy bien como se fusionaron ambas α -hélices al eliminar la región del asa. Esto explica porque se afectó de forma significativa el funcionamiento del freno de la compuerta. En conclusión, los modelos estructurales junto con los datos electrofisiológicos previamente mencionados, indican que la región del asa es importante para preservar la conformación del freno de la compuerta, ya que al modificarse dicha zona, se afectan tanto las cinéticas, como la apertura y cierre de los canales $Ca_v3.2$.

F. La alteración estructural del freno de la compuerta induce incrementos en la densidad de corriente.

La mayoría de las mutantes estudiadas en la presente investigación exhibieron corrientes de calcio de mayor amplitud que los canales $Ca_v3.2$ silvestres, incluso cuando los valores de corriente se normalizaron respecto al tamaño celular (estimado a partir del valor de capacitancia membranal, C_m ; Tabla 2). Para considerar esta circunstancia, se calcularon los valores de conductancia cuerda (ver Métodos) para así obtener la conductancia máxima, normalizada por unidad de C_m (G_{max} ; nS/pF). Aún después de esta corrección, principalmente las mutantes D2b, D2c, PA61 y H1A3 mostraron incrementos de más del doble en la densidad de corriente con respecto a los canales silvestres (Tabla 2). Existen al menos dos posibles explicaciones para tales incrementos: a) que las mutaciones que alteran la integridad estructural de la región

inicial del asa I-II, incrementan la probabilidad de apertura del canal (P_0), y b) que promueven un aumento en el número de canales expresados en la membrana plasmática (Vitko et al., 2007; Baumgart et al., 2008).

G. Comparación con la función del asa I-II de los canales HVA.

Los resultados obtenidos en este trabajo son los primeros que asocian al asa I-II con la modulación de los canales LVA. En los canales HVA, por el contrario, la función de esta misma asa intracelular se ha descrito en varios trabajos previos de estructura-función que la han identificado como una región que regula varias propiedades biofísicas y de expresión de los canales HVA (Zhang et al., 1994; Herlitze et al., 1997; Adams & Tanabe, 1997; Cens et al., 1999; Restituito et al., 2000; Berrou et al., 2001; Stotz et al., 2004). El asa I-II de los HVA se caracteriza por contener al dominio AID (Pragnell et al., 1994), que le permite unirse y anclarse a una cavidad de la subunidad β (Opatowsky et al., 2004; Chen et al., 2004; Van Petegem et al., 2004) la cual regula su actividad. Además, se ha propuesto que en los canales HVA, el asa I-II participa en el proceso de inactivación a través de dos formas: la obstrucción directa del poro por esta asa intracelular o, por la disociación de la misma de un lugar de unión en los segmentos S6, previniendo así la constricción del poro (Cens et al., 2006). Asimismo, se ha sugerido que los segmentos S6 podrían formar las compuertas de activación e inactivación en los canales HVA (Hering et al., 1997; Stotz & Zamponi, 2001; Berjukow et al., 2001; Shi & Soldatov, 2002), así como en los LVA (Marksteiner et al., 2001). Los resultados aquí presentados permiten especular que el freno de la compuerta del asa I-II de los canales LVA, podría estar interactuando con los segmentos S6. Cualquier alteración estructural dentro de dicho determinante molecular, podría repercutir en la función de los segmentos S6, que han sido identificados como la compuerta de activación en canales de potasio (Jiang et al., 2002) y de sodio (Zhao et al., 2004). Finalmente, se puede concluir con base en los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo, que el freno de la compuerta está formado por los primeros 60 residuos del asa I-II cuya función es la de mantener a los canales $Ca_v3.2$ cerrados a valores cercanos al potencial de reposo (Arias-Olguin et al., 2008). Además, este determinante molecular se conserva en los canales $Ca_v3.1$ y $Ca_v3.3$ (Baumgart et al., 2008).

VI. CONCLUSIONES

1. La acción proteolítica intracelular de la papaína no elimina la inactivación de los canales tipo T.
2. El efecto de la papaína consistió en una disminución gradual en la amplitud de la corriente máxima conforme transcurre el tiempo de registro en la configuración de célula completa. Es probable que dicho efecto sea debido a una acción proteolítica sobre la integridad funcional de los canales tipo T.
3. Los segmentos S1, S2 y S3 del dominio III no contribuyen de manera significativa a la inactivación rápida de los canales $Ca_v3.1$ de humano.
4. El freno de la compuerta es un determinante molecular constituido por los primeros 60 aminoácidos del asa I-II, que normalmente funciona como un freno que mantiene cerrados a los canales $Ca_v3.2$ en el estado de reposo.
5. La estructura del freno de la compuerta consiste de dos α -hélices antiparalelas conectadas por una asa.
6. La integridad funcional de la estructura del freno de la compuerta es crucial para el funcionamiento normal de los canales $Ca_v3.2$.
7. Las evidencias presentadas en el presente estudio ubican al asa intracelular I-II de la subunidad $\alpha 1$ de los canales $Ca_v3.2$ como el primer determinante molecular intracelular asociado con el control de la activación dependiente de voltaje de los canales tipo T.

VII. REFERENCIAS

1. Adams, B. & Tanabe, T. 1997. Structural regions of the cardiac Ca channel alpha subunit involved in Ca-dependent inactivation. *J Gen Physiol* 110:379-389.
2. 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 Ca²⁺ channels. *FEBS Lett* 579:3907-3912.
3. Arias-Olguin, I.I., Vitko, I., Fortuna, M., Baumgart, J.P., Sokolova, S., Shumilin, I.A., Van Deusen, A., Soriano-Garcia, M., Gomora, J.C., & Perez-Reyes, E. 2008. Characterization of the Gating Brake in the I-II Loop of Cav3.2 T-type Ca²⁺ Channels. *J Biol Chem* 283:8136-8144.
4. Arikath, J. & Campbell, K.P. 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13:298-307.
5. Armstrong, C.M., Bezanilla, F., & Rojas, E. 1973. Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J Gen Physiol* 62:375-391.
6. Armstrong, C.M. & Matteson, D.R. 1985. Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* 227:65-67.
7. Baumgart, J.P., Vitko, I., Bidaud, I., Kondratskyi, A., Lory, P., & Perez-Reyes, E. 2008. I-II loop structural determinants in the gating and surface expression of low voltage-activated calcium channels. *PLoS ONE* 3:e2976.
8. 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.
9. Berjukow, S., Marksteiner, R., Sokolov, S., Weiss, R.G., Margreiter, E., & Hering, S. 2001. Amino acids in segment IVS6 and beta-subunit interaction support distinct conformational changes during Ca^v 2.1 inactivation. *J Biol Chem* 276:17076-17082.
10. Berridge, M.J., Bootman, M.D., & Roderick, H.L. 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529.
11. Berrou, L., Bernatchez, G., & Parent, L. 2001. Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of alpha1E (CaV2.3) calcium channels. *Biophys J* 80:215-228.
12. Blaber, M., Zhang, X.J., & Matthews, B.W. 1993. Structural basis of amino acid alpha helix propensity. *Science* 260:1637-1640.
13. Carbone, E. & Lux, H.D. 1984. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310:501-502.
14. Carbone, E. & Lux, H.D. 1987. Single low-voltage-activated calcium channels in chick and rat sensory neurones. *J Physiol* 386:571-601.
15. Catterall, W.A. 2000a. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* 26:13-25.
16. Catterall, W.A. 2000b. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
17. Catterall, W.A. & Few, A.P. 2008. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 59:882-901.

18. Cens, T., Restituito, S., Galas, S., & Charnet, P. 1999. Voltage and calcium use the same molecular determinants to inactivate calcium channels. *J Biol Chem* 274:5483-5490.
19. Cens, T., Rousset, M., Leyris, J.P., Fesquet, P., & Charnet, P. 2006. Voltage- and calcium-dependent inactivation in high voltage-gated Ca²⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol* 90:104-117.
20. Chemin, J., Nargeot, J., & Lory, P. 2002. Neuronal T-type alpha 1H calcium channels induce neurogenesis and expression of high-voltage-activated calcium channels in the NG108-15 cell line. *J Neurosci* 22:6856-6862.
21. Chen, C.C., Lamping, K.G., Nuno, D.W., Barresi, R., Prouty, S.J., Lavoie, J.L., Cribbs, L.L., England, S.K., Sigmund, C.D., Weiss, R.M., Williamson, R.A., Hill, J.A., & Campbell, K.P. 2003a. Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca²⁺ channels. *Science* 302:1416-1418.
22. Chen, Y., Lu, J., Pan, H., Zhang, Y., Wu, H., Xu, K., Liu, X., Jiang, Y., Bao, X., Yao, Z., Ding, K., Lo, W.H., Qiang, B., Chan, P., Shen, Y., & Wu, X. 2003b. Association between genetic variation of CACNA1H and childhood absence epilepsy. *Ann Neurol* 54:239-243.
23. 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 Ca²⁺ channels. *Nature* 429:675-680.
24. Cota, G. & Armstrong, C.M. 1989. Sodium channel gating in clonal pituitary cells. The inactivation step is not voltage dependent. *J Gen Physiol* 94:213-232.
25. Cribbs, L.L., Gomora, J.C., Daud, A.N., Lee, J.H., & Perez-Reyes, E. 2000. Molecular cloning and functional expression of Ca^v3.1c, a T-type calcium channel from human brain. *FEBS Lett* 466:54-58.
26. 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 Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* 83:103-109.
27. Darszon, A., Lopez-Martinez, P., Acevedo, J.J., Hernandez-Cruz, A., & Trevino, C.L. 2006. T-type Ca²⁺ channels in sperm function. *Cell Calcium* 40:241-252.
28. Doyle, D.A., Morais, C.J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., & MacKinnon, R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
29. Dubinsky, J.M. & Oxford, G.S. 1984. Ionic currents in two strains of rat anterior pituitary tumor cells. *J Gen Physiol* 83:309-339.
30. Enyeart, J.J., Mlinar, B., & Enyeart, J.A. 1993. T-type Ca²⁺ channels are required for adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by bovine adrenal zona fasciculata cells. *Mol Endocrinol* 7:1031-1040.

31. 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.
32. Fozzard, H.A. & Hanck, D.A. 1996. Structure and function of voltage-dependent sodium channels: comparison of brain II and cardiac isoforms. *Physiol Rev* 76:887-926.
33. 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.
34. Gomora, J.C., Xu, L., Enyeart, J.A., & Enyeart, J.J. 2000. Effect of mibefradil on voltage-dependent gating and kinetics of T-type Ca²⁺ channels in cortisol-secreting cells. *J Pharmacol Exp Ther* 292:96-103.
35. Hagiwara, S., Ozawa, S., & Sand, O. 1975. Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish. *J Gen Physiol* 65:617-644.
36. Hamid, J., Peloquin, J.B., Monteil, A., & Zamponi, G.W. 2006. Determinants of the differential gating properties of Cav3.1 and Cav3.3 T-type channels: a role of domain IV? *Neuroscience* 143:717-728.
37. 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.
38. Hering, S., Aczel, S., Kraus, R.L., Berjukow, S., Striessnig, J., & Timin, E.N. 1997. Molecular mechanism of use-dependent calcium channel block by phenylalkylamines: role of inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13323-13328.
39. Herlitze, S., Hockerman, G.H., Scheuer, T., & Catterall, W.A. 1997. Molecular determinants of inactivation and G protein modulation in the intracellular loop connecting domains I and II of the calcium channel alpha1A subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1512-1516.
40. Heron, S.E., Phillips, H.A., Mulley, J.C., Mazarib, A., Neufeld, M.Y., Berkovic, S.F., & Scheffer, I.E. 2004. Genetic variation of CACNA1H in idiopathic generalized epilepsy. *Ann Neurol* 55:595-596.
41. Higueldo García, 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.
42. Hille, B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
43. Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. 1952a. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* 116:449-472.
44. Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F. 1952b. The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J Physiol* 116:473-496.
45. 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.

46. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., & KATZ, B. 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J Physiol* 116:424-448.
47. Horton, R.M., Cai, Z.L., Ho, S.N., & Pease, L.R. 1990. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 8:528-535.
48. Hoshi, T., Zagotta, W.N., & Aldrich, R.W. 1990. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science* 250:533-538.
49. Jevtovic-Todorovic, V. & Todorovic, S.M. 2006. The role of peripheral T-type calcium channels in pain transmission. *Cell Calcium* 40:197-203.
50. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., & MacKinnon, R. 2002. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417:523-526.
51. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., & MacKinnon, R. 2003. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423:33-41.
52. Kang, H.W., Park, J.Y., & Lee, J.H. 2008. Distinct contributions of different structural regions to the current kinetics of the Cav3.3 T-type Ca²⁺ channel. *Biochim Biophys Acta* 1778:2740-2748.
53. Khosravani, H., Altier, C., Simms, B., Hamming, K.S., Snutch, T.P., Mezeyova, J., McRory, J.E., & Zamponi, G.W. 2004. Gating effects of mutations in the Cav3.2 T-type calcium channel associated with childhood absence epilepsy. *J Biol Chem* 279:9681-9684.
54. Khosravani, H. & Zamponi, G.W. 2006. Voltage-gated calcium channels and idiopathic generalized epilepsies. *Physiol Rev* 86:941-966.
55. 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.
56. Labro, A.J., Raes, A.L., Bellens, I., Ottschytch, N., & Snyders, D.J. 2003. Gating of shaker-type channels requires the flexibility of S6 caused by prolines. *J Biol Chem* 278:50724-50731.
57. Lacinova, L. 2005. Voltage-dependent calcium channels. *General Physiology and Biophysics* 24:3-78.
58. 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.
59. Lee, J.H., Daud, A.N., Cribbs, L.L., Lacerda, A.E., Pereverzev, A., Klockner, U., Schneider, T., & Perez-Reyes, E. 1999. Cloning and expression of a novel member of the low voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* 19:1912-1921.
60. Li, J., Stevens, L., Klugbauer, N., & Wray, D. 2004. Roles of molecular regions in determining differences between voltage dependence of activation of CaV3.1 and CaV1.2 calcium channels. *J Biol Chem* 279:26858-26867.
61. Llinas, R. & Yarom, Y. 1981. Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances. *J Physiol* 315:549-567.

62. Long, S.B., Campbell, E.B., & MacKinnon, R. 2005. Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel. *Science*.
63. Long, S.B., Tao, X., Campbell, E.B., & MacKinnon, R. 2007. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450:376-382.
64. Lu, F., Chen, H., Zhou, C., Liu, S., Guo, M., Chen, P., Zhuang, H., Xie, D., & Wu, S. 2008. T-type Ca²⁺ channel expression in human esophageal carcinomas: a functional role in proliferation. *Cell Calcium* 43:49-58.
65. MacArthur, M.W. & Thornton, J.M. 1991. Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol* 218:397-412.
66. Mangoni, M.E., Couette, B., Marger, L., Bourinet, E., Striessnig, J., & Nargeot, J. 2006. Voltage-dependent calcium channels and cardiac pacemaker activity: from ionic currents to genes. *Prog Biophys Mol Biol* 90:38-63.
67. Marksteiner, R., Schurr, P., Berjukow, S., Margreiter, E., Perez-Reyes, E., & Hering, S. 2001. Inactivation determinants in segment IIIIS6 of Ca (v) 3.1. *J Physiol* 537:27-34.
68. 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.
69. Matteson, D.R. & Armstrong, C.M. 1984. Na and Ca channels in a transformed line of anterior pituitary cells. *J Gen Physiol* 83:371-394.
70. McGivern, J.G. 2006. Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain. *Drug Discov Today* 11:245-253.
71. Mitterdorfer, J., Grabner, M., Kraus, R.L., Hering, S., Prinz, H., Glossmann, H., & Striessnig, J. 1998. Molecular basis of drug interaction with L-type Ca²⁺ channels. *J Bioenerg Biomembr* 30:319-334.
72. Monteil, A., Chemin, J., Bourinet, E., Mennessier, G., Lory, P., & Nargeot, J. 2000. Molecular and functional properties of the human alpha (1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J Biol Chem* 275:6090-6100.
73. Myers, J.K., Pace, C.N., & Scholtz, J.M. 1997. A direct comparison of helix propensity in proteins and peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2833-2837.
74. Nowycky, M.C., Fox, A.P., & Tsien, R.W. 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
75. O'Neil, K.T. & DeGrado, W.F. 1990. A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science* 250:646-651.
76. Opatowsky, Y., Chen, C.C., Campbell, K.P., & Hirsch, J.A. 2004. 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.
77. Park, J.Y., Kang, H.W., Jeong, S.W., & Lee, J.H. 2004. Multiple structural elements contribute to the slow kinetics of the Cav3.3 T-type channel. *J Biol Chem* 279:21707-21713.

78. Peloquin, J.B., Khosravani, H., Barr, W., Bladen, C., Evans, R., Mezeyova, J., Parker, D., Snutch, T.P., McRory, J.E., & Zamponi, G.W. 2006. Functional analysis of Ca_v3.2 T-type calcium channel mutations linked to childhood absence epilepsy. *Epilepsia* 47:655-658.
79. Perez-Reyes, E. 1998. Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 30:313-318.
80. Perez-Reyes, E. 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83:117-161.
81. 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.
82. 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.
83. Prommer, E. 2006. Ziconotide: a new option for refractory pain. *Drugs Today (Barc)* 42:369-378.
84. Randall, A. & Benham, C.D. 1999. Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Mol Cell Neurosci* 14:255-272.
85. Restituito, S., Cens, T., Barrere, C., Geib, S., Galas, S., De Waard, M., & Charnet, P. 2000. The [beta]2a subunit is a molecular groom for the Ca²⁺ channel inactivation gate. *J Neurosci* 20:9046-9052.
86. Rohl, C.A., Chakrabartty, A., & Baldwin, R.L. 1996. Helix propagation and N-cap propensities of the amino acids measured in alanine-based peptides in 40 volume percent trifluoroethanol. *Protein Sci* 5:2623-2637.
87. Schrier, A.D., Wang, H., Talley, E.M., Perez-Reyes, E., & Barrett, P.Q. 2001. alpha1H T-type Ca²⁺ channel is the predominant subtype expressed in bovine and rat zona glomerulosa. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C265-C272.
88. Shi, C. & Soldatov, N.M. 2002. Molecular determinants of voltage-dependent slow inactivation of the Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* 277:6813-6821.
89. Splawski, I., Yoo, D.S., Stotz, S.C., Cherry, A., Clapham, D.E., & Keating, M.T. 2006. CACNA1H mutations in autism spectrum disorders. *J Biol Chem* 281:22085-22091.
90. Staes, M., Talavera, K., Klugbauer, N., Prenen, J., Lacinova, L., Droogmans, G., Hofmann, F., & Nilius, B. 2001. The amino side of the C-terminus determines fast inactivation of the T-type calcium channel alpha1G. *J Physiol* 530:35-45.
91. Stotz, S.C., Jarvis, S.E., & Zamponi, G.W. 2004. Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. *J Physiol* 554:263-273.
92. Stotz, S.C. & Zamponi, G.W. 2001. Identification of inactivation determinants in the domain IIS6 region of high voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* 276:33001-33010.

93. Stuhmer, W., Conti, F., Suzuki, H., Wang, X.D., Noda, M., Yahagi, N., Kubo, H., & Numa, S. 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339:597-603.
94. Talavera, K. & Nilius, B. 2006. Evidence for common structural determinants of activation and inactivation in T-type Ca²⁺ channels. *Pflügers Arch* 453:189-201.
95. Talley, E.M., Cribbs, L.L., Lee, J.H., Daud, A., Perez-Reyes, E., & Bayliss, D.A. 1999. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 19:1895-1911.
96. Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., & Numa, S. 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-318.
97. Taylor, J.T., Huang, L., Pottle, J.E., Liu, K., Yang, Y., Zeng, X., Keyser, B.M., Agrawal, K.C., Hansen, J.B., & Li, M. 2008a. Selective blockade of T-type Ca²⁺ channels suppresses human breast cancer cell proliferation. *Cancer Lett* 267:116-124.
98. Taylor, J.T., Zeng, X.B., Pottle, J.E., Lee, K., Wang, A.R., Yi, S.G., Scruggs, J.A., Sikka, S.S., & Li, M. 2008b. Calcium signaling and T-type calcium channels in cancer cell cycling. *World J Gastroenterol* 14:4984-4991.
99. Tombola, F., Pathak, M.M., & Isacoff, E.Y. 2005. How far will you go to sense voltage? *Neuron* 48:719-725.
100. Tombola, F., Pathak, M.M., & Isacoff, E.Y. 2006. How does voltage open an ion channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:23-52.
101. 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.
102. Vandenberg, C.A. & Horn, R. 1984. Inactivation viewed through single sodium channels. *J Gen Physiol* 84:535-564.
103. Vassilev, P., Scheuer, T., & Catterall, W.A. 1989. Inhibition of inactivation of single sodium channels by a site-directed antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8147-8151.
104. Vassilev, P.M., Scheuer, T., & Catterall, W.A. 1988. Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* 241:1658-1661.
105. Veselovskii, N.S. & Fedulova, S.A. 1983. [2 types of calcium channels in the somatic membrane of spinal ganglion neurons in the rat]. *Dokl Akad Nauk SSSR* 268:747-750.
106. Vitko, I., Bidaud, I., Arias, J.M., Mezghrani, A., Lory, P., & Perez-Reyes, E. 2007. The I-II loop controls plasma membrane expression and gating of Ca^v_{3.2} T-type Ca²⁺ channels: a paradigm for childhood absence epilepsy mutations. *J Neurosci* 27:322-330.
107. Vitko, I., Chen, Y., Arias, J.M., Shen, Y., Wu, X.R., & Perez-Reyes, E. 2005. Functional characterization and neuronal modeling of the effects of childhood absence epilepsy variants of CACNA1H, a T-type calcium channel. *J Neurosci* 25:4844-4855.

108. Vitko, I., Shcheglovitov, A., Baumgart, J.P., Arias-Olguin, I.I., Murbartian, J., Arias, J.M., & Perez-Reyes, E. 2008. Orientation of the calcium channel beta relative to the alpha (1) 2.2 subunit is critical for its regulation of channel activity. *PLoS ONE* 3:e3560.
109. Xiao, H., Zhang, X.C., Zhang, L., Dai, X.Q., Gong, W., Cheng, J., Gao, R., & Wang, X. 2006. Fenvalerate modifies T-type Ca²⁺ channels in mouse spermatogenic cells. *Reprod Toxicol* 21:48-53.
110. Yunker, A.M., Sharp, A.H., Sundarraj, S., Ranganathan, V., Copeland, T.D., & McEnery, M.W. 2003. Immunological characterization of T-type voltage-dependent calcium channel CaV3.1 (alpha 1G) and CaV3.3 (alpha 1I) isoforms reveal differences in their localization, expression, and neural development. *Neuroscience* 117:321-335.
111. Zhang, J.F., Ellinor, P.T., Aldrich, R.W., & Tsien, R.W. 1994. Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* 372:97-100.
112. Zhao, Y., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., & Catterall, W.A. 2004. A gating hinge in Na⁺ channels; a molecular switch for electrical signaling. *Neuron* 41:859-865.

APÉNDICE

Characterization of the Gating Brake in the I-II Loop of Ca_v3.2 T-type Ca²⁺ Channels^{*[5]}

Received for publication, October 23, 2007, and in revised form, January 16, 2008. Published, JBC Papers in Press, January 24, 2008, DOI 10.1074/jbc.M708761200

Imilla I. Arias-Olguín^{†§1}, Iuliia Vitko^{†1}, Michal Fortuna[†], Joel P. Baumgart[†], Svetlana Sokolova[†], Igor A. Shumilin^{||}, Amy Van Deusen[†], Manuel Soriano-García^{**}, Juan C. Gomora^{‡2}, and Edward Perez-Reyes^{†1,3}

From the Departments of [†]Pharmacology and ^{||}Molecular Physics and Biological Physics and the [‡]Neuroscience Graduate Program, University of Virginia, Charlottesville, Virginia 22908 and the Institutes of [§]Cellular Physiology and ^{**}Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

Mutations in the I-II loop of Ca_v3.2 channels were discovered in patients with childhood absence epilepsy. All of these mutations increased the surface expression of the channel, whereas some mutations, and in particular C456S, altered the biophysical properties of channels. Deletions around C456S were found to produce channels that opened at even more negative potentials than control, suggesting the presence of a gating brake that normally prevents channel opening. The goal of the present study was to identify the minimal sequence of this brake and to provide insights into its structure. A peptide fragment of the I-II loop was purified from bacteria, and its structure was analyzed by circular dichroism. These results indicated that the peptide had a high α -helical content, as predicted from secondary structure algorithms. Based on homology modeling, we hypothesized that the proximal region of the I-II loop may form a helix-loop-helix structure. This model was tested by mutagenesis followed by electrophysiological measurement of channel gating. Mutations that disrupted the helices, or the loop region, had profound effects on channel gating, shifting both steady state activation and inactivation curves, as well as accelerating channel kinetics. Mutations designed to preserve the helical structure had more modest effects. Taken together, these studies showed that any mutations in the brake, including C456S, disrupted the structural integrity of the brake and its function to maintain these low voltage-activated channels closed at resting membrane potentials.

Voltage-gated calcium (Ca_v) channels regulate calcium influx in response to membrane depolarization. Their main role is to couple the electrical activity of cells with intracellular processes such as contraction, secretion, neurotransmission, and

gene expression in many different cell types (1). Ca_v channels have been divided in two subfamilies, comprising high voltage-activated and low voltage-activated or T-type channels (2–4). These proteins are composed of four or five distinct subunits that are encoded by multiple genes. The main subunit, α 1, contains four homologous repeats (I–IV), each composed of six transmembrane segments (S1–S6). Each repeat shows significant homology to voltage-gated K⁺ channels, such as Shaker (5), and mutagenesis studies have established the conservation of function. For example, mutations in the pore loop between S5 and S6 affect channel permeation (6, 7). Similarly, mutations in the S4 voltage sensors of T-channels affect channel gating as in K⁺ channels (8). Therefore crystal structures of K⁺ channels (9), and models developed for Na⁺ voltage-gated channels (10) are likely to provide insights into T-channel gating. In these models a change in membrane potential triggers an outward movement of the S4 voltage sensors, a concomitant movement of the S4-S5 linker, and a widening of the pore walls formed by S6 segments (10–12). In addition, S6 segments also play a similar role in T-channel inactivation as observed in high voltage-activated channels. For example, mutations in III S6 affect inactivation from the open state in Ca_v3.1 much as they did in Ca_v2.2 channels (13). Mutations in Ca_v1.2 discovered in Timothy syndrome patients dramatically slow inactivation of Ca_v1.2 channels (14), and similarly located mutations in Ca_v3.1 produce a similar effect (15). Despite these advances, little is known about why T-channels activate at lower voltages than other voltage-gated channels.

Toward this end, a recent study (15) reported that the transfer of the I-II loop of a high to a low voltage-activated channel created a chimera that gated at even lower voltages than the low voltage-activated wild type (WT).⁴ A similar result was reported in a functional study of single nucleotide polymorphisms present in childhood absence epilepsy patients (16), where it was observed that the mutation C456S in Ca_v3.2 channels (located in the proximal I-II loop) shifted the voltage dependence of activation to more negative potentials (17). This observation was followed up with a set of deletions exploring the role of the I-II loop in Ca_v3.2 channels (18). This study revealed that the I-II loop has two separable roles: one to regulate surface expression and another to modulate the biophysical properties of Ca_v3.2 channels. The deletions performed within

^{*}This work was supported by National Institutes of Health Grant NS038691 (to E. P.-R.) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant J50250-Q (to J. C. G.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[§]The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. S1.

¹Both authors contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed: Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México. Tel.: 5255-5622-5752; Fax: 5255-5622-5607; E-mail: jgomora@ifc.unam.mx.

³To whom correspondence may be addressed: Dept. of Pharmacology, University of Virginia, Charlottesville, VA 22908. Tel.: 434-982-4440; Fax: 434-982-3878; E-mail: eperez@virginia.edu.

⁴The abbreviations used are: WT, wild type; PPG, poly-proline-glycine; PA, polyalanine; MBP, maltose-binding protein.

the amino-terminal region of this loop modified the voltage dependence of these channels, allowing them to open at even more negative potentials. Such results suggested that the proximal region of this loop normally functions as a "brake" that regulates channel opening. The goal of the present study was to establish the identity of the brake and to make inferences about its structure. For this purpose we used a combination of molecular biological and electrophysiological techniques to test the hypothesis that the region forms a helix-loop-helix motif. To localize the distal end of the brake, we designed a series of deletion mutants. To test the helical structures we made a series of mutations that either stabilized (polyalanine) or disrupted the putative helices (polyglycine and proline). To test the importance of the loop region, we attempted to straighten it by either replacement with an α -helix or by deletion, which would fuse helix 1 to helix 2. Functional analysis of these mutations and deletions revealed a similar contribution of each part of the motif to the activity of $Ca_v3.2$ channels. We conclude that the gating brake has a helix-loop-helix structure contained within the first 60 amino acids after IS6 and that the structural integrity of the brake is important in keeping T-channels closed at the resting membrane potential.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Site-directed Mutagenesis—PCR-based mutagenesis was performed using *Pfu* Ultra DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) and oligonucleotide primers (Invitrogen). The template was a fragment of human $Ca_v3.2a$ cDNA (GenBankTM accession number AF051946) cloned into pGEM-3 (Promega, Madison, WI). As reported previously, a silent mutation was introduced into this fragment to create a second BspEI site (18), which allows recloning of the full-length cDNA by moving the BspEI (880 residues)/BspEI (2638 residues) fragment into pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA). All of the cloning steps were verified by restriction analysis, and the sequence of the BspEI fragment was verified using automated sequencing (University of Virginia Biomolecular Research Facility).

Transfections—Human embryonic kidney 293 cells (HEK-293, CRL-1573; American Type Culture Collection, Manassas, VA) were grown in Dulbecco's modified medium F-12 (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin G (100 units/ml), and streptomycin (0.1 mg/ml). The cells were transiently transfected with plasmid DNAs encoding each $Ca_v3.2$ variant using JET-PEI (Polyplus, Illkirch, France). After ~24 h, green fluorescent protein-positive cells were selected for electrophysiological recordings.

Electrophysiology—Whole cell patch clamp recordings were obtained at room temperature using an Axopatch 200A amplifier equipped with a CV201A head stage. The amplifier was connected to a computer through a Digidata 1200 A/D converter and controlled using pCLAMP 9.2 software (Molecular Devices, Palo Alto, CA). The data were filtered at 2 kHz and digitized at 5 kHz. Whole cell Ca^{2+} currents were recorded using the following external solution 5 mM $CaCl_2$, 166 mM tetraethyl ammonium chloride, and 10 mM HEPES, pH adjusted to 7.4 with tetraethyl ammonium-OH. The internal pipette solution contained the following 125 mM CsCl, 10 mM EGTA, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 4 mM Mg -ATP, 0.3 mM Na_3GTP , and 10

The Gating Brake of $Ca_v3.2$

mM HEPES, pH adjusted to 7.2 with CsOH. The pipettes were made from TW-150-3 capillary tubing (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL). There was no correction of the -9.4 mV junction potential. Under these solution conditions the pipette resistance was typically 2–3 M Ω . Access resistance and cell capacitance were calculated using on-line exponential fits to the capacitance transient induced by a 20-mV depolarization (Membrane Test, pCLAMP software). Cell capacitance averaged 10 picofarads. Access resistance averaged 4.2 M Ω . The cells where the access resistance exceeded 5.5 M Ω were not investigated. Total series resistance was compensated 70%, resulting in a maximal residual voltage error of less than 2 mV. Activation and inactivation kinetics were calculated simultaneously using double exponential fits to current traces using Clampfit (pCLAMP software). Peak currents (I) at each voltage step (V_m) were used to calculate the voltage dependence of activation for each cell using the following equation,

$$I = \frac{G_{\max} \times (V_m - V_{\text{rev}})}{\left(1 + e^{\frac{(V_{0.5} - V_m)}{k}}\right)} \quad (\text{Eq. 1})$$

where V_{rev} is the extrapolated reversal potential, G_{\max} is the maximal conductance, $V_{0.5}$ is the midpoint of activation, and k is the slope of the relationship. The voltage dependence of steady state inactivation was estimated using 15-s prepulses to varying potentials followed by a test pulse to -20 mV to measure channel availability. The current elicited during each test pulse was normalized to that observed when the holding potential was -110 mV (I/I_{\max}), and the data from each cell was fit with the following Boltzmann equation using Prism[®] software (Graphpad, San Diego, CA).

$$h = \frac{I}{I_{\max}} = \frac{1}{\left(1 + e^{\frac{(V_{0.5} - V_m)}{k}}\right)} \quad (\text{Eq. 2})$$

Conductance was also calculated at each test potential because some of the deletion mutants shifted the voltage dependence of activation to more negative potentials where the driving force for Ca^{2+} ions is larger. To allow comparisons of current density, conductance (G) was normalized to cell size (F). All of the results are presented as the means \pm S.E. Significant differences in the average data were analyzed using one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test against WT channels or Bonferonni's multiple comparison test (GraphPad Prism).

Circular Dichroism Spectroscopy—The DNA fragment encoding amino acids 424–528 within the proximal region of the I-II loop of $Ca_v3.2 \alpha 1$ subunit was cloned into the maltose-binding protein (MBP) expression vector pMAL-c2x (New England Biolabs Inc., Beverly, MA). The subcloning was performed downstream of the MBP to express a MBP fusion protein. Afterward, this plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (Stratagene, La Jolla, CA). Positives clones were identified by restriction analysis, and single colonies were grown in Luria-Bertani broth in the presence of 100 μ g/ml ampicillin. When the cell suspension reached an absorbance of 0.4 at 600

The Gating Brake of Ca_v3.2

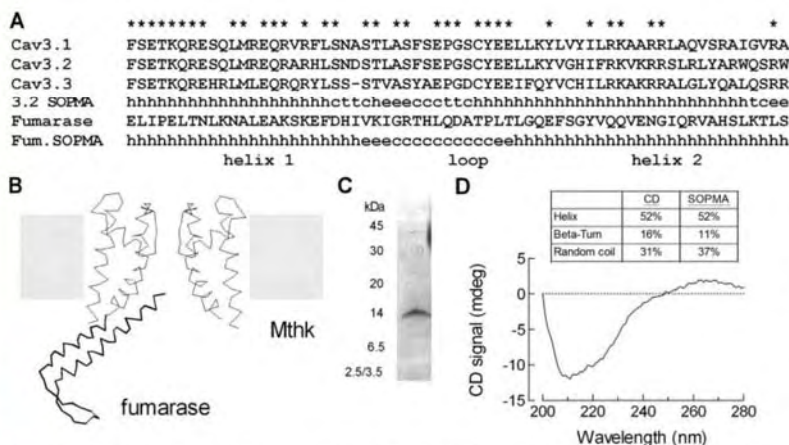


FIGURE 1. Secondary structure of the brake region within the proximal I-II loop of Ca_v3.2 calcium channels. *A*, alignment of the three human Ca_v3 channels. Asterisks highlight the amino acids that are conserved among all three T-channels. The predicted secondary structure of Ca_v3.2 is shown, where *h* stands for α -helix, *c* stands for coil, *e* stands for β -sheet, and *t* stands for turn. Also shown is the amino acid sequence of the region of fumarase that forms a helix-loop-helix structure, as well its predicted secondary structure. *B*, schematic of the initial region of I-II loop made using the crystal structure of fumarase and the potassium channel (*MthK*). The fumarase structure contains five helices packed around a hydrophobic core, and only two of the helices are shown in the schematic. *C*, gel of the purified I-II loop peptide (amino acids 424–528 of Ca_v3.2, GenBank™ accession number AF051946). The protein was purified as a fusion protein with MBP and then cleaved. *D*, CD spectra of the I-II loop peptide. The CD and SOPMA estimations of the dominant organized structures of this intracellular loop are shown in percentages of α -helix, β -turn, and random coil above the CD spectra.

nm, protein expression was induced by the addition of 0.5 mM isopropyl thiogalactoside for 2 h at 37 °C. The cells were harvested, lysed with mild sonication, and centrifuged at 20,000 rpm. The lysate supernatant was loaded onto a amylose affinity column (New England Biolabs, Inc.), and the fusion protein was eluted with 10 mM maltose. After purification, the protein was cleaved from MBP with protease Xa and then purified by fast performance liquid chromatography on a Superdex S200 column. The CD measurements were collected using a freshly dissolved peptide solution (0.05 mg/ml) in the presence of 20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl buffer, pH 7.4, plus 0.17 mM *n*-dodecyl- β -D maltopyranoside. Similar results were obtained in the additional presence of 15% 2,2,2-trifluoroethanol. The CD spectra were obtained with an AVIV model 215 CD spectrophotometer (Aviv Biomedical, Lakewood, NJ). Three scans were recorded at 25 °C (resolution of 1 nm), averaged, and base line-corrected. The CD signals were corrected by subtracting the cuvette plus buffer blank signal.

RESULTS

To date, there is no structural data available on the I-II loop of T-type calcium channels. Therefore, we used secondary structure prediction, CD, homology modeling, and site-directed mutagenesis techniques to obtain insights into the possible structure of the Ca_v3.2 gating brake.

Secondary Structure of the Brake Region—Using SOPMA, a program that predicts secondary structure (19), it was found that the proximal I-II loop might form a helix-loop-helix structure. Predictions showed that the first α -helix (H1) runs from Thr⁴²⁰ to Leu⁴⁴¹ and that the second one (H2) from Cys⁴⁵⁶ to Trp⁴⁸² of Ca_v3.2 channels (Fig. 1). The program also

predicted that 52% of the residues are contained in α -helical structures, 37% are in random coils, and only 11% are in β -turns. Homology modeling using the BioinfoBank MetaServer predicted a similar structure (20) and identified a crystallized protein, fumarase (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank code 1YFM), whose structure contains a helix-loop-helix structure (Fig. 1B). Notably, the SOPMA program correctly predicts the structure of fumarase (Fig. 1A), lending support for a model where the helices are in an anti-parallel orientation, and helix 2 extends back toward the membrane (Fig. 1B).

The presence of α -helical content in this brake region was confirmed by circular dichroism. A peptide corresponding to amino acids 424–528 of the I-II loop of the Ca_v3.2 channel was purified in *E. coli* (Fig. 1C). CD spectra of the peptide displayed a large negative peak between 210 and 230 nm (Fig. 1D), indicating the presence of an α -helical structure. The secondary structure was deduced from the CD signal between 200 and 260 nm using the deconvolution program CDNN. The most prevalent structures in this intracellular segment were α -helix (52%) and coil (31%), whereas β -turn content was less abundant (16%). These results are consistent with the predictions made by the SOPMA algorithm and provided support for the model.

Mapping the Carboxyl Terminus of the Brake—In a previous study we showed that deletions of the proximal I-II loop (amino acids 429–491) affected gating, whereas deletions in the distal loop (amino acids 492–772) only affected surface expression (18). To map precisely the end of the brake region, we constructed a series of deletions that extend proximally from the amino acid 492 border (Fig. 2). The gating properties of these mutant channels were determined using current-voltage (I-V; Fig. 3) and steady state inactivation (*I_∞*) protocols (Fig. 4). Representative traces obtained during the I-V protocol are shown in Fig. 3A. These data were analyzed to find the peak current at each voltage and fit with double exponentials to determine the kinetics of activation and inactivation. The raw peak current data were fit with a form of the Boltzmann equation that also calculates maximal conductance and the apparent reversal potential (see “Experimental Procedures”). In this manner the midpoint of activation (*V_{0.5}*) was calculated from untransformed data for each cell and then averaged (Table 1). To illustrate the shifts in the IV curve, we also normalized the data for each cell to the maximum observed and present the average in Fig. 3B. These results show that deletions D2b (amino acids 466–491) and D2c (amino acids 475–491) had a profound effect on the voltage dependence of activation and kinetics,

	IS6	_____	Helix 1	_____	Loop	_____	Helix 2	_____
Cav3.2	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				
D2b	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
D2c	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
D2d	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
D2e	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
PA61	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
PPG1	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
PA64	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
PPG4	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
PA62	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
PPG2	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
H1A1	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
H1A2	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
H1A3	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
PA6T1	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
PA6T2	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
PA6T12	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
DC1	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA
PA63	FMINLCLVVIATQFSETKQRE	ESQLMREQRARHLSNDSTLASFSEPGSCYEELLKYVGHIFR	KVKRR	SLRLYARWQSRWRKKVDPSA				PSA

FIGURE 2. Location of mutations made in the proximal region of the I-II loop of a human Ca_v3.2 channel. Amino acid sequences of each of the mutants beginning at residue 409 in the middle of the IS6 segment. The **bold underlined** letters in the mutants highlight the amino acids changed, whereas the *periods* represent the amino acids deleted. The residues involved in forming a putative salt bridge are *also underlined* and in *bold type* in the WT sequence.

whereas D2e (amino acids 484–491) had no significant effect. A hallmark of T-channel kinetics is that they accelerate with stronger depolarizations, producing criss-crossing traces during the IV protocol (21). Therefore mutations that shift the voltage dependence of activation should produce a similar shift in the voltage dependence of kinetics, and this was observed with the D2b, D2c, and D2d channels (Fig. 3, *D* and *E*). These mutations also increased the maximum peak current observed (pA/picofarads; results not shown). Because part of this can be explained by the increased driving force where these channels open relative to WT, we calculated the conductance and normalized it to cell size as estimated by capacitance (Fig. 3C). D2b and D2c increased maximal conductance 2-fold (Table 1).

Steady state inactivation was estimated using 15-s prepulses, followed by a test pulse to –20 mV to assess channel availability (Fig. 4A). The largest deletion of this series, D2b, again produced the largest effect, shifting the midpoint of the *h*_∞ curve by –11.2 mV (Fig. 4B and Table 1). In contrast, the other deletions did not have a significant effect on this measure of closed state inactivation. These results indicate that the gating brake terminates around residue 484. As observed with D2d, any deletions proximal to this end have large effects on channel gating. These results also show that the brake plays a bigger role in channel activation than in inactivation from closed states.

Testing the Importance of the Putative α -Helices—The propensity of each amino acid to stabilize or disrupt secondary structure has been studied extensively, and a common finding is that alanine stabilizes α -helices, whereas prolines and glycines disrupt them (22, 23). In a previous study, we used circular dichroism to confirm the predicted changes induced in the structure of a peptide when six consecutive residues of an α -helix are replaced with alanine or proline (15). In this study we replaced the central region of each helix with either six alanines (helix 1, PA61 and PA64; helix 2, PA62) or proline-glycine repeats (helix 1, PPG1 and PPG4; helix 2, PPG2). Unexpectedly, both PA61 and PPG1 mutations shifted the voltage dependence of activation and inactivation to a similar extent (Table 1). As discussed below, three-dimensional modeling indicated that

these mutations disrupted a salt bridge between Glu⁴²⁴ in helix 1 and either Lys⁴⁷⁰ or Arg⁴⁷⁴ in helix 2. Therefore we generated a second set of helix 1 mutants that preserved Glu⁴²⁴ (PA64 and PPG4; see Fig. 2 for location). As predicted, PA64 was very similar to WT, with no shift in the IV curve, a small depolarizing shift in the *h*_∞ curve, and only modest effects on kinetics. In contrast, the PPG4 mutation shifted the IV curve –8 mV and the *h*_∞ curve –4 mV and accelerated activation and inactivation kinetics (Fig. 5 and Table 1). Similarly, the polyalanine substitution in helix 2 (PA62) largely preserved normal gating (small shift in IV curve, no shift in the *h*_∞ curve, and only affected inactivation kinetics), whereas the PPG2 mutation produced dramatic shifts in both the IV and *h*_∞ curves and affected both activation and inactivation kinetics (Table 1).

If the brake region extends from IS6 as a rigid α -helix, then insertions should alter the orientation of the brake with respect to the channel. To test this hypothesis we inserted one (H1A1), two (H1A2), or three (H1A3) consecutive alanines into the putative helix 1 (Fig. 2). The additions were inserted six amino acids distal to IS6, because a previous Ca_v3.2 mutant that deleted these residues was nonfunctional.⁵ All three insertions disrupted channel gating, shifting the IV curve approximately –10 mV; shifting the *h*_∞ curve approximately 6 mV, and significantly accelerated channel kinetics (Fig. 6 and Table 1). Notably the voltage dependence of activation kinetics for all three insertions was shifted to a greater extent than the IV (~–15 mV), whereas the inactivation kinetics of H1A2 showed reduced voltage dependence.

Testing the Importance of the Loop Region—Secondary structure prediction programs suggest that the loop connecting helix 1 to helix 2 may be composed of two hairpin turns separated by β sheet and random coil (Fig. 1). We hypothesized that the loop acts to orient helix 2 back toward the inner mouth of the channel. To test this hypothesis, we performed two types of mutations: one to straighten the turn by replacing it with α -helix

⁵ J. M. Arias, I. Vitko, and E. Perez-Reyes, unpublished observations.

The Gating Brake of $Ca_v3.2$

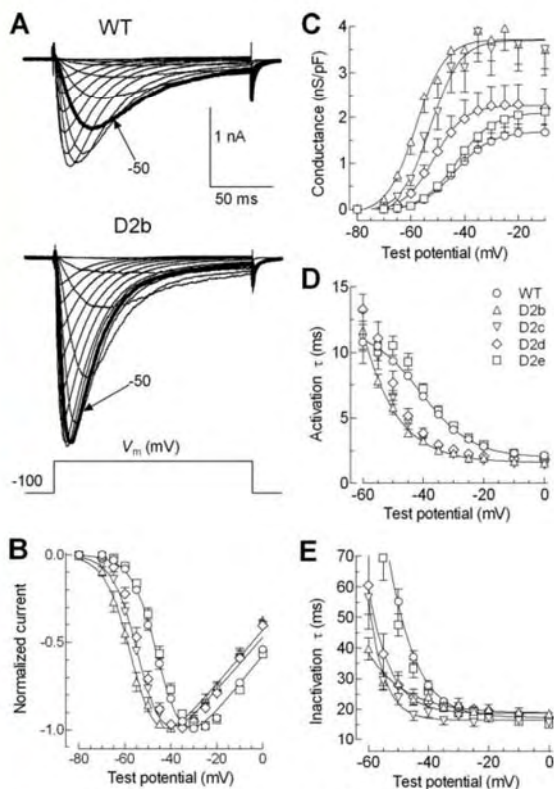


FIGURE 3. Mapping the distal terminus of the brake region. A, representative families of whole cell Ca^{2+} currents recorded from HEK-293 cells expressing WT (upper records) and D2b mutant (bottom records) $Ca_v3.2$ channels. The currents were activated by depolarizing steps from -80 to $+20$ mV from a holding potential of -100 mV. The traces obtained during steps to -50 mV are shown in bold type to emphasize the shift in the position of the I-V curve. The scale bar applies to both families of traces. B, normalized I-V curves for WT and deletion mutants. Smooth curves represent modified Boltzmann (see "Experimental Procedures") fits to the average data. The data in Table 1 show the averages obtained from fits to the raw current data from each individual cell. C, plots of conductance normalized to current densities versus test potential. D and E, voltage dependence of the time constants of activation (D) and inactivation (E) kinetics. Time constants (obtained from two exponential fits of the raw traces) were plotted as a function of membrane potential. The symbols used to represent WT and mutants are given in D.

promoting alanines and another by deleting the entire loop region, effectively fusing helix 1 onto helix 2 (DC1). We initially focused on the second turn (replacing the sequence SEPGSC in PA6T1), because it was conserved across all three Ca_v3 channels. The first turn was also mutated (HLSNDS in PA6T2), and both turns were mutated in PA6T12. In all four turn mutants the midpoints of activation were significantly shifted to more negative potentials relative to WT, especially DC1 and PA6T12 (approximately -14 mV). Also, these mutations caused large negative shifts in the midpoints of steady state of inactivation (Fig. 7B), with the mutant PA6T12 displaying the largest shift (-10.8 mV). As observed with the alanine insertion mutants, activation and inactivation kinetics were accelerated at all test potentials (Fig. 7, C and D, and Table 1). Notably, kinetics were faster in the voltage independent range, indicating that these

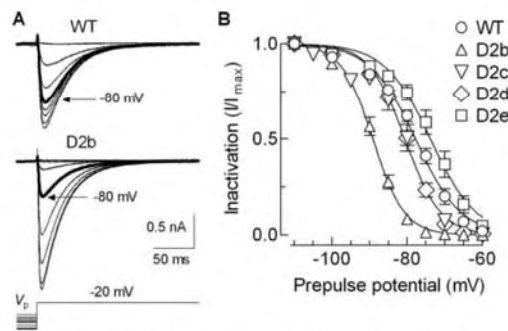


FIGURE 4. Effects of helix 2 deletions on steady state inactivation. A, examples of Ca^{2+} currents recorded at -20 mV after 15-s prepulses to increasing values of voltages between -110 and -40 mV in HEK-293 cells expressing WT (upper records) and D2b mutant (bottom records) $Ca_v3.2$ channels. B, steady state inactivation curves. Maximal current (I_{max}) during the test pulse was obtained when the prepulse potential was -110 mV. Channel availability was calculated by dividing the remaining current (I) at -20 mV by I_{max} and expressed as a function of the prepulse potential. The smooth curves represent Boltzmann fits to the average data. The results from the averages of individual fits to each cell are reported in Table 1.

changes were due to genuine changes in gating and not simply due to voltage-dependent shifts in activation gating.

Three-dimensional Model of the Brake—Taken together, the results shown thus far demonstrate how critical the structure of the brake region is to channel gating and provide support for the hypothesis that this region may form a helix-loop-helix structure. To gain insight into the effects of the mutations, we generated several *de novo* three-dimensional models (the supplemental information includes a Protein Data Bank file of the entire 103-amino acid region modeled). We also modeled all 18 of the individual mutants. The model of the WT sequence shows a small kink immediately distal to IS6, followed by a helix-loop-helix structure. The model also suggests the presence of a salt bridge between Glu⁴²⁴ in helix 1 and either Lys⁴⁷⁰ or Arg⁴⁷⁴ in helix 2. Disruption of this salt bridge may explain why PA61 affected activity more than expected. To test this prediction we made two additional mutants in helix 1 (PA64, PPG4, discussed above) and PA63, which neutralizes the positively charged residues in helix 2 (RKVKRR; Fig. 2). The voltage dependence of activation and inactivation of PA63 channels were shifted from WT to the same degree as PA61, whereas their kinetics were the fastest of any mutant (Table 1). Clearly, charged residues in helix 1 and helix 2 play critical roles in the function of the gating brake.

DISCUSSION

The goal of this study was to explore the structure-function relationships of the T-type calcium channel $Ca_v3.2$, focusing on the intracellular loop connecting repeats I-II. This loop is particularly interesting because 7 of the 12 mutations found in childhood absence epilepsy patients are localized to it (16). In previous studies, we have shown that these I-II loop mutations are capable of affecting both the gating and surface expression of $Ca_v3.2$ channels, thereby providing a plausible explanation for their role in epilepsy (17, 18). These studies also showed that deletions in the proximal I-II loop controlled gating, whereas deletions of the distal loop had no effect on gating but led to

TABLE 1
Electrophysiological properties of the I-II loop mutants

Statistical significance was determined using either one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test against WT or Student's *t* test. The G_{max} , V_{50} of activation, and kinetic parameters were all determined from the I-V protocol and therefore have the same number of cells in each measurement.

	Density (G_{max})	Activation			Inactivation			Kinetics at 0 mV	
		n	V_{50}	k	n	V_{50}	k	τ activation	τ inactivation
			mV	mV	mV	mV	ms	ms	
WT	1.7 ± 0.2	-42.7 ± 0.7	6.0 ± 0.1	16	-77.7 ± 0.8	-5.7 ± 0.2	12	2.1 ± 0.2	17.3 ± 0.7
D2b	3.8 ± 0.5 ^a	-56.8 ± 1.1 ^a	5.3 ± 0.2 ^a	14	-89.2 ± 0.8 ^a	-4.0 ± 0.2 ^a	7	1.6 ± 0.1 ^a	18.5 ± 1.2
D2c	3.4 ± 0.6 ^a	-51.8 ± 0.8 ^a	5.6 ± 0.2	13	-80.6 ± 1.4	-4.6 ± 0.3 ^a	9	1.3 ± 0.1 ^a	14.7 ± 1.0 ^b
D2d	2.3 ± 0.5	-50.6 ± 0.4 ^a	5.3 ± 0.3	5	-80.6 ± 0.7	-4.7 ± 0.1 ^b	4	1.8 ± 0.1	17.3 ± 0.7
D2e	2.1 ± 0.3	-43.4 ± 1.6	5.8 ± 0.2	14	-73.6 ± 1.4	-5.4 ± 0.2	8	2.1 ± 0.1	15.0 ± 0.6 ^b
PA61	3.1 ± 0.3 ^b	-52.9 ± 0.9 ^a	6.2 ± 0.2	12	-82.5 ± 1.2 ^b	-4.1 ± 0.1 ^a	8	1.7 ± 0.2 ^b	17.2 ± 0.9
PPG1	1.9 ± 0.4	-50.4 ± 0.7 ^a	5.9 ± 0.2	6	-82.7 ± 1.3 ^b	-4.9 ± 0.5 ^b	6	2.0 ± 0.2	19.8 ± 0.7 ^b
PA64	2.2 ± 0.3	-44.6 ± 0.7	6.4 ± 0.2 ^a	9	-73.5 ± 1.0 ^b	-5.8 ± 0.3	6	1.3 ± 0.1 ^a	15.2 ± 0.9
PPG4	2.0 ± 0.2	-50.7 ± 1.1 ^a	6.0 ± 0.3	6	-81.3 ± 0.6 ^b	-5.2 ± 0.2	4	0.9 ± 0.1 ^a	12.3 ± 1.6 ^a
PA62	2.6 ± 0.2 ^b	-50.5 ± 0.9 ^a	5.5 ± 0.1	12	-80.4 ± 0.8	-5.0 ± 0.1	8	1.8 ± 0.2	14.7 ± 0.6 ^b
PPG2	2.4 ± 0.5	-55.5 ± 0.4 ^a	5.9 ± 0.1	7	-86.1 ± 0.9 ^a	-4.1 ± 0.1 ^a	6	1.4 ± 0.1 ^a	18.5 ± 0.6
H1A1	2.6 ± 0.3 ^b	-51.1 ± 1.2 ^a	5.8 ± 0.2	18	-82.3 ± 1.6 ^a	-4.6 ± 0.2 ^a	17	1.5 ± 0.1 ^a	14.2 ± 0.8 ^b
H1A2	2.1 ± 0.4	-54.5 ± 1.2 ^a	5.7 ± 0.4	6	-86.2 ± 0.7 ^a	-3.9 ± 0.1 ^a	6	1.5 ± 0.2 ^b	19.2 ± 2.5 ^a
H1A3	3.2 ± 0.3 ^a	-53.9 ± 1.2 ^a	5.6 ± 0.2	16	-84.0 ± 0.8 ^a	-4.4 ± 0.2 ^a	16	1.4 ± 0.1 ^a	14.3 ± 0.8 ^a
PA6T1	2.7 ± 0.4 ^b	-52.9 ± 1.0 ^a	5.6 ± 0.2	12	-84.4 ± 1.1 ^a	-4.3 ± 0.1 ^a	9	1.2 ± 0.1 ^a	13.5 ± 0.5 ^a
PA6T2	2.8 ± 0.5 ^b	-50.9 ± 0.7 ^a	5.3 ± 0.2 ^a	14	-81.0 ± 0.9	-4.7 ± 0.2 ^b	9	1.4 ± 0.1 ^a	13.1 ± 0.5 ^a
PA6T12	2.1 ± 0.5	-55.0 ± 1.2 ^a	5.7 ± 0.2	10	-88.8 ± 2.1 ^a	-4.2 ± 0.1 ^a	7	1.2 ± 0.1 ^a	11.7 ± 0.5 ^a
DC1	2.3 ± 0.3 ^a	-57.3 ± 0.9 ^a	5.5 ± 0.2	10	-85.6 ± 1.0 ^a	-4.2 ± 0.1 ^a	6	1.3 ± 0.1 ^a	13.9 ± 0.3 ^a
PA63	2.6 ± 0.5 ^b	-52.7 ± 1.1 ^a	5.3 ± 0.4	7	-82.8 ± 1.6 ^b	-3.8 ± 0.1 ^a	4	1.1 ± 0.1 ^a	11.6 ± 0.3 ^a

^a Statistical significance when using analysis of variance.

^b Statistical significance when using *t* test.

enhanced surface expression of the channel. The present study was focused on the proximal I-II loop, which because of its ability to shift the voltage dependence of activation and accelerate kinetics we call a gating brake. The hypothesis being tested in this study is that the gating brake is formed by a helix-loop-helix structure.

The Proximal Region of the I-II Loop Has a High Content of α -Helix—The BioInfoBank Meta server goes beyond structure prediction and identifies proteins of known structure that are likely to be similar to the query sequence (20). This three-dimensional jury analysis of the proximal Ca_v3.2 I-II loop led to the prediction that the proximal I-II loop would form a helix-loop-helix structure similar to that found in fumarate (Fig. 1B). As a first test of this prediction, we purified a fragment of the I-II loop from *E. coli* and studied its structure using circular dichroism, a versatile tool for examining protein structure (24). The circular dichroism spectrum indicated that the proximal I-II loop contains a high α -helical content, just as predicted. Although insufficient amounts of purified protein were obtained for NMR analysis, these results establish that the proximal loop has a high helical content and provide experimental support for the structure predictions.

Mutations Made to Test the Helix-Loop-Helix Model—Four types of mutations were used to test the model. First, we used deletion analysis to find the distal end of the gating brake. Second, we tested for the existence of α -helical regions by replacing six consecutive amino acids with prolines and glycines to disrupt the helix, and as a control we replaced the same residues with alanine to conserve the helix. Third, we tested for the existence of the loop by either converting it to an α -helix or by deleting it entirely, effectively fusing helix 1 to helix 2. Finally, we also tested whether the addition of alanines to the middle of helix 1 would alter the pitch of the helix and thereby alter the orientation of the helix-loop-helix with respect to the channel.

In a previous study we found that deletion of helix 1 (D1) produced a similar effect on gating as deleting helix 2 (D2) and that deletions made beyond residue 491 did not alter gating (18). To map the distal border we constructed a series of smaller deletions, anchoring the distal end at residue 491. Deletion of 24 amino acids from helix 2 (D2b) produced a profound shift in the voltage dependence of both activation and inactivation and accelerated kinetics. Similar effects were noted in the previous study with D1, D2, and D1-3 (18), indicating that the D2b deletion maximally disrupted the function of the gating brake. Moving the proximal border an additional seven amino acids (D2c) had a more modest effect on the IV, and no significant effect on the h_{∞} curve. Interestingly, both activation and inactivation kinetics of D2c were accelerated relative to WT channels. In general, mutations that shifted activation kinetics also shifted the voltage dependence of activation, but this was not always the case for inactivation, because some mutations affected apparent open state kinetics with little or no effect on the voltage dependence of inactivation. Moving the proximal border eight more residues (D2e) resulted in channels that gated normally. Taken together these results indicate that the seven extra residues deleted in D2b (FRKVKRRR) play an important role in the function of the brake. Therefore, we tested the effect of either deleting these residues (D2d) or converting them to alanines (PA63). The PA63 mutation caused a dramatic disruption of channel gating, shifting the voltage dependence of activation and inactivation, and accelerating kinetics. In contrast, the D2d mutation had a smaller effect on channel gating, shifting the IV curve, but having no effect on the midpoint of the h_{∞} curve or on channel kinetics. A possible explanation is that Arg⁴⁷⁷ and/or Arg⁴⁸¹ functionally replaced Lys⁴⁷⁰ and/or Arg⁴⁷⁴, thereby restoring the putative salt bridge. We conclude that the gating brake ends just after this highly charged region and that this region plays a critical role in its function.

The Gating Brake of Ca_v3.2

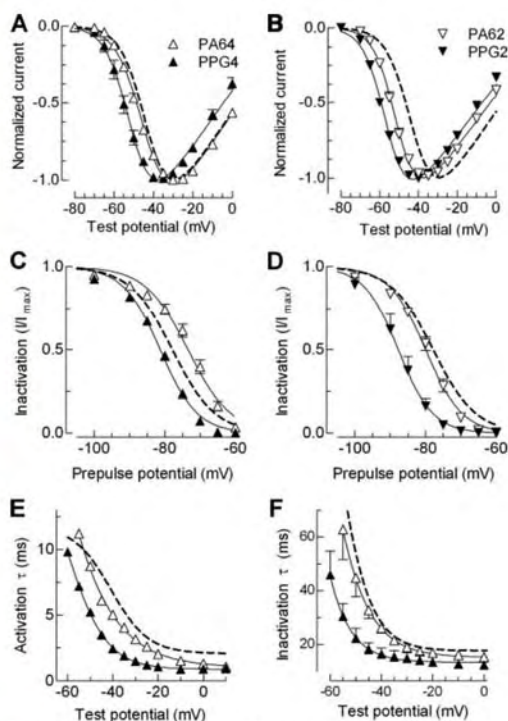


FIGURE 5. Biophysical properties of mutants to probe the helical structure of putative helices 1 and 2. *A* and *B*, normalized I-V curves for PA and PPG mutations made in helix 1 (*A*) and helix 2 (*B*). Labeling of symbols in these panels applies to the entire figure. *C* and *D*, effect of these mutations on steady state inactivation. The data points were obtained by plotting the normalized peak Ca²⁺ current at -20 mV against the prepulse potential for the indicated mutants. The smooth curves represent Boltzmann fits to the average data. The results from the average of individual fits to each cell are reported in Table 1. *E* and *F*, voltage dependence of the time constants of activation (*E*) and inactivation kinetics (*F*) of the helix 1 mutants PA64 and PPG4. Time constants were obtained from two exponential fits of the raw traces and plotted against membrane potential. WT channel properties are represented with a dotted line.

The Effect of Mutations in the α -Helical Regions—The guiding hypothesis for these studies was that replacement of six consecutive residues of an α -helix with residues such as proline and glycine would destabilize the helices and disrupt the function of the gating brake, whereas replacement with residues such as alanine would preserve structure and function (22, 23). We targeted the central portion of the putative helix and replaced six residues with either a PPG repeat or alanines (PA6). As predicted, the PPG substitutions caused large shifts in the voltage dependence of activation and inactivation and accelerated kinetics. The largest effects were observed with the helix 2 mutations. Surprisingly, the alanine substitutions also disrupted gating. The structural model of these mutants provides a possible explanation for these effects; replacement of charged residues with alanines in helix 1 eliminated an important salt bridge between helix 1 and 2. In addition to being conserved across all three mammalian Ca_v3 channels, the residues involved in this putative salt bridge are also conserved in the *Drosophila* homolog (GenBank™ accession number

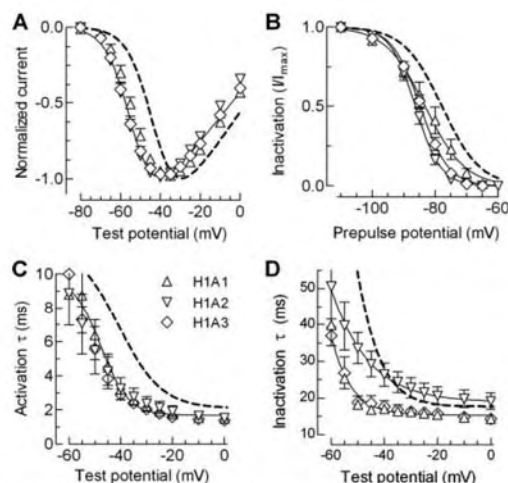


FIGURE 6. Biophysical properties of alanine insertion mutants designed to probe the orientation of the brake region. *A*, normalized I-V curves for H1A1, H1A2, and H1A3 channels. *B*, effects of alanine insertions on steady state inactivation. The data points were obtained by plotting the normalized peak Ca²⁺ current at -20 mV against the prepulse potential for the indicated mutants. The smooth curves represent Boltzmann fits to the average data. The results from the average of individual fits to each cell are reported in Table 1. *C* and *D*, voltage dependence of the time constants of activation and inactivation. Time constants were obtained from two exponential fits of the raw traces and plotted against membrane potential. The smooth curves represent Boltzmann fits to the data. WT channel properties are represented with a dotted line.

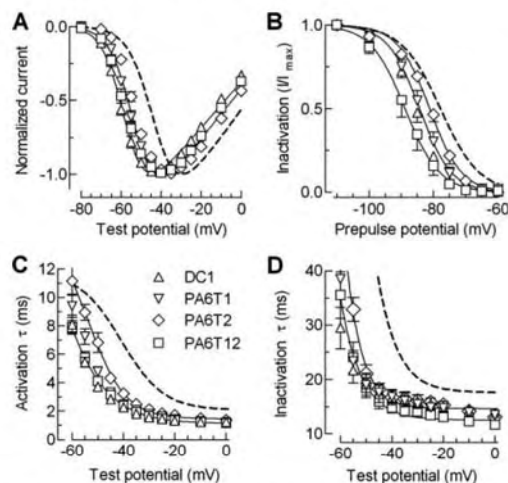


FIGURE 7. Biophysical properties of the mutations made to disrupt the putative loop of the brake region. *A*, normalized IV plots for the DC1, PA6T1, PA6T2, and PA6T12 mutants. *B*, effects of these mutations on steady state inactivation. The data points were obtained by plotting the normalized peak Ca²⁺ current at -20 mV against the prepulse potential for the indicated mutants. The smooth curves represent Boltzmann fits to the average data. The results from the average of individual fits to each cell are reported in Table 1. *C* and *D*, voltage dependence of the time constants of activation (*C*) and inactivation (*D*) kinetics. Time constants were obtained from two exponential fits of the raw traces and plotted against membrane potential.

NP_572296). Moving the helix 1 mutations two amino acids down confirmed these predictions, because now the alanine mutation had little or no effect, whereas the poly-proline-gly-

cine continued to disrupt function (PA64 and PPG4, respectively).

The Effect of Mutations in the Loop Regions—Our studies of the loop region were complicated by the presence of two putative hairpin turns, because only one turn would be required to orient helix 2 in an antiparallel manner with respect to helix 1. Indeed, replacement of either turn region with six alanines produced channels with only modest effects on gating. In contrast, mutation of both turn regions (PA6T12) or deletion of the entire loop region (DC1) produced dramatic shifts in gating. The modeling studies agree well with the experimental findings; replacement of either turn was insufficient to disrupt the helix-loop-helix structure because of compensation by the remaining turn. Modeling of the PA6T12 mutant suggested that helix 1 would be more extended and that loss of Asp⁴⁴⁴ and Glu⁴⁵² creates a more hydrophobic region, thereby allowing closer contact between the helices. Modeling of DC1 indicates that the loop was effectively removed and that helix 1 was fused to helix 2. The gating phenotype of this mutant is similar to the D2 mutant, which lacks helix 2; therefore we infer that function of the gating brake was totally disrupted. The model also predicts that the epilepsy mutation, C456S, is at a critical location in the brake, forming the start of helix 2, and projecting toward helix 1. An alternative hypothesis is that the α -helices are not in an anti-parallel orientation (as in transcription factors) and that the charged residues form contacts with parts of the channel outside of the brake region. In either case, the results show that the loop region is critical for the function of the brake and that disruption of its structure leads to functional effects on channel gating.

Insertion of Alanines into Helix 1 Also Disrupts Function of the Brake—A second test of the α -helical structure of the helix 1 region was to insert one, two, or three alanines into the middle of the region. Our hypothesis was that each alanine would change the orientation of the remainder of the helix by 100° and extend the helix 1.5 Å. As predicted, these insertions produced dramatic shifts in the voltage dependence of activation and inactivation and accelerated kinetics. The gating properties of H1A1, H1A2, and H1A3 were all significantly different from WT channels but not different from each other with the exception of inactivation, where H1A2 channels inactivated more slowly. These results support the hypothesis that the brake region is precisely oriented with respect to the channel.

Disruption of the Brake Also Leads to Increases in Current Density—Almost all of the mutations displayed larger peak currents than wild type channels, even when corrected for cell size, as estimated by cell capacitance (pA/picofarads). However, most of this increase could be accounted for by the greater driving force for Ca²⁺ ions because peak currents in the mutants were recorded at more negative potentials and hence further away from the reversal potential. To account for this shift, we calculated the chord conductance, and again normalized to cell size, and report the maximal observed conductance (G_{max} ; nS/picofarads). Even after this correction, D2b, D2c, H1A3, and DC1 all showed a significant doubling of current density. Two likely explanations for this increase are that these mutations lead to increases in the probability of channel opening (P_o) and/or increases in the surface expression of chan-

nels. In our previous study we found evidence for both; deletion of helix 1 led to increased current density with no change in surface expression, implicating changes in P_o , whereas deletion of helix 2 led to both higher surface expression and current density (18). Additional studies are required to elucidate the mechanisms controlling trafficking of Ca_v3.2 channels, but clearly the I-II loop is involved in this process.

In summary, our results show that the brake is contained within the first 60 amino acids of the I-II loop of Ca_v3.2 channels, and that the structural integrity of this region is critical for the normal low voltage activation of this T-type channel. Any disruption of this structure leads to channels that open at more negative potentials, inactivate at more negative potentials, and show faster kinetics. As noted previously, inactivation of T-channels is coupled to activation (25), and this may explain the concomitant shifts in steady state activation and inactivation observed in this study. Our results indicate that the normal function of this region is as a brake that prevents channel opening after small depolarizations. Previous measurements of T-channel gating currents indicate that 80% of the channels open after only 20% of total charge movement (8, 26). This suggests that T-channels open after minimal movement of their voltage sensors, and modeling studies suggest that this might explain why T-channel kinetics are so voltage-dependent (8, 25, 27). We suggest that the brake region stabilizes the closed state, adopting the role of one of the S4-S5 linkers to keep the pore closed at resting membrane potentials. Disruption of the brake allows channels to open at more negative membrane potentials and open faster. Finally, helix 2 of the brake region is much less conserved among Ca_v3 channels than helix 1, suggesting interesting differences in the role of the brake in setting the low voltage gating activation of T-type channels.

REFERENCES

- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P., and Striessnig, J. (2005) *Pharmacol. Rev.* **57**, 411–425
- Bean, B. P. (1989) *Annu. Rev. Physiol.* **51**, 367–384
- Matteson, D. R., and Armstrong, C. M. (1986) *J. Gen. Physiol.* **87**, 161–182
- Carbone, E., and Lux, H. D. (1984) *Nature* **310**, 501–502
- Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1990) *Nature* **345**, 672
- Cataldi, M., Perez-Reyes, E., and Tsien, R. W. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 45969–45976
- Talavera, K., Janssens, A., Klugbauer, N., Droogmans, G., and Nilius, B. (2003) *J. Gen. Physiol.* **121**, 529–540
- Lam, A. D., Chikina, M. D., McNulty, M. M., Glaaser, I. W., and Hanck, D. A. (2005) *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* **451**, 349–361
- Long, S. B., Campbell, E. B., and Mackinnon, R. (2005) *Science* **309**, 897–903
- Yarov-Yarovoy, V., Baker, D., and Catterall, W. A. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7292–7297
- Long, S. B., Campbell, E. B., and Mackinnon, R. (2005) *Science* **309**, 903–908
- Tombola, F., Pathak, M. M., and Isacoff, E. Y. (2006) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 23–52
- Marksteiner, R., Schurr, P., Berjukow, S., Margreiter, E., Perez-Reyes, E., and Hering, S. (2001) *J. Physiol. (Lond.)* **537**, 27–34
- Splawski, I., Timothy, K. W., Sharpe, L. M., Decher, N., Kumar, P., Bloise, R., Napolitano, C., Schwartz, P. J., Joseph, R. M., Condouris, K., Tager-Flusberg, H., Priori, S. G., Sanguinetti, M. C., and Keating, M. T. (2004) *Cell* **119**, 19–31
- Arias, J. M., Murbartián, J., Vitko, I., Lee, J. H., and Perez-Reyes, E. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 3907–3912



The Gating Brake of Ca_v3.2

16. Chen, Y. C., Lu, J. J., Pan, H., Zhang, Y. H., Wu, H. S., Xu, K. M., Liu, X. Y., Jiang, Y. W., Bao, X. H., Yao, Z. J., Ding, K. Y., Lo, W. H. Y., Qiang, B. Q., Chan, P., Shen, Y., and Wu, X. R. (2003) *Ann. Neurol.* **54**, 239–243
17. Vitko, I., Chen, Y., Arias, J. M., Shen, Y., Wu, X. R., and Perez-Reyes, E. (2005) *J. Neurosci.* **25**, 4844–4855
18. Vitko, I., Bidaud, I., Arias, J. M., Mezghrani, A., Lory, P., and Perez-Reyes, E. (2007) *J. Neurosci.* **27**, 322–330
19. Geourjon, C., and Deleage, G. (1995) *Comput. Appl. Biosci.* **11**, 681–684
20. Ginalski, K., Elofsson, A., Fischer, D., and Rychlewski, L. (2003) *Bioinformatics* **19**, 1015–1018
21. Randall, A. D., and Tsien, R. W. (1997) *Neuropharmacol.* **36**, 879–893
22. MacArthur, M. W., and Thornton, J. M. (1991) *J. Mol. Biol.* **218**, 397–412
23. O'Neil, K. T., and DeGrado, W. F. (1990) *Science* **250**, 646–651
24. Kelly, S. M., and Price, N. C. (2000) *Curr. Prot. Pept. Sci.* **1**, 349–384
25. Talavera, K., and Nilius, B. (2006) *Pfluegers Arch. Eur. J. Physiol.* **453**, 189–201
26. Lacinova, L., Klugbauer, N., and Hofmann, F. (2002) *FEBS Lett.* **531**, 235–240
27. Frazier, C. J., Serrano, J. R., George, E. G., Yu, X., Viswanathan, A., Perez-Reyes, E., and Jones, S. W. (2001) *J. Gen. Physiol.* **118**, 457–470

