



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

**CLONACIÓN DEL EXTREMO 3' DE LA
SUBUNIDAD α_1 DEL CANAL DE Ca^{2+}
DEPENDIENTE DEL VOLTAJE $\text{Ca}_v2.1$
DE LA TORTUGA *Trachemys scripta
elegans*.**

Tesis

Que para obtener el Título de

BIÓLOGA

Presenta:

Itzel Scarlett Moreno Ramírez.



Director: Dr. Juan Manuel Arias Montaño.

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México. 2016



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

Dr. Santiago Martínez Calvillo

VOCAL

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

SECRETARIO

Dr. Juan Manuel Arias Montaña

SUPLENTE

Dr. Jaime Aurelio Barral Caballero

SUPLENTE

Dr. José Alejandro Sandoval Romero

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, CB-2009-01-131778) y el financiamiento de Programas de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN216215) al Dr. Juan Manuel Arias Montaña.

El trabajo experimental se realizó en los Laboratorios de Electrofisiología del Proyecto de Neurociencias, en la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

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

Dr. Juan Manuel Arias Montaña

Proyecto de Neurociencias, UIICSE, FES Iztacala -UNAM

Agradecimientos

A la UNAM

Por abrirme las puertas a tantas experiencias y conocimientos.

Al Dr. Manuel

Gracias profè por todo el apoyo brindando a lo largo de este proyecto, por todo el conocimiento que me proporciono día con día, por su confianza, dedicación, asesoramiento, por brindarme su experiencia y apoyo para llegar a la culminación de este trabajo que es una meta muy deseada.

Al Dr. Jorge, Dr. Santiago, Dr. Jaime y el Dr. Alejandro

Por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis y sus atinadas observaciones.

Al financiamiento otorgado

Programas de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN216215)

A Itzel y Viry

Por todos los buenos momentos que pasamos juntas y los malos también ya que nos hizo unirnos más, las experiencias que compartimos y el apoyo que me brindaron a lo largo de toda esta experiencia, por sus sabios consejos y por siempre escucharme y aunque no sé por cuales camino nos lleve la vida espero que sigan en mi vida, las quiero.

A mis compañeros de la carrera y en especial

Ángeles, Beto, Charly, Alesita, Cin, Chris y Nat. Gracias por todos los momentos vividos, por todas las experiencias que me dejan que son bastantes.

A mis compañeros de laboratorio

Karen

Me alegro tanto que la vida hiciera que nos conociéramos ya que en verdad te considero una muy buena amiga, gracias por acompañarme en esta última etapa de la carrera ya que contigo el lab nunca fue aburrido, por el

aprendizaje y las experiencias que hemos pasado y por darme ánimos cuando no me salía y presionarme para acabar las cosas. Te quiero.

A Raúl, la maestra Clara, Nayely. Por su compañerismo y apoyo.

A Israel

Bueno que puedo decir de ti, dicen que si una amistad dura más de siete años, esta será para toda la vida y bueno ya llevamos más de eso así que gracias por todos estos años ya de amistad que en verdad espero sea larga y lleguemos a viejitos, por estar siempre para mí aunque luego ni yo me aguante o entienda como te caigo bien, por esa amistad tan sincera y en general por todo, Te quiero.

Dedicatorias

A mis padres:

Por darme la vida y haberme dado tan valiosa herencia mis estudios. Este triunfo es de ustedes.

Papá

Por siempre estar ahí para nosotras, por dedicar todos tus años, sin tener reparo alguno en sacarnos adelante, por hacer todo lo que estuvo a tu alcance para brindarme educación y cariño. Gracias por las cosas que me enseñaste, por inculcarnos el estudio y la disciplina, ya que gracias a tu ejemplo hemos llegado a donde estamos. Te amo papá

Mamá

Por siempre estarnos apurando a hacer las cosas aunque nos dé flojera, por darnos tanto amor día a día y por siempre apoyarnos aunque no nos portemos tan bien, por escucharme y aconsejarme, por hacer todo lo que está en tus manos por ayudarnos. Por todos los cuidados y las fuerzas para seguir adelante para no rendirnos. Te amo mamá

A mi hermana

Diana

Por siempre escucharme, por darme apoyo día a día y nunca dejarme caer, por siempre estar a mi lado en las buenas y en las malas aunque luego te caiga mal y sea de lo peor y te trate mal, gracias por confiar en mí y bueno agradezco a la vida por haberme dado una hermana con tú. Te quiero mucho

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Canales iónicos	1
1.1. Mecanismos de activación	2
1.2. Canales dependientes de voltaje.....	6
2. Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje.....	8
2.1 Nomenclatura de los canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje.....	8
2.2 Estructura de los canales Ca ²⁺ de dependientes de voltaje.....	9
2.3 Clasificación de los canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje.....	11
3. Estructura de la subunidad α_1 de los canales de Ca ²⁺ tipo P/Q.....	15
3.1 Topología transmembranal de la subunidad α_1 de los Canales de Ca ²⁺ tipo P/Q.....	15
4. Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje ca _v 2 en cordados.....	17
4.1. Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje en las tortugas.....	19
5. Canalopatías asociadas a los canales tipo P/Q.....	21
II. ANTECEDENTES.....	22
III. HIPÓTESIS.....	26
IV. OBJETIVOS.....	26
1. General.....	26
2. Específicos.....	26
V. MÉTODOS.....	27
1. Extracción de ARN total del cerebro.	27
2. Diseño de oligonucleótidos específicos.....	27

3. Transcripción reversa acoplada a la amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa.....	29
4. Electroforesis en gel de agarosa.	31
5. Purificación del fragmento amplificado del ADNc de tortuga.....	31
6. Ligación del fragmento amplificado del ADNc de tortuga y el vector pJet 1.2.....	32
7. Transformación de bacterias competentes.....	32
8. Purificación del ADN plasmídico.....	33
9. Análisis de restricción.....	34
10. Secuenciación y análisis de los fragmentos seleccionados.....	34
VI. RESULTADOS	35
1. Verificación del ADNc de la RT-PCR.....	35
2. Clonación de los extremos 3' de los CCDV de la tortuga por RACE.....	36
3. Clonación del segmento cacnf4-cacnr2 de las subunidades α_1 de los CCDV Ca_v2 de la tortuga, como estrategia alternativa para obtener más información de sus secuencias.	38
4. Caracterización por análisis de restricción de los fragmentos amplificados cacnf4-cacnr2.	39
5. Amplificación del extremo 3' con los oligonucleótidos específicos Tse_A1x_f3...42	42
VII. DISCUSIÓN	51
1. Dominios de unión al COOH terminal en los canales de Ca^{2+} tipo P/Q: Calmodulina y CaMKII.....	52
2. Cambios en la activación e inactivación de los canales de Ca^{2+} por <i>splicing</i> alternativo en el extremo COOH terminal.....	55
VIII. CONCLUSIÓN	58
IX. REFERENCIAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca ²⁺]	Concentración de Ca ²⁺
ω -CgTx	ω -conotoxina GVIA
ABP	Dominio de la hendidura de unión de β
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AID	Dominio de interacción α
AMPA	<i>Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalepropiónico</i>
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CaM	Calmodulina
CaMWT	Calmodulina tipo nativa
CaMKII	Proteína cinasa de calcio calmodulina II
CaBP	Proteína homóloga de la CaM
CCAT	Fragmento resultante del procesamiento proteolítico del COOH terminal
CCDV	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje
CBD	Dominio de unión a la calmodulina
COOH	Dominio carboxilo terminal
DHP	Dihidropiridinas
FDC	Facilitación dependiente de Ca ²⁺
HUGO	Organización del Genoma Humano
HVA	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje de alto umbral de activación
IDC	Inactivación dependiente de Ca ²⁺
IDV	Inactivación dependiente de voltaje

IBa ²⁺	Corrientes de bario
Kv	Canales de K ⁺ dependientes de voltaje
LVA	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje de bajo umbral de activación
mGluR1	Receptores metabotrópicos de glutamato
nAChR	Receptores nicotínicos de acetilcolina
Nav	Canales de Na ⁺ dependientes de voltaje
NH ₂	Dominio amino terminal
NMDA	<i>N-metil-D-aspartato</i>
P2X	Receptores purinérgicos activados por ATP
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RACE	Amplificación rápida de los extremos de ADNc
RE	Retículo endoplásmico
Synprint	Sitio de interacción con proteínas sinápticas
SNC	Sistema Nervioso Central
V _{50act}	Potencial de activación media

RESUMEN

La clonación de la subunidad α_1 de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje ha permitido identificar por lo menos 10 genes; en base a la similitud de sus secuencias se dividen en 3 familias: Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 . En el caso de la familia Ca_v2 está compuesta por las isoformas P/Q, N y R. En general, existen diferencias funcionales entre los miembros de las subfamilias de los canales de Ca^{2+} debido, en gran parte a la variabilidad estructural en los interdominios. Entre los dominios que se ha reportado a lo largo de la subunidad α_1 en los Ca_v2 se encuentran: el dominio AID, sitio de interacción con las subunidades $\text{G}\beta\gamma$ y el de interacción con proteínas sinápticas (synprint), el dominio CDB y el PDZ. Su función principal es la liberación de neurotransmisores, por lo que se expresa preponderante en el sistema nervioso de los cordados. Un grupo de cordados en los que se ha venido incrementado su uso como modelo de estudio en el sistema nervioso, es el caso de las tortugas, especialmente *Trachemys scripta elegans*, por su alta resistencia a la anoxia. La estructura del sistema nervioso de las tortugas, aunque en términos generales es similar al de los mamíferos, muestra diferencias tanto macroscópicas como microscópicas, como se pudo observar en el análisis de la regulación de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis córtico-estriatal, en el que los canales involucrados son los tipo P/Q y N. Sin embargo, a diferencia de la rata, en la tortuga el canal modulado por la acción del baclofen es el canal tipo N en lugar del tipo P/Q. Estos datos no pueden ser comprobados debido a la falta de secuencias codificantes de estos canales en la tortuga. Por lo tanto, el objetivo del este presente estudio fue clonar el extremo 3' terminal del canal de calcio dependiente de voltaje tipo P/Q (α_{1A}) a partir del cerebro de la tortuga *T. scripta elegans*. Los amplificadores de los extremos 3' terminales se realizaron para las isoformas P/Q, N y R con la técnica de amplificación rápida de los extremos de ADNc (RACE). Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos en secuencias consenso de clonas parciales obtenidas anteriormente. Los amplificadores se clonaron en bacterias *Echerichia coli*, se analizaron por enzimas de restricción y posteriormente se mandaron a secuenciar. De las tres isoformas sólo se pudo clonar el extremo 3' terminal para el canal tipo P/Q, obteniendo sólo 37 aa de los ~690 aa que componen el COOH terminal en esta isoforma. Al realizar un análisis por BLAST se encontró que coincidía en un 99% con el transcriptoma del embrión de *T. scripta*, por lo que puede ser explicado como una variedad predominante de *splicing*

alternativo de la isoforma P/Q. El resultado de presentar un COOH terminal tan corto sería la pérdida de varios dominios de regulación importante para este canal. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo la clonación completa de la subunidad α_1 de esta isoforma, para que así, realizar estudios que permitan identificar si este canal presenta cambios electrofisiológicos y/o funcionales.

I. INTRODUCCIÓN

1. CANALES IÓNICOS

Las células están siempre limitadas de su medio circundante por una membrana superficial, llamada membrana plasmática. Unas de las propiedades más sobresalientes de las membranas es su capacidad para actuar como barreras de permeabilidad selectiva y controlar la cantidad de sustancias que la atraviesan. La permeabilidad de la membrana varía ampliamente, y por su naturaleza hidrofóbica no son permeables a moléculas polares como los azúcares, los aminoácidos o las partículas cargadas como los iones, por lo cual el transporte de estas sustancias hacia dentro y fuera de las células, o entre diferentes compartimentos intracelulares, se lleva a cabo a través de distintas proteínas de membranas que funcionan como bombas, transportadores o canales iónicos (Richter y Brisson, 2003).

En el caso de los canales iónicos éstos son proteínas que atraviesan la membrana, están formados de una molécula proteica única o de varias de ellas que constituyen complejos moleculares. Su función es facilitar la difusión de iones a través de las membranas biológicas. Estructuralmente, los canales conforman un poro que provee de un ambiente energéticamente favorable para que los iones atraviesen la membrana. Están constituidos por regiones hidrofóbicas en contacto con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, y regiones hidrofílicas, aisladas del ambiente hidrofóbico, que interaccionan con los iones, permitiendo así el paso de los mismos a un lado y otro de la membrana. Las regiones hidrofílicas conforman lo que se conoce como el poro del canal.

Los canales iónicos se localizan en la membrana externa y en las membranas internas que rodean a los organelos, como por ejemplo el retículo endoplásmico (RE) y las mitocondrias. El flujo de iones se lleva a cabo a una gran velocidad, de hasta 10^6 iones/s, considerándose el sistema de transporte más eficiente. Esta eficiencia se da gracias a que los iones fluyen pasivamente en favor de su gradiente electroquímico, sin gasto de energía metabólica, siendo esto una característica muy importante para los procesos excitables (Stein, 1984).

El flujo de iones está determinado por factores que influyen en el movimiento iónico a través de la membrana, como son el gradiente de concentración, el gradiente químico y la permeabilidad de la membrana.

Los canales iónicos poseen mecanismos que permiten su regulación a través de la apertura y el cierre del poro conductor; esto es controlado por un sensor que puede ser eléctrico, químico o mecánico. Para aquellos que son activados por voltaje, el sensor incluye varios aminoácidos cargados que se mueven en el campo eléctrico de la membrana durante la apertura o cierre del canal. En el caso de los activados por ligando, el sensor es una región de la proteína canal que se encuentra expuesta ya sea hacia el interior o el exterior de la célula, que une con gran afinidad una molécula específica que conduce a la apertura o cierre del canal. Los canales mecanosensibles se abren por el estiramiento que sufre la membrana celular ante la aplicación de presión y/o tensión (Sands et al., 2005; Connolly y Wafford, 2004; Sokabe y Sachs, 1990).

1.1 MECANISMOS DE ACTIVACIÓN

Como ya se mencionó antes, los canales iónicos se pueden clasificar según el modulador físico, químico y mecánico que controle su apertura. Entre ellos se encuentran los canales mecanosensibles, los canales dependientes de ligando y los canales dependientes de voltaje. Los canales mecanosensibles responden a fuerzas mecánicas a lo largo del plano de la membrana celular (tensión de la membrana), no a la presión hidrostática perpendicular a la misma (Sokabe y Sachs, 1990). Lo que hace que estos canales respondan a la tensión en la membrana es menos claro. En algunos canales mecanosensibles parece existir un acoplamiento directo entre el canal y otras proteínas de membrana asociadas a la matriz extracelular y al citoesqueleto, que se encargaría de transmitir las fuerzas mecánicas al sistema de compuerta del canal (Perozo y Rees, 2003). Otros canales mecanosensibles controlan su apertura a través de interacciones con la bicapa lipídica. Modificaciones en la curvatura de la membrana, como por ejemplo durante la dilatación osmótica, producen fuerzas de tensión que se transmiten a la estructura del canal (Gillespie y Walker, 2001).

Aunque todavía no se ha conseguido realizar la identificación directa de los mecanotransductores de los mamíferos, han aparecido numerosos candidatos importantes a partir del análisis genético de la mecanosensibilización en sistema de invertebrados. Quizás los estudios más definitivos se han encontrado en las bacterias con los MsC (MsCL y MsCS), y en caso de los invertebrados, más específicamente *Caenorhabditis elegans*, se encontraron los DEG/ENaC (la subfamilia incluye MEC-4, MEC-6 y MEC-10) en la detección de toque suave (Arnadottir y Chalfie, 2010). Estos canales están relacionados estructuralmente con canales de sodio de mamíferos sensibles a la amilorida. Estudios en mosca, levadura y gusanos también han implicado en la mecanosensibilidad a los canales TRP, los cuales se agrupan en seis subfamilias de canales selectivos a cationes (Minke y Cook, 2002). Cada miembro de esta familia presenta seis segmentos transmembranales y una topología de membrana similar a los canales dependientes de voltaje y a los canales dependientes de nucleótidos cíclicos (Montell et al., 2002).

En cuanto a los canales iónicos dependientes de ligando, éstos son proteínas intrínsecas de membrana que permiten el paso de iones tras la activación por una sustancia o neurotransmisor específico, llamado ligando (Connolly y Wafford, 2004). En mamíferos se pueden dividir en 3 grandes familias (Figura 1) como resultado de la clonación y secuenciación de estos canales, llegando a la conclusión de que aunque presentan diferentes funciones, tienen secuencias de aminoácidos similares. La primer súper-familia es la del receptor del asa Cys, denominada así ya que todos los miembros presentan una estructura en forma de cisterna en el bucle del dominio extracelular y presentan 4 segmentos transmembranales. Esta familia incluye a los receptores de glicina (GlyR), receptores GABA (GABA_AR), receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChR) y algunos receptores de serotonina (5-HT₃R) (Hucho y Weise, 2001). La segunda familia son los receptores catiónicos activados por glutamato, los cuales presentan 3 segmentos transmembranales y un dominio extracelular formado por la región NH₂ terminal, que contiene el sitio de unión para el ligando. La familia está formada por los receptores NMDA (*N*-metil-D-aspartato), AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolapropiónico) y kainato (Michaelis, 1997). Por último la familia de los receptores P2X-adenosina trifosfato (ATP), engloba a canales que están formados por 3 subunidades y cada una contiene dos segmentos

transmembranales, conectado por un gran bucle extracelular glicosilado (Nicke et al., 1998).

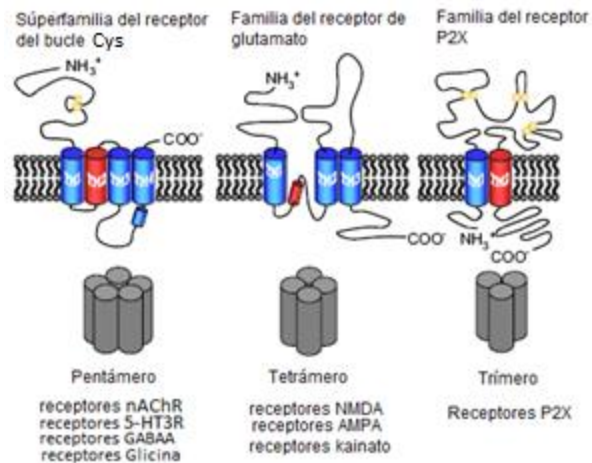


Figura 1. Representación esquemática de las tres categorías estructurales de canales iónicos activados por ligando. El receptor del bucle Cys es un pentámero, mientras que los receptores de glutamato son canales tetrámicos. La topografía esquemática de cada categoría del receptor indica las ubicaciones de los extremos terminales extra e intracelulares, los segmentos transmembranales (cilindros de colores) y los residuos de cisteínas que participan en la formación de enlaces disulfuros (círculos amarillo). Los cilindros rojos indican las regiones helicoidales que participan en la conducción y selectividad iónica. (Modificado de Collingridge et al., 2009).

Por su parte, los canales iónicos dependientes de voltaje son proteínas integrales de membrana que permiten el paso de iones inorgánicos seleccionados a través de las membranas celulares. Se abren y cierran en respuesta a cambios en el voltaje transmembranal (Sands et al., 2005). Estos canales se clasifican dependiendo del principal ion permeante, los cuales son el Na^+ , el Ca^{2+} , el K^+ y el Cl^- (Figura 2). Las subunidades principales de los diferentes canales dependientes de voltaje se encuentran relacionadas y están conservadas a lo largo de la evolución. Debido a esto un patrón básico emergió de todas estas secuencias: los canales funcionales se componen de cuatro subunidades (canales de K^+) o una proteína con cuatro dominios homólogos (canales de Na^+ y Ca^{2+}) denominada subunidad α , y una serie de subunidades accesorias. La subunidad α presenta seis segmentos transmembranales; esta subunidad contiene un poro acuoso central situado dentro de la membrana en el que se localiza la selectividad iónica (Hirata, 1993). Otra de sus funciones es determinar la dependencia del voltaje del canal, ya que contiene la región

que forma el sensor del voltaje, el cual sufre un cambio conformacional dependiendo de los campos eléctricos de la membrana. Las subunidades accesorias que presentan la mayoría de los canales pueden ser citoplasmáticas o extracelulares. Estas subunidades modifican la función básica, como por ejemplo, la conductibilidad de la subunidad α e incluso la localización del canal a nivel de la membrana plasmática así como los niveles de expresión (Yu y Catterall, 2004).

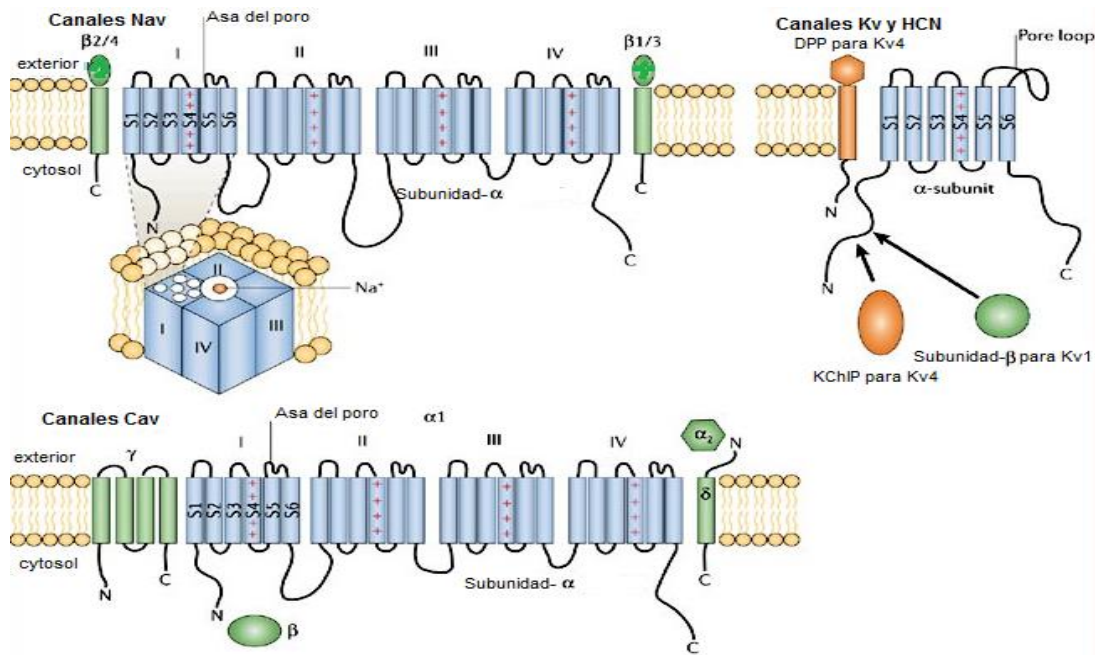


Figura 2. Topología estructural de los canales dependientes de voltaje. Los canales de sodio dependientes de voltaje (Na_V) se forman a partir de un único polipéptido que consiste en 4 dominios homólogos (I-IV), cada uno de los cuales tiene 6 segmentos transmembranales (S1-S6). El segmento S4 de cada dominio contiene argininas y lisinas cargadas positivamente, que son las responsables principales de la detección de voltaje, mientras que el asa entre los segmentos S5 y S6 forma el dominio del poro (asa P) a través del cual fluyen los iones sodio. Las subunidades β , $\beta 1/3$ y $\beta 2/4$ son proteínas transmembranales individuales que tienen un dominio extracelular similar a la inmunoglobulina que co-ensambla con la subunidad α de Na_V . Los canales de potasio dependientes de voltaje (K_V) y los canales catiónicos operados por nucleótidos cíclicos activados por hiperpolarización (HCN) tienen 4 subunidades α idénticas o similares, cada una con un dominio único. Los canales $\text{K}_V 1$ tienen subunidades citoplasmáticas β que interactúa con los dominios NH_2 terminal T1. Los canales $\text{K}_V 4$ tienen dos proteínas asociadas estrechamente; la proteína intracelular KChIP y una única proteína en la membrana, DPPX. Los canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_V) presentan una topología similar a los canales Na_V en sus subunidades α . Los canales Ca_V pueden tener hasta 4 subunidades asociadas: el complejo $\alpha_2\delta$ unido por un puente disulfuro, una proteína intracelular β y una subunidad γ con cuatro segmentos transmembranales. (Modificado de Helen y Lily, 2006).

1.2 CANALES DEPENDIENTES DE VOLTAJE

Los canales iónicos dependientes de voltaje selectivos para los iones de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ son los mayores determinantes de las propiedades eléctricas de las neuronas y otras células excitables, y se cree que desempeñan un papel crítico en la evolución de los animales (Hille, 2001). La variedad en el conocimiento sobre las funciones de estos canales se ha obtenido por estudios biofísicos, además de la clonación de los ADNc que codifican para ellos. Esto presenta una oportunidad para su estudio molecular en cuanto a su estructura y función.

La baja abundancia de los canales de K^+ dependiente de voltaje hizo que su purificación en mamíferos fuera difícil, por lo que un enfoque alternativo, haciendo uso de la genética de la mosca *Drosophila*, permitió la clonación de un gen para un canal de K^+ (Pongs et al., 1988). Posteriormente, usando el gen Shaker (importante para la función del canal de K^+) como sonda de hibridación, fue posible aislar los genes que codifican para más de 100 canales de K^+ dependientes de voltaje de los vertebrados (Lovell et al., 2013). Estos canales son tetrámeros, con cada unidad proteica codificada por un gen para un dominio con 6 segmentos transmembranales. La familia de este canal se compone de varias isoformas funcionalmente distintas, que se pueden separar en 2 grupos: inactivantes y no inactivantes (Rhen, 1991). Debido a su amplia distribución filogenética, se cree que los canales K_V son los primeros canales iónicos dependientes de voltaje que se desarrollaron (Moran et al., 2015).

En el caso de los canales de Ca^{2+} es probable que surgieran a partir de los canales de K^+ durante la evolución eucariota. El gen para un canal de seis segmentos transmembranales posiblemente se duplicó, dando lugar a una proteína con dos dominios (Figura 3 A y B), que luego se duplicó de nuevo para formar el canal de cuatro dominios (Figura 3 C) (Yu et al., 2005). Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje presentan una distribución filogenética amplia; en el caso de metazoos juegan múltiples funciones esenciales en el sistema nervioso, cardíaco, endócrino, reproductivo y en el músculo esquelético; en los protozoos están asociados a la locomoción (paramecio), respuestas al estrés (diatomeas) y emisión de luz (dinoflagelados) (Moran et al., 2015). El primer canal de Ca^{2+} que fue

bioquímicamente purificado y clonado fue el canal tipo L de los túbulos T del músculo esquelético el cual es sensible a la 1,4-dihidropiridina (DHP) (Nowycky et al., 1985).

La alta afinidad de unión de los canales de Na^+ a neurotoxinas tales como la tetrodotoxina y saxitoxina, permitieron su purificación del cerebro de los vertebrados, el músculo, corazón y la electroplaca de la anguila eléctrica (Agnew, 1984). Nueve genes en mamíferos codifican las distintas isoformas de la subunidad α ($\text{Na}_{v1.1}$ - $\text{Na}_{v1.9}$), las cuales muestran expresión tejido-específica (George Jr., 2005). Se cree que los canales Na_V han evolucionado como resultado de la duplicación de genes y la diversificación de un canal Ca_V ancestral, puesto que los cuatro dominios de los canales de Na_V muestran una mayor similitud de secuencia a los dominios de los canales Ca_V y tiene a su vez los niveles más bajos de similitud con los canales K_V (Hille, 1989). Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que los dominios I y III de los canales de Na^+ y Ca^{2+} son más similares entre sí, lo mismo pasa con los dominios II y IV, a otras combinaciones (Strong et al., 1993).

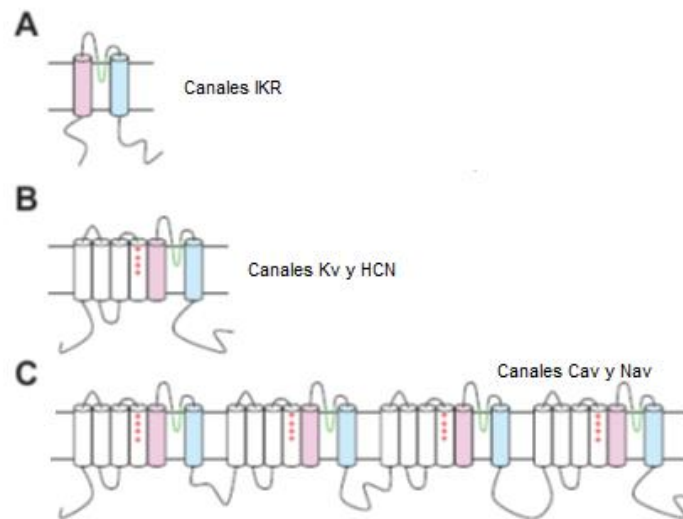


Figura 3. Ilustración de la evolución y conservación de los canales iónicos dependientes de voltaje. Se cree que la evolución de los 4 dominios con 6TM de los canales Ca_V y Na_V , inicio a partir de una estructura de un dominio con 2TM (panel A) encontrado en las familias de canales iónicos IRK. Esto fue seguido por la adición de una estructura para la detección del voltaje (puntos rojos en el S4 del panel B) que se encuentra en los canales K_V y HCN. Finalmente en base a la similitud de secuencias, un evento de duplicación en tándem es la hipótesis con la cual se explica la formación de los canales Ca_V y Na_V (panel C). (Modificado de Moran et al., 2015).

2. CANALES DE Ca^{2+} DEPENDIENTES DE VOLTAJE.

Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) permiten la entrada de iones Ca^{2+} a la célula en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática, provocando así aumentos transitorios localizados del ion. De esta forma estos canales actúan como transformadores de señales eléctricas en señales químicas, jugando un papel central en procesos fisiológicos de gran importancia como la contracción muscular, la secreción, la liberación de los neurotransmisores presinápticos, la activación de enzimas, la expresión génica en diferentes tipos celulares, la supervivencia, y la diferenciación y plasticidad neuronal, entre otros procesos (Tyson y Snutch, 2013).

Los canales de calcio dependientes de voltaje son proteínas heteroméricas compuestas de cuatro o cinco subunidades (Catterall, 2000). Estos canales se han podido caracterizar debido a las diferentes funciones celulares que desempeñan y a su sensibilidad a fármacos específicos.

2.1 NOMENCLATURA DE LOS CANALES DE Ca^{2+} DEPENDIENTES DE VOLTAJE.

En 1994 se adoptó una nomenclatura unificada pero arbitraria en la que las subunidades α_1 , se referían como α_{1S} para la isoforma original de músculo esquelético y las subunidades α_{1A} a α_{1E} para las isoformas descubiertas con posterioridad (Birnbaumer et al., 1994). En el 2000 se adoptó una nomenclatura más razonada basada en la nomenclatura de los canales de K^+ (Chandy y Gutman, 1993), en la cual se definen familias y subfamilias de los canales de K^+ basado en la similitud en la secuencia de aminoácidos. Con esto se estableció una nueva nomenclatura (Figura 4) para clasificar a los CCDV, la cual se basa en la estructura de la subunidad α_1 . De acuerdo con esta nomenclatura las subunidades α_1 se denominan conforme el esquema $Ca_vx.y$, en donde Ca_v denota a los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, x es el número designado inicialmente a la subfamilia del canal (tipo L, T, N, P/Q o R) y y es el número designado a los miembros individuales de cada familia. Utilizando esta nomenclatura, por ejemplo, en los miembros de la subfamilia Ca_v2 (P/Q, N y R) de canales

de Ca^{2+} se denominan: α_{1A} como $\text{Ca}_v2.1$, α_{1B} como $\text{Ca}_v2.2$ y α_{1E} como $\text{Ca}_v2.3$ (Ertel et al., 2000).

Canal (IUPHAR)	Subunidad α	Tipo de Canal (corriente)	Nomenclatura gen (HUGO)	Localización de los genes para los CCDV en humano
Cav1.1	α_{1S}	L	CACNA1S	1q31-32
Cav1.2	α_{1C}	L	CACNA1C	12p13.3
Cav1.3	α_{1D}	L	CACNA1D	3p14.3
Cav1.4	α_{1F}	L	CACNA1F	Xp11.23
Cav2.1	α_{1A}	P/Q	CACNA1A	19p13.1
Cav2.2	α_{1B}	N	CACNA1B	9q34
Cav2.3	α_{1E}	R	CACNA1E	1q25-q31
Cav3.1	α_{1G}	T	CACNA1G	17q22
Cav3.2	α_{1H}	T	CACNA1H	16p13.3
Cav3.3	α_{1I}	T	CACNA1I	22q13.1

Figura 4. Nomenclatura de los ADNc clonados para las diversas subunidades α_1 de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. (Modificado de Rosich, 2008).

2.2 ESTRUCTURA DE LOS CANALES DE Ca^{2+} DEPENDIENTES DE VOLTAJE.

Estudios bioquímicos han revelado que los CCDV son proteínas heteroméricas de alto peso molecular, compuestas por cuatro o cinco subunidades distintas, denominadas α_1 , α_2 , δ_1 , γ y β , las cuales están codificadas por múltiples genes (Figura 5) (Catterall, 2000). Los primeros estudios se realizaron a partir de los túbulos T de musculo esquelético debido a su alta riqueza en estos canales (Dolphin, 1995). Las propiedades específicas de estos canales están determinadas por la identidad de su subunidad α_1 , que constituye el poro del canal, aunque se vean modificadas por las subunidades asociadas α_2 , δ_1 , β y γ (Muth et al., 2001). La interacción entre las diferentes subunidades es fuerte pero no están unidas de forma covalente, salvo el caso de las subunidades α_2 y δ_1 , que están unida por enlace disulfuro.

En cuanto a las subunidades accesorias $\alpha_2\delta$ ($\alpha_2\delta_{1-4}$), β (β_{1-4}) y γ (γ_{1-8}) son codificadas por cuatro, cuatro y ocho genes diferentes, respectivamente (Lacinová et al., 2005). Aunque se ha determinado que el canal $Ca_v1.1$ del músculo esquelético contiene la subunidad γ_1 (33 kDa), no está claro si todos los canales de Ca^{2+} contienen subunidades γ . La subunidad β (55 kDa), se encuentra en el interior celular, la cual parece modular la actividad del canal y su transporte hacia la membrana plasmática (Murakami et al., 2002). Las dos proteínas auxiliares α_2 y δ (170 kD) son producto del mismo gen y se originan por un corte proteolítico post-traduccional; los efectos de la subunidad dependen del sistema de expresión y de las subunidades utilizadas (Hoffman et al., 1994). Ya sea en conjunto o por separado, estas subunidades accesorias modulan la cinética de activación e inactivación, la densidad de expresión, la dependencia al voltaje y las propiedades farmacológicas de la subunidad α_1 (Ertel et al., 2000).

La subunidad α_1 es la de mayor tamaño, consiste aproximadamente de 2,000 aminoácidos (190-250 kDa), constituye el poro de paso de los iones de calcio y determina las propiedades fundamentales del canal, ya que incorpora el sensor del voltaje y el aparato de apertura, además de ser la subunidad que contiene el mayor número de sitios de regulación por parte de vías de señalización intracelular, fármacos y toxinas (Hoffman et al., 1999; Catterall et al., 2005).

Al igual que la subunidad α de los canales de sodio, esta subunidad α_1 está organizada en cuatro dominios homólogos (I-IV) como se observa en la Figura 5, cada uno de los cuales presentan seis segmentos transmembranales (S1-S6) con los extremos COOH y NH₂ en el interior celular. El segmento S4 contiene el sensor de voltaje, por lo que cada uno de los dominios posee elementos estructurales específicos que incluyen residuos de aminoácidos cargados positivamente (lisina y arginina). Dichos aminoácidos forman el sensor de voltaje, el cual sufre un cambio conformacional en respuesta a una señal despolarizante, de tal modo que este cambio puede acoplarse a la apertura del canal (Catterall, 2011). El asa P situada entre los segmentos S5 y S6 de cada dominio, determina la conductancia iónica y la selectividad, de forma que cambios de solo tres aminoácidos en las asas de los dominios I, II y IV pueden convertir un canal de sodio en un canal selectivo de calcio (Catterall et al.,

2005). Hasta la fecha se han identificado por lo menos 10 genes que codifican para la subunidad α_1 de los CCDV.

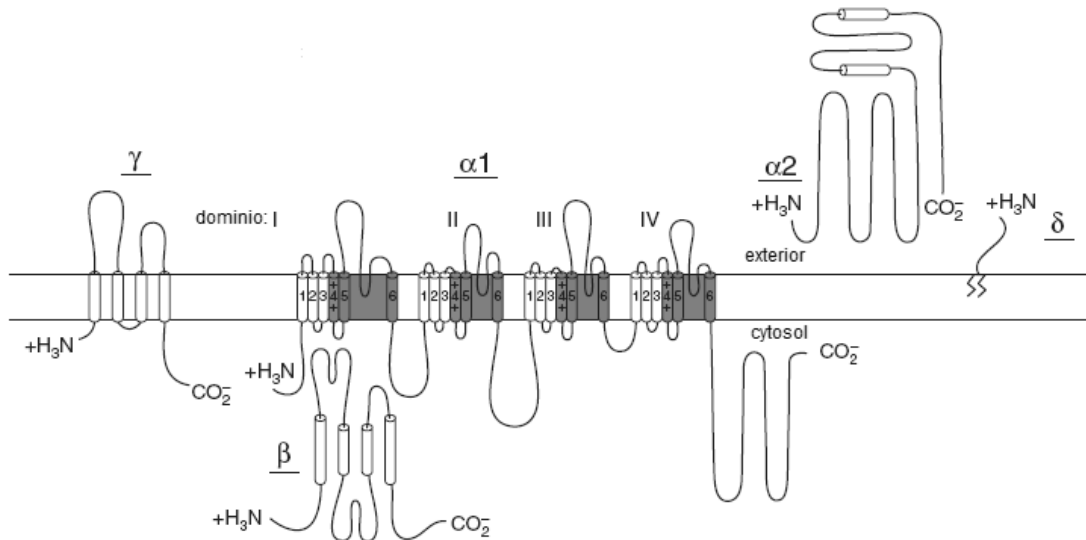


Figura 5. Estructura de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje. Las estructuras de la subunidades de los canales de Ca^{2+} se ilustran como modelos transmembranales plegables; las hélices predichas se representan como cilindros; las longitudes de las líneas se correlacionan aproximadamente a las longitudes de los segmentos de polipéptidos representados. La línea en zigzag en la subunidad δ ilustra su ancla de glicosilfosfatidilinositol. (Modificado de Catterall, 2011).

2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS CANALES DE Ca^{2+} DEPENDIENTES DE VOLTAJE

Desde los primeros registros de corrientes de Ca^{2+} en los miocitos cardiacos, se ha hecho evidente que hay múltiples tipos de CCDV; esto también se ha comprobado por criterios fisiológicos, farmacológicos y estructurales (Tsien et al., 1988; Llinas et al., 1992). Inicialmente los canales de Ca^{2+} dependiente de voltaje se clasificaron de acuerdo con sus propiedades electrofisiológicas. Debido a esto se identificaron dos grupos: los canales que necesitan una pequeña despolarización para ser activados y los que requieren de un cambio mayor en el voltaje para abrirse (Hagiwara et al., 1975). De acuerdo con este criterio, los CCDV se dividieron en canales activados por bajo voltaje (LVA) y los canales activados por alto voltaje (HVA). El potencial de activación de los canales de calcio LVA es entre -70 mV y -60 mV. Debido a la pequeña amplitud de la conductancia y la inactivación

transitoria, esto canales también fueron llamados tipo T (por pequeño y transitorio, *tiny and transient*) (Nowycky et al., 1985). Por otra parte, el potencial de activación para los canales HVA se encuentra entre -40 mV y -10 mV; estos canales también fueron llamados tipo L (por grande y de larga duración, *large and lasting*) ya que su inactivación es lenta y presentan una amplitud grande de la conductancia (Tsien et al., 1988).

Las propiedades de corriente de los canales de Ca^{2+} tipo T se describieron en neuronas del núcleo olivar de rata (Llinas y Yarom, 1981). Estos canales han sido encontrados en una gran variedad de células excitables y no excitables (neuronas, músculo cardiaco, músculo liso, músculo esquelético durante el desarrollo, fibroblastos, etc.). Su función está relacionada principalmente con la actividad rítmica (marcapasos) y varias formas de oscilación de disparos neuronales fisiológicos y fisiopatológicos (Richter et al., 2005). Las corrientes de Ca^{2+} tipo T se activan e inactivan cerca del potencial de membrana en reposo de las neuronas (-60 mV), poseen una cinética de activación e inactivación muy rápida y se desactivan de forma lenta. Son bloqueados, aunque de forma no selectiva, por amilorida (Tang et al., 1988), tetrametrina (Hagiwara et al., 1988), difenilhidantoina (Yaari et al., 1987) y octanol. Son resistentes a las dihidropiridinas. Estudios en neuronas talámicas permitieron identificar a tres tipos de genes que codifican para los canales tipo T, como son el CACNA1G, que codifica para la subunidad $\text{Ca}_v3.1$, el CACNA1H que codifica la subunidad $\text{Ca}_v3.2$ y el CACNA1I que codifica la subunidad $\text{Ca}_v3.3$ (Pérez-Reyes, 2003).

Los canales tipo L son probablemente los mejor caracterizados. Se describieron por primera vez en neuronas del asta dorsal de pollo en 1985 (Nowycky et al., 1985). Posteriormente en los humanos se reportó una amplia distribución. Por ejemplo, se han encontrado en músculo esquelético, miocitos cardíacos, células endocrinas y cuerpos neuronales y dendritas del hipocampo y de la retina. Los primeros estudios realizados sobre estos canales los reconocieron como la parte esencial para el acoplamiento entre la excitación y la contracción de los músculos esquelético, cardiaco y liso (Tanabe et al., 1988). En las neuronas participan en la regulación de muchos procesos de secreción de neurohormonas y transmisores, expresión génica, eficacia sináptica y modulando la actividad de otros canales iónicos (Lipscombe et al., 2004). Las tres clases principales de bloqueadores de los canales tipo L son los fenilalquilaminas (verapamil), benzodiazepinas (diltiazem) y

1,4-dihidropiridinas (DHP) (por ejemplo, nitrendipina, nifedipina y nimodipina) (Glossmann y Striessnig, 1990). Se han identificado 4 genes que dan lugar a 4 distintas subunidades α_1 en esta familia, como son CACNA1S que codifica para la subunidad $Ca_v1.1$, el CACNA1C para la subunidad $Ca_v1.2$, el CACNA1D para la subunidad $Ca_v1.3$ y el CACNA1F para la subunidad $Ca_v1.4$.

Además de los canales de Ca^{2+} tipo T y L, en las células del asta dorsal del pollo se reveló un tercer tipo de canal, el cual no presentaba sensibilidad a las dihidropiridinas y tenía valores de conductancia entre los tipos T y L (Nowycky et al., 1985). En consecuencia, el canal correspondiente se designó como tipo N (por neuronal). Posteriormente debido a la aparición de nuevas herramientas farmacológicas se permitió realizar una nueva subclasificación en canales tipo N, P/Q y R de acuerdo con su resistencia a ciertas toxinas. Las corrientes de tipo N, P/Q y R también se caracterizan por activarse a un voltaje alto (HVA).

Los canales de Ca^{2+} tipo N también se han detectado en neuronas del ganglio del asta dorsal de mamíferos (Gross y Macdonald, 1987), neuronas simpáticas de mamíferos y anfibios (Jones y Marks, 1989) y otras células del sistema nervioso. Farmacológicamente los canales tipo N son sensibles a la inhibición por una clase de toxinas peptídicas llamadas conotoxinas, que se encuentran en el veneno de los caracoles marinos del género *Conus*. Hasta la fecha la ω -conotoxina GVIA (ω -CgTx) (de *C. geographus*) es el péptido más específico para la inhibición de este tipo de canal (Hormigo et al., 1994). Esto permitió identificar una gran abundancia de estos canales en las dendritas y en las terminales del axón, por lo que sugiere que la entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo N es responsable de desencadenar la liberación de neurotransmisores.

En 1989 se identificó la corriente tipo P, se nombró de esta forma ya que se describió por primera vez en las células de Purkinje. Este canal mostró ser insensible a las toxinas típicamente usadas para inhibir canales tipo N y L (Llinas et al., 1989). Estos canales se han implicado en varios procesos, principalmente en la liberación de neurotransmisores en algunas sinapsis. A diferencia del canal tipo N, el tipo P tiene una selectividad para un ion monovalente en ausencia de cationes divalentes. Por otro lado, el canal tipo Q fue identificado en neuronas granulares del cerebelo (Randall y Tsien, 1995). Ambos se

caracterizan por su sensibilidad al veneno de la araña *Agelenopsis aperta*, la ω -Agatoxina IVA, y son codificados por el gen CACN1A. Un número de variantes de *splicing* alternativo puede explicar las diferentes características fenotípicas de los canales tipo P y Q en cuanto al bloqueo y características electrofisiológicas. La expresión de los canales P/Q a menudo se superpone a su análogo cercano, el canal de calcio tipo N. Sin embargo, el canal tipo P/Q se expresa preferentemente en las neuronas del sistema nervioso central (SNC).

El canal tipo P/Q se localiza especialmente en áreas ricas en terminales sinápticas, específicamente en la capa molecular del cerebelo y la zona del hipocampo CA3 (Hillman et al., 1991). Su función es la regulación de la liberación de los neurotransmisores y la integración neuronal. En las neuronas del globo pálido, la microscopía inmunoelectrónica ha revelado que además de la tinción de las terminaciones nerviosas, la reacción con inmunoperoxidasa igualmente se observa en las dendritas. También en las dendritas de las células de Purkinje el canal tipo P/Q está localizado y asociado, mediante una interacción física directa, con los receptores metabotrópicos del glutamato (mGluR1). Este canal, en respuesta a una despolarización de la membrana, regula el flujo hacia el interior de Ca^{2+} extracelular, resultando no solo en la liberación de neurotransmisores, sino que incluso se ha implicado como mediador de la transmisión neuromuscular (Sugiura et al., 1995).

Un componente de la corriente HVA en las células granulares de cerebelo se mantiene incluso después de la aplicación de nimodipina, ω -CgTx, ω -Aga VIA y ω -CgTx MVIIC, con las cuales se pueden bloquear canales N, P/Q y L. Esta corriente fue clasificada como R (residual o resistente) (Zhang et al., 1993), la cual comprende el 15% de la corriente HVA en estas células. La connotación R también fue debida a que se descubrieron después de los canales tipo Q. Posteriormente se encontró el péptido SNX-482 (de la tarántula *Hysterocrates gigas*), a la cual demostró ser sensible. Estos canales tipo R también se localizan en cuerpos neuronales y dendritas del globo pálido, tálamo, amígdala anterior, hipotálamo y núcleos subtalámicos. Tiene una función de producir descargas repetitivas (Rosich, 2008).

3. ESTRUCTURA DE LA SUBUNIDAD α_1 DE LOS CANALES DE Ca^{2+} TIPO P/Q.

En cuanto a la estructura de la subunidad α_1 de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q, se sabe que ésta es similar a la de los canales HVA. Es decir, presenta cuatro dominios homólogos, cada uno de los cuales consta de seis segmentos transmembranales y un asa del poro. Sus extremos NH_2 y $COOH$ terminales y las asas que unen a los dominios se localizan intracelularmente. Las subunidades accesorias que presenta este canal son las subunidades β y $\alpha_2\delta$, las cuales modulan la cinética del canal y nivel de expresión (Nimmrich y Gross, 2012).

3.1 TOPOLOGÍA TRANSMEMBRANAL DE LA SUBUNIDAD α_1 DE LOS CANALES DE Ca^{2+} TIPO P/Q.

Las diferencias funcionales entre los miembros de las subfamilias de los canales de Ca^{2+} se definen, en gran parte, por la variabilidad estructural en los interdominios. Un número creciente de regiones se han identificado, en el que se modula interacciones específicas y/o se producen modificaciones bioquímicas. En conjunto, esto permite la integración de una señal local de Ca^{2+} para facilitar funciones celulares como la contracción muscular, la secreción de hormonas, la transmisión sináptica, la regulación de enzimas y la transcripción de genes. Algunas de estas regiones son exclusivas de alguna subfamilia o algún miembro, y confiere propiedades funcionales específicas. Otras regiones se conservan en más de una subfamilia y confiere propiedades moduladoras (Tyson y Snutch, 2013).

Para el canal tipo P/Q las regiones que presenta son las que se muestran en la Figura 6, como se puede observar sus sitios más específicos están asociadas con la liberación de neurotransmisores y la alta eficiencia de este proceso.

En el caso del dominio AID (dominio de interacción α), es una región que se encuentra en el asa entre los dominios I y II, donde la subunidad $Ca_v\beta$ (dominio ABP, dominio de la hendidura de unión de β , del inglés *alpha binding pocket*) interactúa. Esta interacción es importante para la expresión eficiente en la superficie celular y las propiedades del control de la compuerta de los canales Ca_v1 y Ca_v2 (De Waard M et al., 1997). En la misma región

se encuentra el sitio de interacción con las subunidades $G\beta\gamma$ en canales Ca_v2 , aunque también se han encontrado sitios adicionales en el carboxilo terminal. Esta área se identificó como un sitio crucial para la regulación mediada por proteínas G trimericas, lo que permite la inhibición de la actividad del canal de Ca^{2+} por $G\beta\gamma$, a través de la activación de un número de distintos receptores acoplados a proteínas G (Li et al., 2004)

Un sitio importante para la función del canal tipo P/Q es el sitio de interacción con proteínas sinápticas (abreviado synprint en inglés), el cual se encuentra en el asa entre los dominios II y III. En terminales nerviosas presinápticas forma un complejo con las proteínas SNARE (esenciales para la fusión de la vesículas a la membrana presináptica), syntaxina-1, SNAP-25 y sinaptotagmina-1. Esta interacción y la entrada de Ca^{2+} por el cambio de potencial provocan la exocitosis de las vesículas y liberación de los neurotransmisores (Sudhof, 2004).

El sitio synprint no es la única región implicada en el acoplamiento de los canales Ca_v en la liberación de neurotransmisores y su localización en la zona activa presináptica. Un dominio PDZ (PSD-95, Dlg, ZO-1) interacciona con el carboxilo-terminal del canal tipo P/Q, el cual ha sido demostrado con las proteínas RIM que son organizadores centrales en las zonas activas presinápticas (Tyson y Snutch, 2013).

También en el extremo COOH del canal tipo P/Q se encuentra la región del dominio de unión a la calmodulina (CBD del inglés *calmodulin binding domain*), la cual interactúa con dos sitios en el extremo carboxilo terminal. La calmodulina (CaM) es una proteína soluble altamente conservada en la evolución y funciona como un monómero con dos pares de manos EF (estructura que une con alta afinidad el ion Ca^{2+}), por lo que la CaM puede unir cuatro iones Ca^{2+} (Peterson et al., 1999). Este dominio está involucrado en la inactivación de la corriente de calcio, pero también forma parte de la facilitación a largo plazo. Esta facilitación dependiente de calcio se creó que se produce a través de un dominio IQ modificado (IM) (Lee et al., 1999). El CBD es también el sitio de interacción con otros sensores de Ca (CaS), proteínas como CaBP1 y VILIP-2, las cuales tienen un efecto modulador en la actividad del canal (Haeseleer et al., 2002). Los sitios para manos EF presentan variantes en la subfamilia Ca_v2 los cuales juegan un papel modulador significativo a través de la unión de iones Ca^{2+} (Chaudhuri et al., 2004).

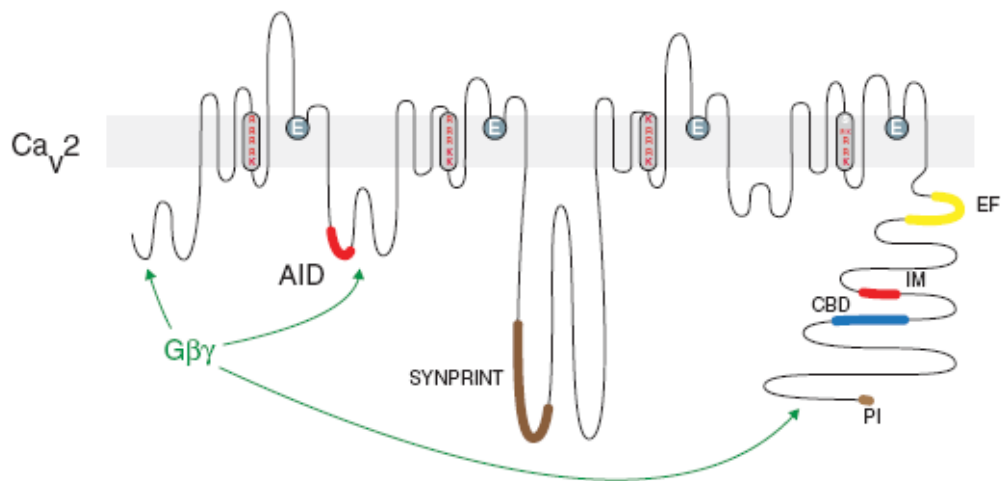


Figura 6. Dominios reguladores conocidos de la subunidad α_1 de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q. Todas las subunidades α_1 de las subfamilias Ca_v1 y Ca_v2 , poseen una región conservada en el asa de los dominios I y II para la unión con la subunidad β (AID), así como motivos conservados de mano EF en el extremo carboxilo. Otros elementos estructurales identificados en estos canales incluyen: un sitio de unión para la subunidad $\text{G}\beta\gamma$ de las proteínas G triméricas, en el asa entre los dominios I y II, aunque también se puede encontrar en el extremo carboxilo y amino; un dominio synprint en el asa entre los dominios II y III, responsable de la interacción funcional con la maquinaria de la liberación sináptica; en el carboxilo terminal está el dominio CBD para la unión de la calmodulina, el dominio IM, motivo IQ modificado, y el PI, proteínas de unión de Ca^{2+} y el dominio de interacción a zonas postsináptica (PDZ). (Modificado de Tyson y Snutch, 2013).

4. CANALES DE Ca^{2+} DEPENDIENTES DE VOLTAJE Ca_v2 EN CORDADOS.

Con el análisis de las secuencias de la subunidad α_1 de los canales de Ca^{2+} , se permitió, a partir de un amplio espectro de organismos multicelulares su división en tres ramas principales, con base a la similitud de secuencias: el Ca_v1 (corrientes tipo L), Ca_v2 (corrientes tipo P/Q, N y R) y Ca_v3 (corriente tipo T), presentando una homología de menos del 40% entre las tres subfamilias como se puede ver en la Figura 7 (Lacinová, 2005). Como ya se había mencionado anteriormente, se han identificado por lo menos 10 o más genes (por ejemplo, en algunos peces) que codifican de forma independiente canales de Ca^{2+} , y por su homología en la secuencia de aminoácidos se han dividido en las 3 subfamilias. Por otra parte, la homología dentro de una misma subfamilia es del 70%, lo cual define la especificidad dentro de cada uno de ellas (Figura 7).

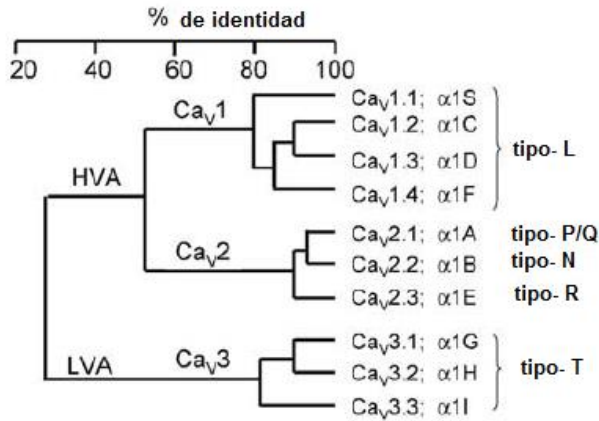


Figura 7. Homología en la secuencias de aminoácidos de las subunidades α_1 de los CCDV. Representación filogenética de las secuencias primarias de los canales de Ca^{2+} . Solo se compara los segmentos transmembranales y las asas de poro. Primero, todos los pares de secuencias fueron comparados, lo cual define claramente 3 familias con identidad en sus secuencias $> 80\%$ (Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3). Entonces una secuencia consenso fue definida para cada familia y cada secuencia fue comparada con la secuencia de otra familia, mostrando una identidad en su secuencias de aproximadamente 50%

(Ca_v1 contra Ca_v2) y 28% (Ca_v3 contra Ca_v1 o Ca_v2). (Modificado de Lacinová, 2005)

Curiosamente, esta elaboración no es observada en los insectos y nemátodos que contienen un solo representante más alejado para cada una de las principales ramas de las subfamilias de canales de Ca_v , y que probablemente corresponde a una ramificación distante de la evolución de los cordados (Tyson y Snutch, 2013). Un ejemplo temprano de la división de las tres subfamilias se encuentra en los animales multicelulares simples *Tricholax adhaerens*, siendo los organismos más alejados de los canales de Ca_v al compararlos contra otros organismos más avanzados (Liebeskind et al., 2011). La transición de los 3 miembros de CCDV a los 10 que hasta ahora se han encontrado, parece haber ocurrido en la evolución de los vertebrados. Un ejemplo de esto, es *Branchiostoma floridae*, un pequeño pez proto-cordado que solo tiene 3 canales de Ca_v , pero estas muestran la mayor similitud a las subfamilias expandidas en los vertebrados en comparación con los invertebrados (Tyson y Snutch, 2013).

La distribución de los CCDV en los tejidos de los cordados, presenta un patrón que refleja la función para la cual fueron seleccionados durante la evolución. Por ello, en el músculo esquelético y cardíaco encontramos los canales $\text{Ca}_v1.1$ y $\text{Ca}_v1.2$, respectivamente, donde participan en el acople excitación-contracción en las células de esos tejidos. Los canales $\text{Ca}_v1.3$ se expresan ampliamente en el cerebro, tejido endocrino y el corazón, mientras que los canales $\text{Ca}_v1.4$ muestran una expresión restringida a las células de la retina donde se asocian con la fototransducción (Catterall, 2011). Los canales de bajo umbral $\text{Ca}_v3.1$ y $\text{Ca}_v3.2$ también están ampliamente distribuidos en diversos tejidos, en tanto que los canales

Ca_v3.3 se expresan únicamente en el tejido nervioso (Mizuta et al., 2005). Los canales Ca_v2.1-Ca_v2.3, tienen una expresión preponderante en el sistema nervioso de los cordados; este tipo de canales se encuentra en las neuronas y terminaciones sinápticas, donde inician la neurotransmisión en la sinapsis rápida y median la entrada de Ca²⁺ al soma y dendritas (Ishikawa et al., 2005).

4.1 CANALES DE CA²⁺ DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN LAS TORTUGAS.

En los vertebrados, la anaerobiosis facultativa está más desarrollada en tortugas acuáticas y semiacuáticas, las cuales sobreviven en inmersiones en apnea, hibernaciones bajo el agua en estanques y lagos bloqueados por el hielo. Los mecanismos de anaerobiosis no son solo fascinantes en sí mismas, sino que además las tortugas de los géneros *Trachemys* y *Chrysemys* son también ampliamente utilizadas como modelos en las ciencias médicas en la búsqueda de soluciones a las lesiones causadas por la anoxia (Bickler, 2004), así como en el estudio del sistema nervioso, tanto a nivel morfológico como fisiológico. Como ya se mencionó, la capacidad de las tortugas de tener una alta resistencia a la anoxia ha presentado una ventaja en el estudio de sus tejidos, como por ejemplo las preparaciones de rebanadas de cerebro, las cuales tienen una vida media mayor comparada con la de los mamíferos.

La estructura del sistema nervioso de las tortugas, aunque en términos generales similares a la de los mamíferos, muestra diferencias tanto macroscópicas como microscópicas, como son la disposición de algunas estructuras y el número de capas que presenta la corteza cerebral, entre otras más (Sriedter, 2005). Sin embargo, esta estructuración relativamente más amplia representa una ventaja cuando se trata de analizar la actividad de las neuronas en un circuito más sencillo.

Para el estudio de las células pilosas del órgano auditivo las tortugas son usadas ampliamente como un modelo experimental. La función de los canales de CCDV en las células pilosas es la de regular la liberación de los neurotransmisores y la oscilación del potencial de la membrana, en conjunto con canales de K⁺ dependientes de voltaje y de Ca²⁺ para codificar y transmitir la información sensorial auditiva. En las tortugas se encontró que

los principales canales de calcio que se encuentran en las células pilosas son del tipo L en especial el tipo $Ca_v1.3$ (α_{1D}), lo cual concuerda con lo reportado en mamífero ya que el canal tipo $Ca_v1.3$ contribuye con un 90% de su corriente de calcio (Platzer et al., 2000), las diferencias que presenta el canal tipo $Ca_v1.3$ de la tortuga es que muestra una inactivación menor y cinéticas distintas, así como la ausencia del bloqueo dependiente de voltaje de la nimodipina (una dihidropiridina) (Shnee y Ricci, 2003).

Del mismo modo, la retina de la tortuga ha sido ampliamente empleada para definir los mecanismos de la fototransducción y su modulación debido a la facilidad para distinguir los fotorreceptores, en especial los conos, ya que en especies de vertebrados no mamíferos estos son abundantes y en ocasiones sus dimensiones facilitan las técnicas de registro electrofisiológicos como el “patch clamp” (Sakmann y Neher, 1995). En los mamíferos el principal canal presente en los fotorreceptores es el $Ca_v1.4$ (Zabouri y Haverkamp, 2013), y basado en las características biofísicas y farmacológicas de las corrientes de calcio en los fotorreceptores de la tortuga es probable que sea la misma isoforma la responsable de generarlas (Barnes y Kelly, 2002). En la retina, el canal $Ca_v1.4$ permite la liberación del glutamato en las sinapsis de los fotorreceptores con las células bipolares.

Finalmente, en las motoneuronas espinales con la expresión de los canales de Ca^{2+} tipo T en la tortuga adulta, en el que recientemente se ha propuesto su uso debido a su alta resistencia a la hipoxia. La expresión de los canales de Ca^{2+} tipo T se han encontrado durante el desarrollo, sin embargo, su expresión va disminuyendo conforme se acerca a la etapa adulta, pero no desaparece por completo, lo cual no estaba comprobado. En las motoneuronas espinales en tortuga se reportó que los canales tipo T si se expresan en los adultos, mientras que por estudios químicos y moleculares se llegó a la conclusión que son los canales tipo $Ca_v3.1$ los que esencialmente se expresan. Por lo tanto, puede ser concebible que estos canales sean mantenidos en las motoneuronas de mamíferos adultos (Canto-Bustos et al., 2014). Los canales de Ca^{2+} tipo T en las motoneuronas participan en la generación de patrones complejos de disparos de potencial de acción como los rebotes post-inhidores y modulando la excitabilidad (Pape, 1996).

5. CANALOPATÍAS ASOCIADAS A LOS CANALES TIPO P/Q

A partir del descubrimiento de la primera enfermedad relacionada con un canal iónico (fibrosis quística), la lista de enfermedades asociadas a la disfunción de estas proteínas se ha incrementado en forma sorprendente, generando así lo que hoy conocemos como “canalopatías” (Crozier et al., 1989). El concepto de canalopatía se refiere a los defectos en la función de los canales iónicos que llevan alteraciones fisiológicas importantes en diversos tejidos.

Se postula que los diferentes fenotipos asociados a defectos en el CACNA1A (cromosoma 19q13), surge de las consecuencias funcionales características de los diferentes tipos de defectos genéticos y los requerimientos varios de la corriente tipo P/Q en diferentes poblaciones neuronales. La correlación entre genotipo y fenotipo de estos trastornos alélicos han llevado a la propuesta de que la gravedad clínica, que proporcionalmente aumenta con la lesión molecular del CACNA1A (mutación sin sentido, truncamiento, expansión CAG), resulta en un espectro clínico proporcional de la mutación (Rosich, 2008). La canalopatías ligadas a las mutaciones de los canales tipo P/Q son la ataxia episódica tipo 2, la espinocerebelosa tipo 6 y la migraña hemipléjica familiar y la epilepsia generalizada idiopática (Figura 8) (Mckeow et al., 2006).

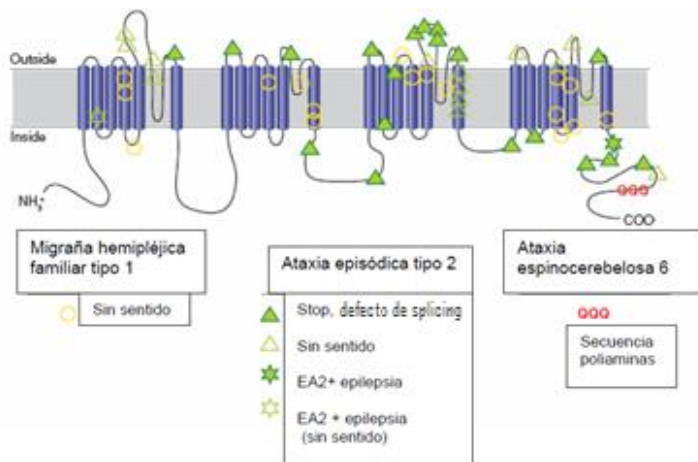


Figura 8. Trastornos alélicos del canal de calcio tipo P/Q. Diagrama de la estructura del Ca_v2.1, mostrando la localización relativa de las mutaciones asociadas con la migraña hemipléjica familiar tipo 1, ataxia episódica tipo 2 y la ataxia espinocerebelosa tipo 6. (Modificado de Cannon, 2007).

II. ANTECEDENTES

Los estudios que se han venido realizando sobre la clonación de los canales de Ca^{2+} han permitido ampliar el conocimiento de su estructura así como de su función, llevando con esto a conocer cuáles son algunas de las regiones que influyen en la regulación de canal. Las secuencias individuales de las subunidades α_1 comparten en la mayoría más homología en los dominios transmembranales, mientras que la divergencia de secuencia se produce en las regiones citoplasmáticas del canal. Por ejemplo, los canales sensibles a las dihidropiridinas (tipo C, D, F y S) tienen relativamente corta (~130 aminoácidos) el asa que une el dominio II y III, mientras que la región análoga en los canales tipo P/Q y N es significativamente más grande (~430 aminoácidos). Sin embargo, a pesar de la similitud de tamaño entre las asas, las clonas de los canales A y B muestran poca homología de secuencia en esta región (Snutch, 1992).

No sólo se pueden presentar diferencias entre las secuencias de los miembros que conforman los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en un organismo, si no también se pueden hallar entre los distintos organismos que conforman los cordados u otros grupos. Tal es el caso de la clonación de una subunidad α_1 de los CCDV en la medusa *Cyanea capillata*, utilizando oligonucleótidos degenerados en zonas conservadas para la clonación (Jeziorski et al., 1998), quienes encontraron que $\text{CyCa}\alpha_1$ era más similar a los canales de los vertebrados tipo L con un 60%. Las diferencias en la secuencia se encontraron principalmente en el asa entre los dominios II y III y en el extremo COOH terminal. Las diferencias funcionales fueron un aumento en la corriente de Ca^{2+} , una sensibilidad menor a los antagonistas 1,4-dihidropiridinas y fenilalquilamina, además una permeabilidad menor del canal al Ba^{2+} en comparación al Ca^{2+} y una mayor permeabilidad al Sr^{2+} . Este canal podría ser uno de los primeros ejemplos de los CCDV neuromusculares representando una subunidad ancestral del tipo L.

Por otro lado, se ha reportado que la transmisión neuromuscular en los mamíferos está mediada por la liberación de neurotransmisores dependientes de calcio por los canales P/Q (Uchitel et al., 1992), en lagarto por los tipo L (Lindgren y Moore, 1989) y en rana se lleva a cabo por canales tipo N, basado en la sensibilidad farmacológica por ω -conotoxina-GVIA

(Katz et al., 1995). Sin embargo, en el pez cebra (*Danio rerio*), Wen y colaboradores (2013) reportaron que la transmisión neuromuscular era sensible a ω -conotoxina-GVIA, pero al clonar una línea mutante de la motilidad, que exhibe una reducción grande de la transmisión sináptica sincrónica, identificó la mutación en un canal tipo P/Q en lugar de un canal tipo N, y mediante técnicas de inmunohistoquímica no se detectó ningún canal tipo N. Consecuentemente, atribuyó estos resultados a la farmacología mixta en el pez cebra, que sólo se limita a vertebrados no mamíferos y que probablemente representa una divergencia temprana entre los canales N y P/Q, así como poner en duda los canales tipo N encontrados en rana.

Por lo tanto, aunque en la regulación de la transmisión neuromuscular se han encontrado diferencias en los canales de Ca^{2+} que están involucrados en el fenómeno, no se sabe si esto se presenta en otras sinapsis entre distintos grupos de organismos. En el caso de la tortuga presenta una distinción importante ya que no se ha presentado un cambio relevante en cuanto a su evolución desde el triásico hace 267.9 millones de años y se han encontrado similitudes con el grupo de las aves en el desarrollo embrionario (Wang et al., 2013).

En tortuga adulta, de los canales de Ca^{2+} tipo T se ha clonado una parte de la isoforma $Ca_v3.1$, que es la predominante en la médula espinal, aunque no se descarta la presencia de las isoformas $Ca_v3.2$ y 3.3 , ya que los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados en base a la secuencia de mamífero y tal vez no hubo hibridación. Al realizar un alineamiento de secuencias múltiples se reveló una identidad global $>90\%$ entre diferentes especies. La segunda línea de evidencia experimental fue con el uso de anticuerpos específicos para $Ca_v3.1$ que fueron diseñados en base a un epítipo de mamífero (Canto- Bustos, 2014).

En cambio, para los canales Ca_v2 no se ha clonado alguna isoforma en alguna especie de tortuga que nosotros sepamos, pero se ha sugerido recientemente su uso como modelo de estudio de la fisiología y la filogenia de los ganglios basales, estructuras esenciales en el control motor. El análisis de la regulación de la liberación del neurotransmisor en la sinapsis cortico-estriatal muestra que los canales involucrados, definidos por el uso de bloqueadores específicos, son los canales tipo P/Q y N, mientras que el agonista de los receptores $GABA_B$, bacoflen, modula negativamente la liberación del glutamato en esa sinapsis (Sanchez-Mejorada et al., 2009), similar a lo descrito en rata (Barral et al., 2000).

Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en la rata, en la tortuga el canal modulado por la acción del baclofen es el canal tipo N en lugar del tipo P/Q.

En la médula espinal de la tortuga se ha mostrado también mediante el uso de bloqueadores específicos, la presencia de los canales P/Q y N en la sinapsis de motoneuronas inervadas por las fibras provenientes del funículo dorsolateral (Castro et al., 2007). Y de igual forma con los datos descritos para la sinapsis corticoestriatal, los canales tipo N son modulados negativamente por el agonista de los receptores GABA_B, baclofen, a través de un mecanismo dependiente de la activación de proteínas G triméricas, aunque en este caso el efecto del baclofen afecta sólo aproximadamente el 50% de la población de los canales identificados como tipo N por su bloqueador específico. Estas diferencias pueden ser el resultado de las distintas preparaciones en los estudios o bien de los protocolos empleados en cada caso (Sánchez-Mejorada et al., 2009). Además, en la preparación de la médula espinal, la actividad sináptica residual (20%) después del bloqueo de los canales P/Q y N puede ser eliminada por el uso de la toxina SNX-482, un bloqueador específico de canales tipo R (Castro et al., 2009). La identidad del canal fue corroborada en este caso con el uso de anticuerpos específicos para canales tipo Ca_v2.3 (aunque desarrollados con un epítipo de mamíferos) y con la amplificación del ADN por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La modulación distinta de la actividad de los canales tipo N y P/Q en la tortuga con respecto a la rata no puede ser comprobada por su expresión heteróloga, por ejemplo, debido a la falta de las secuencias codificantes de estos canales en la tortuga. Los estudios de caracterización molecular, funcional y farmacológica de los CCDV en los vertebrados se han realizado principalmente en mamíferos y peces, y en una menor escala en el resto de los grupos que conforman los cordados como lo son las aves, anfibios y reptiles. Como se puede observar en la tortuga, aunque sea un modelo de estudio utilizado con frecuencia en las neurociencias y otras áreas, por las ventajas de una vida media mayor en las preparaciones de sus tejidos, los estudios que las emplean asumen que las propiedades biofísicas de los canales, si no son las mismas, son muy parecidas a las descritas en grupos mejor conocidos, como por ejemplo los mamíferos y los peces, lo cual no necesariamente debe ser cierto, como se pudo observar en los trabajos mencionados anteriormente en el

caso del canal tipo P/Q, por lo cual es importante utilizar la información de la secuencia en lugar de la pura farmacología para asignar las isoformas de los canales de Ca^{2+} responsables de mediar la liberación de neurotransmisores en una sinapsis en particular.

Además, otro factor que justifica la caracterización de los canales es la cada vez más creciente asociación entre algunas patologías y los defectos de expresión y el funcionamiento de estas proteínas, las denominadas canalopatías de los canales de Ca^{2+} , que han sido identificados en los humanos recientemente.

III. HIPÓTESIS

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje $\text{Ca}_v2.1$ (P/Q) presentes en el tejido nervioso de los mamíferos, también están en el de la tortuga, pero presentan características estructurales diferentes que los hace útiles para entender la diversificación de las funciones que este grupo de proteínas tiene en el sistema nervioso de los vertebrados.

IV. OBJETIVOS

1. GENERAL

Clonar el extremo 3' del canal de calcio dependiente de voltaje tipo P/Q (α_{1A}) a partir del cerebro de la tortuga *Trachemys scripta elegans*.

2. PARTICULARES

Diseñar oligonucleótidos específicos para cada una de las isoformas de los CCDV de la subfamilia Ca_v2 en *T. scripta*.

Amplificar los extremos 3' de los canales de calcio dependiente de voltaje para las isoformas $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v2.2$ y $\text{Ca}_v2.3$, mediante la técnica de amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE).

Clonar los productos de PCR de cada una de las isoformas en cepas bacterianas competentes *E. coli* y caracterizar por análisis de restricción los plásmidos aislados de las células transformantes.

Obtener las secuencias de los amplificadores clonados para determinar por su similitud y análisis de restricción, a qué isoformas corresponden.

V. MÉTODOS

1. EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DEL CEREBRO.

Las tortugas que se emplearon, mantenidas en el Laboratorio de Herpetología de la FES Izatacala, fueron adultas, sin distinción de sexo y cuyo plastrón presentara de 15-20 cm de longitud. Los animales fueron anestesiados con una dosis de 100 mg/kg de pentorbabital sódico inyectado con una jeringa por vía intraperitoneal a través del tejido suave que se encuentra entre las extremidades traseras del plastrón (González et al., 2013). Una vez logrado el grado adecuado de anestesia, los animales se decapitaron rápidamente y enseguida el cerebro se removió del cráneo. El ARN total del cerebro se purificó mediante el empleo del reactivo TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA), el cual es una modificación de la técnica de Chomczynski (1987), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para eliminar los contaminantes residuales de ADN genómico el purificado se trató con 2 U/100 µL de ADNasa I libre de ARNasa (New England Biolabs, Ipswich, MA), seguida de una precipitación con etanol. Para determinar la concentración y el grado de pureza del ARN se midió su absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro de luz UV.

2. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS

Anteriormente ya se habían obtenido clonas parciales (Hernández-Sánchez y col., datos no publicados) de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de los tipos P/Q (α_{1A}), N (α_{1B}) y R (α_{1E}). Debido a esto el diseño de oligonucleótidos específicos en sentido se realizó con base a estas clonas, cuya secuencia consenso se puede ver en la Figura 9 para el caso del tipo P/Q. El programa que se utilizó para el diseño de los oligonucleótidos fue el Clone manager (Sci-Ed Software, Denver, CO). Se diseñaron dos oligonucleótidos para cada una de las isoformas; el primero se nombró Tse_A1x_f1 siendo x los canales tipo A, B o E (Tabla 1); el segundo oligonucleótido se diseñó más hacia el 3' con respecto al primero, para poder realizar una PCR semianidada posteriormente, este se nombró Tse_A1x_f2

(Tabla 1). El diseño de oligonucleótidos se realizó con las siguientes especificaciones: un contenido de GC del 50-60%; se evitaron las secuencias complementarias a sí mismas; el par de oligonucleótidos de una misma isoforma no debía presentar complementariedad entre oligonucleótidos; una temperatura de fusión (T_m) de 55 °C; y el oligonucleótido no se debía unir a otro sitio en el molde.

```

1  tgattgccat gctcttcttc atctacgcca tcatcggcat gcaggtgttc 50
51  ggtaacattg gcatcgaaga cgaagaggag gactcggcta tccagaacac 100
101 aacaacttcc gcaccttctt ccaggcctc atgcttctgt ttaggagcgc 150
151 cactggtgag gcctggcacg agatcatgct ggctgtctg agcgggaaac 200
201 cctgcgacga gaactcaggc atcaaggagc acgagtgtgg caacgagttc 250
251 gcctatTTTT attttgtctc cttcattttc ctctgctcct tcctgatgct 300
301 gaacctcttt gtggccgtca tcatggacaa ctttgagtac ctgaccgc 348

```

Figura 9. Secuencia de la clona parcial del canal de calcio tipo P/Q (Hernández-Sánchez y col., datos no publicados). En rojo se marca la secuencia del oligonucleótido Tse_A1A_f1 y en rosa la secuencia del oligonucleótido Tse_A1A_f2.

Tabla 1. Secuencia de los oligonucleótidos para amplificar los extremos 3' de los ADNc de los CCDV Cav2 de la tortuga.

Nombre	Secuencia	Nombre	Secuencia
Tse_A1A_f1	GACTCGGCTATCACAGAAC	Tse_A1A_f2	ATGCTTCTGTTTAGGAG
Tse_A1B_f1	GCTGTCCTGCCTCAGTAAC	Tse_A1B_f2	AACGAATGTGGCAGTGAC
Tse_A1E_f1	GCCACATTAACCGTCACAAC	Tse_A1E_f2	ATGCCTGCAAGGCAAAG

Los oligonucleótidos se recibieron liofilizados, se re-suspendieron cada uno en 250 μ l de regulador TE 1 \times (Tris-Hcl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y se determinaron sus concentraciones posteriormente con su absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro. En seguida se prepararon alícuotas de trabajo de 30 μ l las cuales contenían una concentración final de 10 μ M del oligonucleótido.

3. TRANSCRIPCIÓN REVERSA ACOPLADA A LA AMPLIFICACIÓN DE ADN POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.

El ADNc de la tortuga se sintetizó a partir del ARN total del cerebro en la presencia de la transcriptasa reversa ProtoScript II (New England Biolabs, Ipswich, MA) en reacciones con volúmenes finales de 20 μ l. Inicialmente 3 μ g de ARN total del cerebro de la tortuga se mezclaron con el oligonucleótido linker-dT (CCTAGGTCGACCGGTGATGAATTC(T)₁₈, concentración final 5 μ M), dNTPs (concentración final 0.5 mM cada uno) y agua libre de nucleasas. Esta mezcla inicial se incubó a 70 °C por 5 min y posteriormente se enfrió rápidamente a 4 °C. En seguida se añadió a la mezcla 4 μ l del regulador de reacción 5 \times , inhibidor placentario de ARNasa (RNasin, concentración final 1 U/ μ L), transcriptasa reversa ProtoScript II 200 U y DTT (concentración final 10 mM). Una vez hecha la mezcla se incubó a 42 °C por 1 h y a continuación a 80 °C por 5 min para inactivar la enzima. Después se diluyó con agua hasta un volumen de 100 μ l y se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

Tabla 2. Composición de la mezcla de reacción de la síntesis del ADNc a partir del ARN del cerebro de tortuga.

Componentes	Volumen	Componentes	Volumen
H ₂ O	3.3 μ l	Regulador RT (5 \times)	4 μ l
ARN tortuga (3 μ g)	4.7 μ l	DTT 0.1 M	2 μ l
linker-dT (50 μ M)	2 μ l	Proto Script II RT (200 U/ μ l)	1 μ l
dNTPs (10 mM c/u)	1 μ l	RNasin (20 U/ μ l)	1 μ l

Posteriormente, el oligonucleótido específico Tse_A1x_f1 (Tabla 1) se empleó para realizar amplificaciones basadas en las técnicas de RACE (amplificación rápida de los extremos de ADNc) (Frohman et al., 1988) para poder completar la clonación del extremo 3' de la subunidad α_{1A} , y para obtener una mayor especificidad del amplificado y cantidad de este se realizó una PCR semianidada con el oligonucleótido Tse_A1x_f2 (Tabla 1). Para este fin

se empleó la ADN polimerasa de alta fidelidad Q5 (New England Biolabs, Ipswich, MA). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 μl utilizando en la mezcla: regulador de reacción 1 \times , dNTPs 0.2 mM cada uno, ADN polimerasa Q5 0.5 U, oligonucleótidos en sentido y antisentido 0.4 μM cada uno y 4 μl del ADNc del cerebro de tortuga. En la primera amplificación se utilizaron los oligonucleótidos Tse_A1x_f1 (sentido) y linker (CCTAGGTCGACCGGTGATGAATTC, antisentido).

Para las reacciones de PCR semianidadas se utilizaron los mismos componentes que en la primera reacción en un volumen de 25 μl . Los cambios que presentó esta reacción fueron: el molde que se utilizó fue 2 μl de la primera amplificación por PCR y los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar fueron Tse_A1x_f2 en sentido y el linker en antisentido. El volumen restante en ambas reacciones se ajustó con agua libre de nucleasas.

Tabla 3. Composición de la mezcla de reacción de PCR

Componentes- PCR RACE 3'	Volumen	Componentes- PCR semianidada	Volumen
H₂O	13.25 μl	H₂O	15.25 μl
Regulador 5\times	5 μl	Regulador 5\times	5 μl
dNTPs (10 mM c/u)	0.5 μl	dNTPs (10 mM c/u)	0.5 μl
Tse_A1x_f1 (10 μM)	1 μl	Tse_A1x_f2 (10 μM)	1 μl
Linker (10 μM)	1 μl	Linker (10 μM)	1 μl
ADNc cerebro de tortuga	4 μl	Primera PCR	2 μl
Q5 ADNpol 2 U/μl	0.25 μl	Q5 ADNpol 2 U/μl	0.25 μl

Las reacciones se incubaron en un termociclador (Veriti® 96-Well Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific) bajo los siguientes ciclos: i) 95 °C/2 min; II) 95 °C/30 s; 55 °C/30 s; 72 °C/90 s; 35 ciclos; y III) 72 °C/ 5 min. Para las PCR semianidadas las condiciones fueron las mismas, sólo que el número de ciclos se disminuyó a 25. La longitud esperada de cada fragmento corresponde al número de nucleótidos existentes entre ambos oligonucleótidos posicionados en la hebra del ADN en los sitios correspondientes.

Los amplicones se identificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.

Se disolvió agarosa a una concentración del 1% en regulador TBE 0.75× calentando en un horno de microondas hasta su completa disolución. Se dejó enfriar hasta una temperatura aproximada de 40 °C y se le agregó una solución de bromuro de etidio (BrEt) en una concentración final de 0.25 µg/ml para la tinción del ADN. Consecutivamente la solución se vació sobre un molde con un peine formador de pozos. Una vez polimerizado el gel, se transfirió a una cámara de electroforesis y se le agregó regulador TBE 0.75×. Las muestras de ADN se mezclaron con regulador de carga 6× (30% glicerol, 0.25% azul de bromofenol y 0.25% de xilén-cianol) y se cargaron dentro de los pozos. La separación de los fragmentos del ADN se realizó a voltaje constante (75 V) por aproximadamente 70 min.

El ADN se detectó en el gel utilizando un transiluminador de luz ultravioleta Gel Doc™ EZ (BioRad, Hercules, CA) con un tiempo de exposición de 0.2 s. Las imágenes fueron procesadas mediante el software Image lab (BioRad, Hercules, CA).

5. PURIFICACIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO DEL ADN_c DE TORTUGA

Una vez que se verificó la presencia de amplicones del tamaño apropiado (1,500 pb aproximadamente), éstos se purificaron del gel mediante el uso de “kit” GeneJET™ Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). La banda de interés se cortó del gel con una hoja de bisturí, se pesó y se mezcló con un volumen igual de regulador de captura con alta composición de sales. Después de disolver la agarosa por incubación a 60 °C se transfirió a un dispositivo que contiene la columna de silica-gel acoplado a un microtubo para la recolección del líquido que pasa a través de la misma. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min y se descartó el líquido recolectado. Se añadieron 750 µl de regulador de lavado (que contiene etanol) al dispositivo y se centrifugó nuevamente descartando el líquido en el tubo

de recolección. Para eluir se transfirió el dispositivo a un microtubo estéril y se añadieron 30 μ l de regulador de elución (Tris-Hcl 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8.0) y se centrifugó por 1 min. Los purificados se guardaron a -20°C hasta su posterior uso.

6. LIGACIÓN DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO DEL ADNc DE TORTUGA Y EL VECTOR PJET 1.2

Una vez purificados los fragmentos de ADN amplificados por PCR se ligaron al vector pJet1.2 (Thermoscientific-Fermentas). El vector pJet1.2 posee extremos romos y presenta el gen letal Eco471R para selección positiva mediante la inactivación de este gen al insertarse el fragmento amplificado evitando con ello su expresión. Las reacciones de ligación se prepararon utilizando las cantidades necesarias de cada muestra para tener relaciones molares de inserto:vector 3:1. La reacción se realizó en un volumen de 20 μ l la cual contenía: 2 μ l del regulador para ligasa del fago T4 (10 \times), 1 μ l de pJet1.2 (50 ng/ μ l), 16 μ l del ADN amplificado por PCR y purificado y 0.5 μ l de T4 ADN ligasa (5 U/ μ l). Posteriormente la reacción se incubó a temperatura ambiente por 30 min.

7. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Las células competentes de *Escherichia coli* DH5- α fueron utilizadas para amplificar los ADNs plasmídicos. En un microtubo el ADN resultante de la ligación fue mezclado con las células competentes, el tubo fue agitado suavemente para mezclar bien y se colocó en hielo durante 30 min. Posteriormente, la mezcla anterior fue expuesta a un choque térmico colocando los tubos en un baño de agua a 42°C por 30 s, lo cual permite al ADN entrar eficientemente en las células. Las células fueron crecidas en un medio no selectivo (se agregaron 250 μ l de medio LB (2% triptona, 1% extracto de levadura, 1% NaCl y 2% agar) y se incubaron los tubos a $37^{\circ}\text{C}/1$ h a 350 rpm para permitir la síntesis de las proteínas de resistencia al antibiótico codificadas en el plásmido), entonces las células fueron sembradas

en placas de medio LB que incluyó 100 µg/ml de ampicilina, para posteriormente incubarlas a 37 °C por 12-16 h.

8. PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

La amplificación del ADN plasmídico recombinante de interés se llevó a cabo por las células de *E. coli*. Al incubar las bacterias transformadas con el ADN de interés, estas se dividen y a la vez replican el plásmido recombinante. Posteriormente, es posible extraer el ADN plasmídico y así obtener cantidades de este para su posterior análisis y uso.

Para purificar el ADN plasmídico se seleccionaron colonias de bacterias aisladas de los cultivos obtenidos de la transformación, fueron inoculadas en medio LB suplementado con 100 µg/ml de ampicilina e incubadas toda una noche (12-16 h) a 37 °C a 200 rpm. Las células se recuperaron por centrifugación a 13,000 rpm por un minuto. El ADN plasmídico se purificó por miniprep alcalina (Engebrecht et al., 2001). El paquete celular se resuspendió en 100 µl de GTE (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-HCl a un pH 8.0 y 10 mM EDTA) con ayuda de un agitador vortex, posteriormente se agregaron 200 µl de NaOH-SDS (0.2N de NaOH y 1% p/v de SDS), se mezcló por inversión y se incubó a 4 °C por 5 min; en seguida se agregaron 150 µl de acetato de potasio (pH de 4.8), se mezcló por inversión y se incubó por 5 min a 4 °C; se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregaron 900 µl de etanol al 95%, se mezcló con un agitador vortex y se incubó por 10 min a 4 °C, se centrifugó por 20 min a 13,000 rpm, se retiró el sobrenadante y se agregaron 600 µl de etanol al 70% para lavar la pastilla y se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm; se decantó el etanol cuidadosamente para evitar perder la pastilla de ADN, se dejó secar por aproximadamente 10 min y una vez seca la pastilla se resuspendió en 30 µl de regulador de elución con ARNasa (50 µg/ml).

9. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN

Los análisis de restricción se basaron primero en verificar el tamaño del fragmento que se insertó en el vector pJet1.2. Para ello se utilizaron enzimas como la BglIII (presenta dos sitios en los extremos de la zona de clonación) y XhoI en conjunto con XbaI (estas enzimas se utilizaron juntas ya que cada una tiene un sitio de restricción en el vector, también a ambos lados del sitio de clonación). Se realizaron análisis para las 3 isoformas de los canales tipo P/Q, N y R; las enzimas que se utilizaron fueron SacI y XmaI para los P/Q, para el caso del tipo N se utilizó HindIII y por último para el tipo R se utilizó la enzima EcoRV. Las enzimas de restricción fueron usadas siguiendo las recomendaciones de los proveedores. Cada enzima tiene unas condiciones óptimas de funcionamiento, en cuanto a temperatura y tiempo de digestión, concentración de sales y condición de pH (estas dos últimas características las proporciona el amortiguador). Una digestión típica contenía en un volumen de 10 µl: agua, regulador 1×, enzima(s) 3-4 U y ADN 100-200 ng.

10. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS FRAGMENTOS SELECCIONADOS.

Se seleccionaron los plásmidos para secuenciar por los análisis de restricción. La secuenciación se llevó a cabo por el método de terminación de la cadena (Sanger et al., 1997), con nucleótidos acoplados a fluoróforos, en la Unidad de Secuenciación del Laboratorio de Biología Molecular de la FES Iztacala. A las muestras previamente purificadas se les determinó la concentración de ADN. Se tomaron alícuotas de las clonaciones y se secuenciaron; se utilizaron los oligonucleótidos específicos en sentido pJet Forward (CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC) y en antisentido pJet Reverse (AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG). Las secuencias nucleotídicas y las deducidas de aminoácidos obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en bases de datos como el GenBank utilizando el algoritmo BLASTx disponible en internet (Altschul et al., 1990). Este algoritmo busca y compara en la base de datos del GenBank secuencias de aminoácidos deducidos a partir de una de nucleótidos que se envían.

VI. RESULTADOS

1. VERIFICACIÓN DEL ADNC DE LA RT-PCR

Para intentar la clonación del extremo 3' de los canales tipo P/Q, N y R, inicialmente se verificó que la retrotranscripción hubiese alcanzado la región en la cual hibridan los oligonucleótidos específicos Tse_A1x_f1 y f2 (Figura 10). Para esto se realizó una amplificación por PCR con los oligonucleótidos degenerados cacnf1 y cacnr2, en sentido y antisentido, respectivamente (Tabla 4), los cuales habían sido usados previamente para amplificar el fragmento a partir del cual se diseñaron los oligonucleótidos específicos (Hernández-Sánchez y col., datos no publicados). Una vez finalizada la PCR, por electroforesis en gel de agarosa se verificó la longitud de los fragmentos; ésta debía presentar un tamaño de 350 pb aproximadamente. Como se muestra en la Figura 11, los tamaños de los fragmentos obtenidos con cacnf1-cacnr2 corresponden al tamaño esperado tanto en la tortuga (carril 2), así como en la rata (carril 3), que en este caso se utilizó como control positivo para comparar el tamaño, ya que este fragmento se sabe que está conservado en varias especies, mientras en el caso del control negativo no se añadió molde (RT-PCR) por lo tanto no presentó amplificación (carril 1).

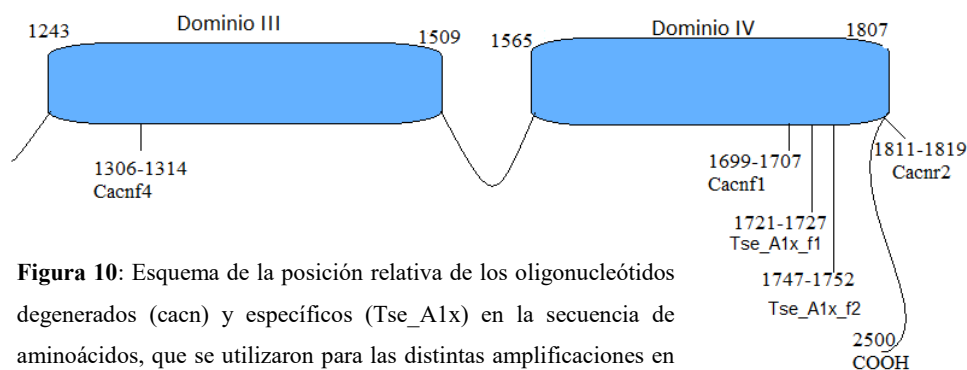


Figura 10: Esquema de la posición relativa de los oligonucleótidos degenerados (cacn) y específicos (Tse_A1x) en la secuencia de aminoácidos, que se utilizaron para las distintas amplificaciones en el extremo 3' de los canales de calcio dependientes del voltaje en tortuga.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados, degenerados y específicos.

Nombre	Secuencia 5'→3'
cacnr2	CCGGGTCAGGTAAGTCTCGAARTTRTCCAT
cacnf1	TGATCGCCATGCTGTTCTTYATHAYGC
cacnf4	CGATGCAGGCCCGCTCRTTYTTYTC
Tse_A1A_f3	TGATTGCCATGCTCTTCTTCATCTACGC
Tse_A1B_f3	TCATTGCGATGCTCTTCTTCATCTATGC
Tse_A1E_f3	TGATCGCTATGCTTTTCTTCATATATGC
pJet Forward	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJet Reverse	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
linker	CCTAGGTCGACCGGTGATGAATTC

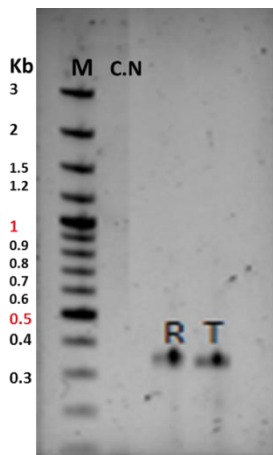


Figura 11. Amplicones obtenidos por RT-PCR a partir del ARN total obtenido de los cerebros de la rata y la tortuga, empleando oligonucleótidos degenerados (cacnf1 y cacnr2). Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con EtBr. El tamaño esperado es de 350 pb aproximadamente. (M) marcador de peso molecular para ADN de 100 pb. (C.N) control negativo, no se le agregó ADNc ni de rata ni de tortuga. (R) rata, *Rattus norvegicus*; (T) tortuga, *T. scripta elegans*.

2. CLONACIÓN DE LOS EXTREMOS 3' DE LOS CCDV DE LA TORTUGA POR RACE

Una vez que se comprobó la transcripción reversa del extremo 3' del ADNc del cerebro de tortuga, se llevó a cabo la primera amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos Tse_A1x_f1 (Tabla 1) para cada una de las isoformas A, B y E y el linker, que hibrida en el extremo 3' de todas las isoformas, como oligonucleótido común en antisentido; posteriormente las muestras se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El tamaño esperado para estos amplicones era de ~2 kpb ya que el COOH terminal de la subunidad α_1 en la familia Ca_v2 consta en promedio de 690 aa (2,000 pb aproximadamente), y como se puede ver en la Figura 12A en los carriles 2, 4 y 6 se

presenta este tamaño para las tres isoformas. Por tal motivo se realizó una segunda PCR (amplificación semianidada) (Dieffenbach y Dveksler, 2003) con los oligonucleótidos específicos Tse_A1x_f2 (Tabla 1), también para cada isoforma A, B y E, y el linker, esto con el fin de amplificar una mayor cantidad de la banda esperada. Como se observa en la Figura 12B, en los carriles 2, 4 y 6 se presenta una mayor cantidad de amplificado en la banda de ~1.5 kpb. Debido a que se presentaron estas características se procedió a purificar la banda y a clonar los fragmentos en el vector pJet1.2 para en seguida transformar bacterias competentes *E. coli*. Dado que no se contaba con información respecto a las secuencias clonadas, se empleó la enzima BglIII con lo cual se permitió liberar el inserto del plásmido y con ello se pudo seleccionar por tamaño a las clonas candidatas a ser analizadas por secuenciación. Al recibir los resultados de la secuenciación, nos percatamos que los amplicones clonados y amplificados no correspondían a los extremos 3' de las subunidades α_1 de los canales de calcio, y también que presentaba algunas irregularidades como colas de polidT en ambos sentidos del amplificado (Fig. 13 A y B).

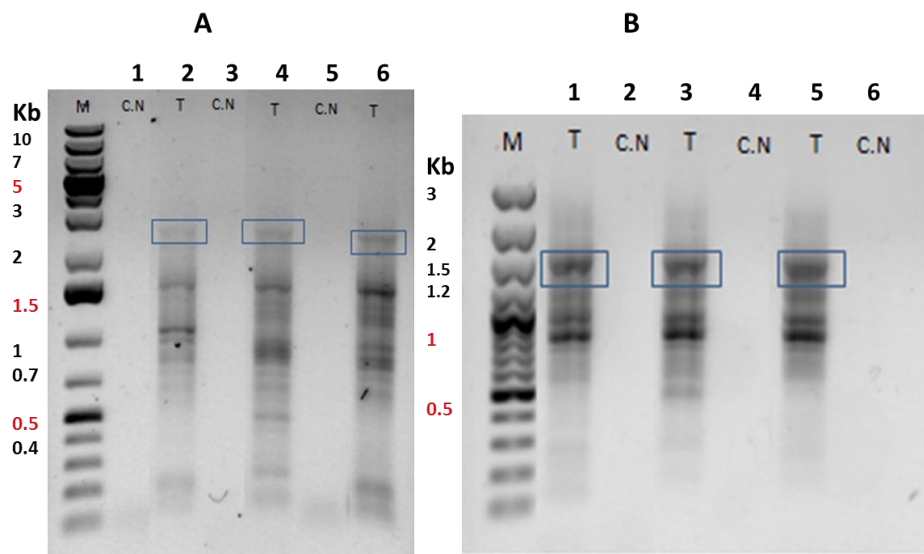


Figura 12. Amplificaciones por RT-PCR de los extremos 3' de las subunidades α_1 para las isoformas A, B y E de tortuga. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (teñido con bromuro de etidio). A) Primera PCR con los oligonucleótidos específicos Tse_a1a_f1 para cada isoforma, se observan bandas (recuadro azul) con un tamaño ~2 kpb para los canales tipo A (carril 2), B (carril 4) y E (carril 6). (M) marcador de peso molecular para ADN de 1 kpb. B) PCR semi-anidada con oligonucleótidos Tse_A1x_f2; el molde utilizado fue una alícuota de la primera PCR. Se observan bandas de ~1.5kb para cada isoforma A (carril 2), B (carril 4) y E (carril 6). (M) marcador de peso molecular para ADN de 100pb. (C.N) control negativo- sin ADNc de tortuga.

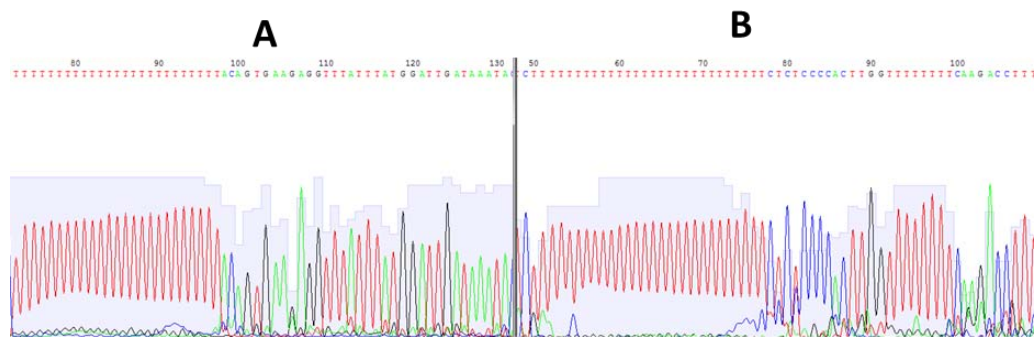


Figura 13. Electroferograma del fragmento amplificado del extremo 3' de la subunidad α_1 . En el panel A se puede ver la secuenciación del plásmido en sentido mientras en el B se encuentra la secuenciación en antisentido; en ambos casos se presentan colas de polidT y secuencias muy cortas en antisentido. Al realizar un Blast se encontró que no presentaban homología alguna con la subunidad α_1 de los CCDV.

3. CLONACIÓN DEL SEGMENTO CACNF4-CACNR2 DE LAS SUBUNIDADES α_1 DE LOS CCDV CA_{V2} DE LA TORTUGA, COMO ESTRATEGIA ALTERNATIVA PARA OBTENER MÁS INFORMACIÓN DE SUS SECUENCIAS.

La primera opción que se usó para amplificar con mayor eficiencia el extremo 3' fue el utilizar dimetilsulfóxido (DMSO), esto para aumentar la especificidad de la unión de los oligonucleótidos, pero aún en la amplificación por PCR semianidada se obtenía muy poco amplificado y no se podía determinar si era lo que se buscaba por falta de sitios de restricción.

Por lo tanto, otra estrategia fue obtener más información de la secuencia de los canales Cav2 en tortuga; para ello se utilizaron los oligonucleótidos degenerados nombrados cacnf4 y cacnr2 (Tabla 4). Utilizando estos oligonucleótidos se realizaron las amplificaciones por PCR teniendo como molde el ADNc del cerebro de la tortuga. Al término de la amplificación se procedió a cargar muestras de las reacciones en un gel de agarosa al 1% y teñirlas con EtBr. El tamaño esperado del fragmento era de ~1.5 kpb, lo que concuerda con

lo que se observa en el gel de la Figura 14 en el carril 2 (tortuga), mientras que en el carril 3 está lo amplificado a partir del ADNc del cerebro de rata, que se empleó como control positivo con fines de comparación.

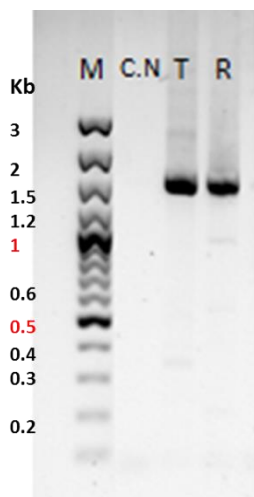


Figura 14. Amplicones obtenidos por RT-PCR a partir del ARN total del cerebro de la rata *R. norvegicus* (R) y tortuga *T. scripta elegans* (T), empleando oligonucleótidos degenerados (cacnf4 y cacnr2). Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con EtBr. (M) marcadores de peso molecular para ADN de 100 pb. (C.N) control negativo sin ADNc de tortuga *T. scripta o rata*. El tamaño esperado para ambos organismos era ~1,5 kpb, como se puede observar en el gel.

4. CARACTERIZACIÓN POR ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS CACNF4-CACNR2

Para la caracterización de los fragmentos cacnf4-cacnr2, se purificaron los amplificados, se clonaron en el vector pJet1.2 y se transformaron bacterias *E. coli* competentes. Primero se verificó que el tamaño del inserto dentro del plásmido fuera del tamaño esperado de ~1.5 kpb; para esto se realizó una digestión con XhoI y XbaI las cuales están en los extremos de los fragmentos clonados. Una vez verificado el tamaño, posteriormente se identificaron los plásmidos que contenían cada una de las isoformas por separado; dado que previamente se determinó la secuencia parcial de estas clonas (Hernández-Sánchez y col., datos no publicados), en el caso del tipo P/Q pudieron utilizarse las enzimas SacI y XmaI. Al término de la digestión se determinaron los tamaños de los fragmentos resultantes por electroforesis en gel de agarosa. En este caso se iban a generar 2 fragmentos: uno de ~1.47 kpb y otro de ~3 kpb del inserto y vector respectivamente. Como se puede apreciar en la Figura 15 (A y B), los plásmidos que presentaron las bandas de los tamaños esperados son los 2, 5, 6, 19, 20, 21, 22 y 23.

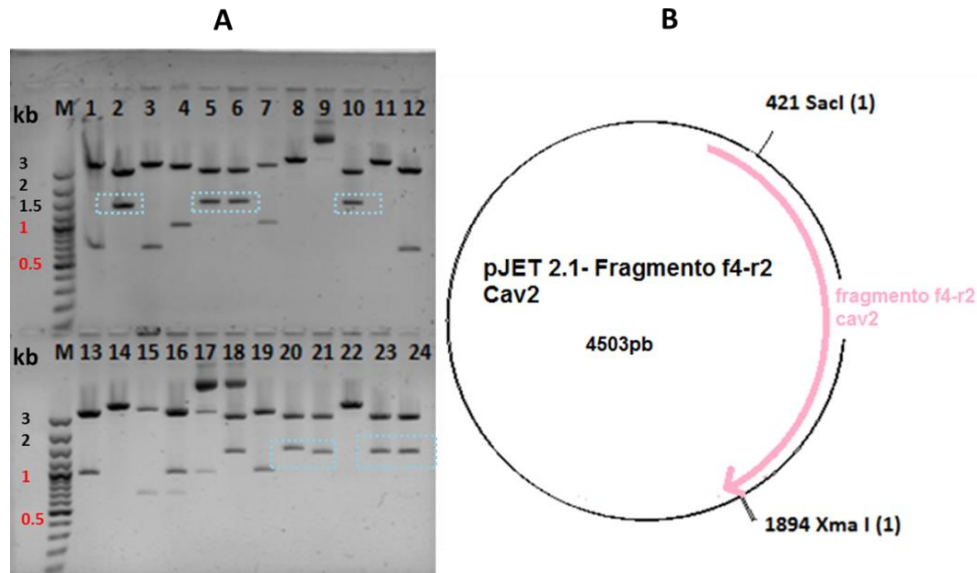


Figura 15. Caracterización del fragmento cacnf4-r2 con SacI y XmaI para la identificación de la isoforma P/Q. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio después de la digestión de los plásmidos purificados de las bacterias transformantes con los amplicones de los ADNc parciales de la subunidad α_1 de los CCDV de la tortuga. A) (M) marcador de peso molecular de ADN de 100pb. El fragmento resultante de esta digestión fue de ~ 1.47 kpb (inserto) y ~ 3 kpb (vector) las bandas que presentaron este patrón fueron la 2, 5, 6, 19 20, 21, 22 y 23. B) Mapa del vector con el inserto, señalando los sitios de restricción.

En el caso de la isoforma B ésta se caracterizó con la enzima HindIII y por electroforesis en gel de agarosa se verificaron los tamaños al término de la digestión. Debido, a que el vector pJet1.2 presenta extremos romos la clonación no es dirigida, provocando que los insertos se liguen en el vector en un sentido o en otro, por lo que en este caso si el fragmento se encontraba en sentido, el tamaño debía ser de 0.5 kpb que se puede observar en la Figura 16 (A y B) en los carriles 11, 12, 14, 17, 18 y 19, mientras que si el inserto se encontraba en antisentido presentaba un tamaño de 2 kpb como se puede ver en el carril 23.

Por último, la isoforma E se caracterizó con la enzima EcoRV y por electroforesis en gel de agarosa se verificó el tamaño al término de la digestión. Ya que el sitio para EcoRV sólo se encontraba en el fragmento amplificado cacnf4-r2 y no en el vector solo se podía encontrar el plásmido linealizado como se puede ver en la Figura 17 en los carriles 1,3, 12 y 15.

Una vez seleccionadas las colonias para cada una de las isoformas, se verificó que presentara la secuencia para dicha isoforma, para ello se solicitó una secuencia automatizada para cada uno de los plásmidos, obteniendo ahora un fragmento conocido más grande.

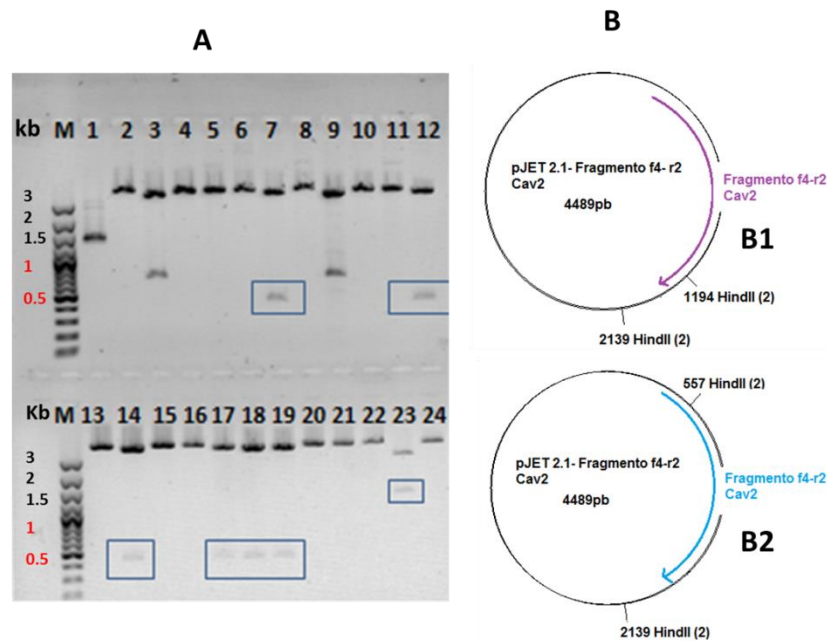


Figura 16. Caracterización del fragmento cacnf4-r2 con HindIII para identificar la isoforma α_{1B} . Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio de los plásmido pJET1.2 que contenían el fragmento cacnf4-r2 de las subunidades α_1 de los CCDV de la tortuga. A) (M) marcador de peso molecular de ADN de 100 pb. Los tamaños esperados cuando el fragmento está en sentido son de ~ 0.5 kpb (inserto) y ~ 4 kpb (vector). Este patrón se observa en las bandas 11, 12, 14, 17, 18 y 19. En el caso de encontrarse en antisentido los fragmentos presentaron un tamaño de ~ 2 kpb y ~ 3 kpb como se observa en el plásmido de la banda 23. B) Mapa del vector con el inserto, señalando el sitio de restricción para Hind III en sentido (B1) y antisentido (B2)

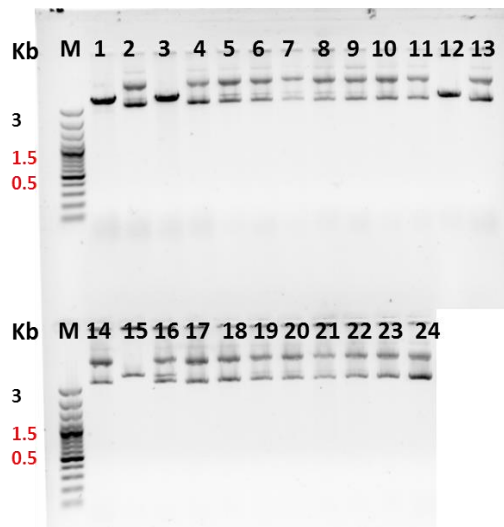


Figura 17. Caracterización del fragmento cacnf4-r2 con EcoRV para la identificación de la isoforma E. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio de los plásmido pJET1.2 que contenían el fragmento cacnf4-r2 de las subunidades α_1 de los CCDV de la tortuga. A) (M) marcador de peso molecular de ADN de 100pb. El fragmento resultante de esta digestión fue 4,490 pb ya que al presentarse solo un sitio para la enzima EcoRV se linealizó el plásmido, como se puede ver en los carriles 1, 3, 12 y 15.

5. AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 3' CON LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ESPECÍFICOS TSE_A1X_F3

Al conocer ahora parte de las secuencias de fragmentos de mayor longitud (~1500 pb), pudieron identificarse cuales eran las secuencias específicas de cada isoforma A, B y E en la que se unía el oligonucleótido degenerado cacnf1 con ello se solicitaron los oligonucleótidos específicos Tse_A1x_f3 (Tabla 4) para cada isoforma, como una alternativa ya que había demostrado que si se unían al dominio IV en el extremo 3' de la subunidad α_1 .

Por consiguiente, se llevó a cabo una amplificación por PCR con los oligonucleótidos específicos Tse_A1x_f3 y el linker (Tabla 4) como oligonucleótido en antisentido, y posteriormente se verificaron los tamaños por una electroforesis en gel de agarosa. Como se puede ver en la Figura 18A en los carriles 1, 5 y 7 correspondientes a la isoforma A, B y E, respectivamente, presentaron un tamaño ~1.7 kpb, que es el que se esperaba. Debido a esto se realizó una PCR semianidada con los oligonucleótidos específicos Tse_A1x_f1 (Tabla 1) que se utilizaron en un inicio y el linker. Teniendo como resultados tamaños similares a 1.7 kpb también en las tres isoformas (A, B y E), como se muestra en los carriles 1, 3 y 5 de la Figura 18B. En seguida la banda de 1.7 kpb se purificó del gel.

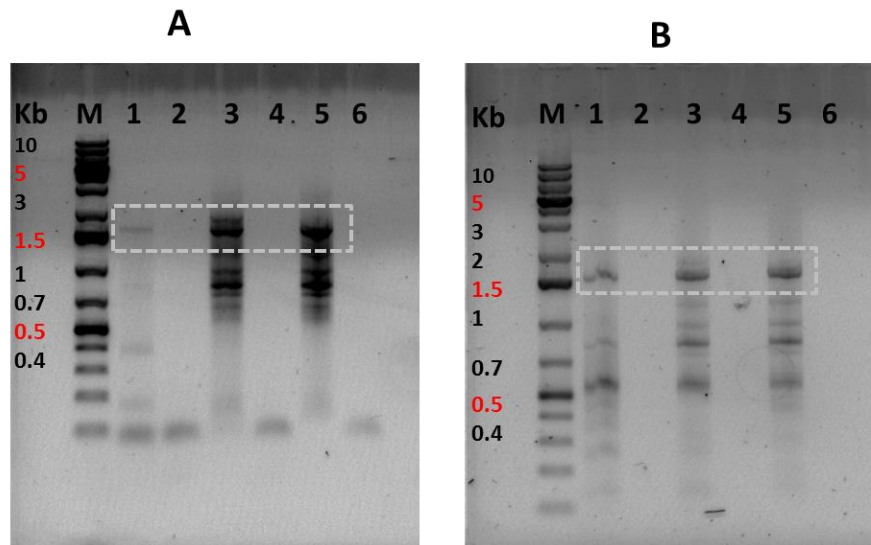


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (teñido con bromuro de etidio) de la amplificación por RT-PCR, de los extremos 3' de las subunidades α_1 para las isoformas A, B y E de tortuga. (M) marcadores de peso molecular para ADN de un 1Kpb. A) Primer PCR con los oligos Tse_a1a_f3 para cada una de las isoformas, los tamaños esperados para estos amplicones son de ~1.7 kpb. El carril 1 corresponde a la isoforma A, el 3 a la isoforma B y el 5 a la isoforma E, cada una con el tamaño esperado. Los carriles 2, 4 y 6 corresponden a los controles negativos. B) PCR semianidada con los oligonucleótidos Tse_A1x_f1, como molde el primer PCR. (M) Marcadores de peso molecular para ADN de un 1 kpb. Se puede observar la banda en el carril 1 para la isoforma A, en el 2 para la isoforma B y en el 5 para la isoforma E, con tamaños de ~1.7 kpb. Los carriles 2, 4 y 6 son los controles negativos.

Para corroborar si el fragmento amplificado era el extremo 3' de la subunidad α_1 en tortuga, se llevaron a cabo otras amplificaciones por PCR. En esta primera PCR se utilizaron los oligonucleótidos específicos Tse_A1x_f1 (Tabla 1) y el oligonucleótido degenerado cacnr2 (Tabla 4), y de molde se utilizó el fragmento purificado de la PCR semianidada. Los tamaños esperados para los fragmentos obtenidos con los oligonucleótidos Tse_A1x_f1-cacnr2 eran 270 pb para la isoforma A, 180 pb la isoforma B y 280 pb para la isoforma E. Como se muestra en la Figura 19, en los carriles 1-3 los tamaños esperados sí concuerdan con cada uno de los fragmentos amplificados para cada una de las isoformas. En la segunda PCR que se hizo de verificación se utilizaron los oligonucleótidos específicos Tse_A1x_f2 (Tabla 1) y el linker (Tabla 4), así como el fragmento purificado de la PCR semianidada como molde. El tamaño esperado en este caso

era de 1.7 kpb y como se puede confirmar en la Figura 20 corresponde al tamaño esperado en las tres isoformas.

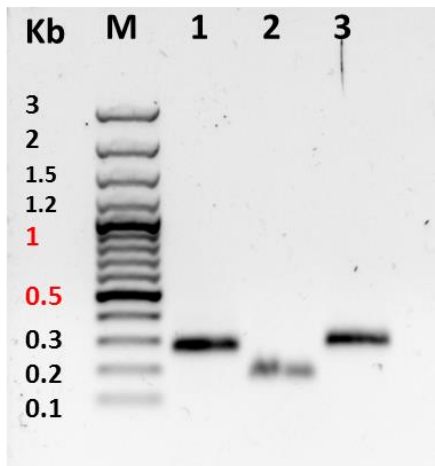


Figura 19. Análisis de la amplificación por PCR de los fragmentos purificados Tse_A1x_f1-linker. Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio al 1%. La amplificación se realizó para verificar si este fragmento es parte del extremo 3' de la subunidad α_1 . Para ello se utilizaron los oligonucleótidos específicos Tse_A1x_f1 en sentido para cada isoforma, mientras en antisentido se utilizó el oligonucleótido degenerado cacnr2. (M) Marcadores de peso molecular para ADN de 100 pb. (1) Fragmento correspondiente a la amplificación de la isoforma A con un tamaño esperado de 270 pb. (2) Fragmento correspondiente a la amplificación de la isoforma B con un tamaño de 180 pb. (3) Fragmento del amplificado de la isoforma E el tamaño esperado de 280 pb.

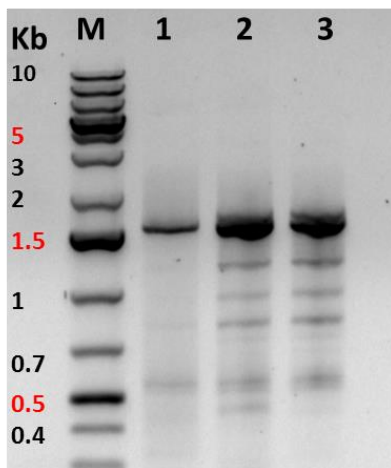


Figura 20. Análisis de la amplificación por PCR de los fragmentos purificados Tse_A1x_f1-linker. Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio al 1%. La amplificación se realizó para verificar si este fragmento es parte del extremo 3' de la subunidad α_1 . Para ello se utilizaron los oligonucleótidos específicos Tse_a1x_f2 en sentido para cada isoforma, mientras en antisentido se utilizó el linker. (M) Marcadores de peso molecular para ADN de 100 pb. Los tamaños esperados era de ~1.7 kpb. (1) Fragmento correspondiente a la amplificación de la isoforma A. (2) Fragmento correspondiente a la amplificación de la isoforma B. (3) Fragmento del amplificado de la isoforma E.

Por lo tanto, al confirmar que los purificados de la PCR semianidada sí eran parte del extremo 3' de la subunidad α_1 se procedió a clonarlos en el vector pJet1.2 y transformar con ellos bacterias *E.coli* competentes para cada una de las isoformas α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} . La alternativa en este caso al no conocer los sitios de restricción de las secuencias clonadas, fue realizar una amplificación por PCR de colonias para identificar las clonas que sí presentaban el inserto Tse_A1x_f1-linker y descartar a las que no. Para esto se utilizaron nuevamente los oligonucleótidos específicos Tse_A1x_f1 y el degenerado cacnr2; se escogieron 16 colonias para cada isoforma A, B y E; las condiciones de las mezclas de PCR fueron muy similares a las descritas en la metodología, salvo que la enzima que se utilizó

para la amplificación fue la *Taq* polimerasa. Al término de la amplificación se analizaron las reacciones mediante electroforesis en gel de agarosa. De las 48 colonias, sólo se amplificó en 4 de ellas, como se puede ver en la Figura 21 donde se muestran las primeras 24 colonias, y en los carriles 1 (colonia 4) y 2 (colonia 6) con un tamaño de 270 pb se muestra el amplificado que pertenecen a la isoforma A (P/Q), mientras que para las isoformas B y E no hubo amplificados.

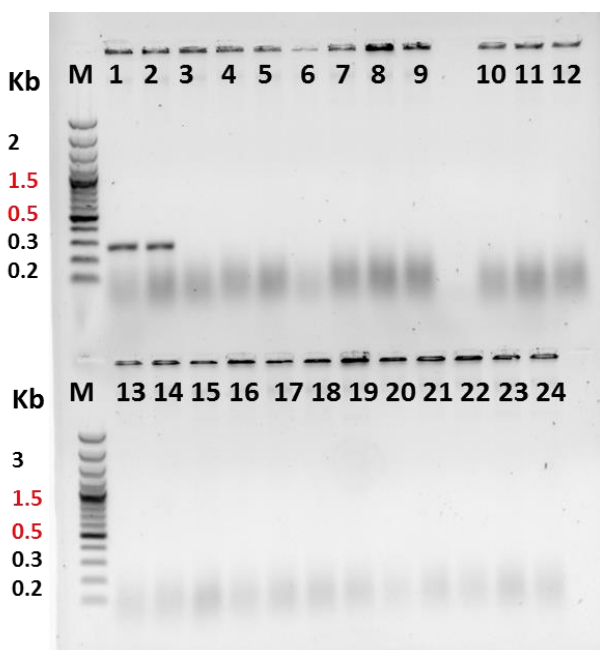


Figura 21. Amplicones obtenidos por amplificación por la PCR de colonias para identificar los plásmidos que presentaban el fragmento del extremo 3' (Tse_A1x_f1-linker) de la subunidad α_1 . Para ello se utilizaron los oligonucleótidos específicos Tse_A1x_f1 para cada una de las isoformas y el oligonucleótido degenerado cacnr2. Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con EtBr. (M) marcadores de peso molecular para ADN de 100pb. (1-8) Plásmidos con el fragmento del amplificado de la isoforma A. (9-16) Plásmidos con el fragmento del amplificado de la isoforma B. (17-24) Plásmidos con el fragmento del amplificado de la isoforma E. En las únicas bandas que se observa un amplificado es en la 1 (colonia 4) y 2 (colonia 6) que pertenecen a la isoforma A con un tamaño de 270 pb, mientras que en las isoformas B y E ningún plásmido amplificó.

En seguida se procedió a purificar los plásmidos a partir de estas 4 colonias de las isoforma A, y el tamaño del inserto se verificó en este caso con la enzima *Bgl*III; los resultados obtenidos se muestran en la figura 20. El tamaño predicho del inserto era de ~ 1.7 kpb, pero como se puede observar los tamaños obtenidos no concuerdan, ya que los fragmentos presentaron longitudes < 600 pb, y en el caso de la clona 10 (banda 4) incluso había dos fragmentos, uno de ~ 550 pb y otro de ~ 490 pb. Debido a que no se sabía si en el amplificado se encontraba un sitio para *Bgl*III que pudiera haber provocado estos cortes, se volvió a hacer una digestión pero ahora con *Xho*I y *Xba*I para observar el tamaño del inserto. Los resultados obtenidos con esta segunda digestión confirmaron lo que se había

obtenido en la primera. Para comprobar de qué tamaño eran los fragmentos clonados se efectuó una amplificación por PCR empleando como moldes los plásmidos positivos con dos combinaciones de oligonucleótidos: en ambas amplificaciones se empleó el oligonucleótido Tse_A1A_f1 (Tabla 1), mientras que en una de ellas se usó el oligonucleótido en sentido del vector pJet1.2, y en la otra reacción también se utilizó el oligo en antisentido del vector (Tabla 4). La combinación en la cual se amplificó en todos los casos fue la que contenía el oligonucleótido en antisentido, y de igual forma también presentó las mismas longitudes de la primera digestión (Fig. 22), esto es < 600 pb, por lo que se solicitó la secuenciación de cada fragmento después de haber vuelto a clonarnos.

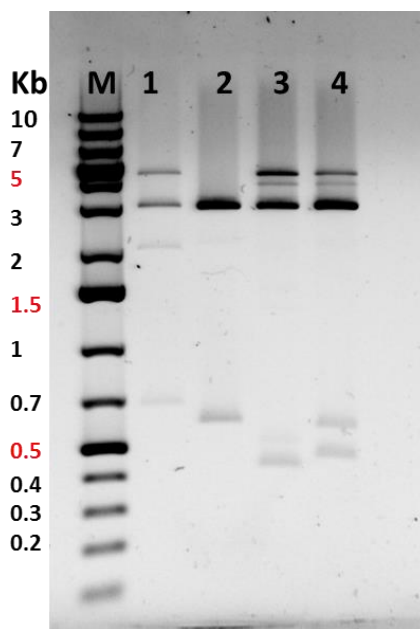


Figura 22. Análisis de restricción con la enzima BglII de los plásmidos positivos pJET 1.2 que contenían el fragmento del extremo 3' (Tse_A1A_f1-linker) de la subunidad α_{1A} del CCDV de tortuga. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. (M) marcador de peso molecular para ADN de 1 kpb. Los tamaños que se esperaba eran de ~ 1.7, kpb mientras que los obtenidos fueron los siguientes: (1) colonia 4 con un inserto de ~700 pb; (2) colonia 6 con un inserto de ~600 pb; (3) colonia 9 con un inserto de ~400 pb; (4) colonia 10, la cual presenta dos fragmentos, uno de ~500 pb y el otro de ~600 pb. Como se puede observar en ninguna colonia se alcanzó el tamaño esperado.

La secuenciación dio como resultado clonas con un fragmento de ~ 100 pb más de las que ya se conocían, puesto que de los fragmentos de ~600 pb que resultaron en esta secuenciación, ~500 pb eran parte del dominio IV que ya se había amplificado en el fragmento cacnf4-r2 (Figura 10), estas 100 pb más son parte de la secuencia del COOH terminal, dando un total del amplificado de ~1,600 pb. Al realizar un análisis por BLAST de nucleótidos (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), la secuencia extra dio como resultado un 99% de identidad con las secuencias de ARNm predichas a partir del genoma de la tortuga *Chrysemis picta*. Al deducir la secuencia de aminoácidos del fragmento completo, y de

igual manera al realizar un BLAST para proteínas, nos dio como resultado también un 99% de similitud con *C. picta*. En dicha base se encontraron dos reportes de transcriptomas para *T. scripta*, de los cuales sólo uno, el de embrión está con una mejor anotación (Kaplinsky et al., 2013; Tzica et al., 2011). Al realizar un BLAST contra el transcriptoma nos dio como resultado que había un ARNm que concordaba con nuestro fragmento amplificado completo en un 99% (Figura 23). Posteriormente se dedujo la secuencia de aminoácidos del ARNm del transcriptoma y nos dio como resultado que ambas secuencias tenían el codón de paro en seguida del mismo aminoácido, el triptófano (W).

Download ▾ GenBank Graphics

TSA: Trachemys scripta elegans comp61781_c0_seq1 mRNA sequence
Sequence ID: [gb|JW348651.1](#) Length: 2588 Number of Matches: 1

Range 1: 884 to 2464 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2892 bits(1566)	0.0	1576/1581(99%)	0/1581(0%)	Plus/Plus
Query 1	AACATCCTGGATTTTCATCGTGGTCAGCGGAGCTCTGGTGGCCTTTGCCTTCACAGGCAGC	60		
Sbjct 884	AACATCCTGGATTTTCATCGTGGTCAGCGGAGCTCTGGTGGCCTTTGCCTTCACAGGCAGC	943		
Query 61	AGCAAAGGGAAGGACATTAACACCATCAAATCCTTGCGTGTCTCCGCGTCTCAGGCC	120		
Sbjct 944	AGCAAAGGGAAGGACATTAACACCATCAAATCCTTGCGTGTCTCCGCGTCTCAGGCC	1003		
Query 121	CTGAAAACCATCAAGCGATTGCCAAAGCTCAAGGCTGCTTTGACTGCGTGGTGAACCT	180		
Sbjct 1004	CTGAAAACCATCAAGCGATTGCCAAAGCTCAAGGCTGCTTTGACTGCGTGGTGAACCT	1063		
Query 181	CTCAAAAACGTCCTCAACATCCTCATCGTCTACATGCTCTTCATGTTTCATCTTCGCCGTG	240		
Sbjct 1064	CTCAAAAACGTCCTCAACATCCTCATCGTCTACATGCTCTTCATGTTTCATCTTCGCCGTG	1123		
Query 241	GTGGCCGTCCAGCTCTTCAAGGGCAAGTCTTCTACTGCACGGATGAGTCCAAGGAGTTT	300		
Sbjct 1124	GTGGCCGTCCAGCTCTTCAAGGGCAAGTCTTCTACTGCACGGATGAGTCCAAGGAGTTT	1183		
Query 301	GAGAAGGACTGTAGGGGCGAGTACCTGGTCTATGAGAAGGACAACGAAAGTGAAGCCAG	360		
Sbjct 1184	GAGAAGGACTGTAGGGGCGAGTACCTGGTCTATGAGAAGGACAACGAAAGTGAAGCCAG	1243		
Query 361	AGCCGGCAGTGGAAAGAAATACGAGTTCACACTACGACAACGTGCTGTGGGCCCTCCTGACT	420		
Sbjct 1244	AGCCGGCAGTGGAAAGAAATACGAGTTCACACTACGACAACGTGCTGTGGGCCCTCCTGACT	1303		

Figura 23. Análisis por BLAST del fragmento amplificado en este trabajo y el transcriptoma de embrión de *T. scripta*, en el que se puede observar que presentan un 99% de identidad.

A continuación se realizó un alineamiento múltiple (Figura 24) mediante el programa de computo Clustal Ω (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo>), de los péptidos deducidos a partir de los ARNm de: el fragmento amplificado en este trabajo; del reportado en el transcriptoma de embrión de *T. scripta* (número de acceso GenBank JW348651); el deducido a partir del genoma de la tortuga *C. picta* (número de acceso GenBank XM_008163303); de la rata (*R. norvegicus*) (número de acceso GenBank NM_012918); del humano (*Homo sapiens*) (número de acceso GenBank NM_001127222); del pez cebra (*Danio rerio*) (número de acceso GenBank XM_009299587) ; y de un ave (*Gallus gallus*)

(número de acceso GenBank XM_015273824). La característica más sobresaliente de la secuencia descrita en esta tesis, y que coincide con la del transcriptoma, fue que ambas presentan un extremo carboxilo terminal muy corto, lo cual podría ser explicado como una variedad predominante por *splicing* alternativo de la isoforma P/Q de los canales de calcio dependientes del voltaje en la tortuga *T. scripta*.

```

Danio          NILD FIVVSGALVAF AFTGSSK GKDI STIKSLRVL RVL RPLKTIKRLPKL KAVFDCVNS
Ratus         NILD FIVVSGALVAF AFTGNSK GKDI NTIKSLRVL RVL RPLKTIKRLPKL KAVFDCVNS
Homo          NILD FIVVSGALVAF AFTGNSK GKDI NTIKSLRVL RVL RPLKTIKRLPKL KAVFDCVNS
Gallus        NILD FIVVSGALVAF AFTGSSK GKDI NTIKSLRVL RVL RPLKTIKRLPKL KAVFDCVNS
Trachemys     NILD FIVVSGALVAF AFTGSSK GKDI NTIKSLRVL RVL RPLKTIKRLPKL KAVFDCVNS
Transcriptoma NILD FIVVSGALVAF AFTGSSK GKDI NTIKSLRVL RVL RPLKTIKRLPKL KAVFDCVNS
Chrysemis     NILD FIVVSGALVAF AFTGSSK GKDI NTIKSLRVL RVL RPLKTIKRLPKL KAVFDCVNS
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

```

```

Danio          LKNV LNILIVYMLFM FIFAVVAVQLFKGRFF YCTDESKEFERDCRGEYLVYERDNEVRSQ
Ratus         LKNV FNILIVYMLFM FIFAVVAVQLFKGKFF HCTDESKEFERDCR GKYLLEYK-NEVKAR
Homo          LKNV FNILIVYMLFM FIFAVVAVQLFKGKFF HCTDESKEFEKDCR GKYLLEYK-NEVKAR
Gallus        LKNV LNILIVYMLFM FIFAVVAVQLFKGKFF YCTDESKEFEKDCRGEYLVYEK-NEVKAQ
Trachemys     LKNV LNILIVYMLFM FIFAVVAVQLFKGKFF YCTDESKEFEKDCRGEYLVYEKDNEVKAQ
Transcriptoma LKNV LNILIVYMLFM FIFAVVAVQLFKGKFF YCTDESKEFEKDCRGEYLVYEKDNEVKAQ
Chrysemis     LKNV LNILIVYMLFM FIFAVVAVQLFKGKFF YCTDESKEFEKDCRGEYLVYEKDNEVKAQ
****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

```

```

Danio          KREW KKYDFHYDNVLWALLT LFTVSTGEGWPQV LKHSVDATYENQGPSPGYRMEMSIFVY
Ratus         DREW KKYDFHYDNVLWALLT LFTVSTGEGWPQV LKHSVDATFENQGPSPGYRMEMSIFVY
Homo          DREW KKYDFHYDNVLWALLT LFTVSTGEGWPQV LKHSVDATFENQGPSPGYRMEMSIFVY
Gallus        RREW KKYDFHYDNVLWALLT LFTVSTGEGWPQV LKHSVDATYENQGPSPGYRMEMSIFVY
Trachemys     SRQW KKYDFHYDNVLWALLT LFTVSTGEGWPQV LKHSVDATYENQGPSPGYRMEMSIFVY
Transcriptoma SRQW KKYDFHYDNVLWALLT LFTVSTGEGWPQV LKHSVDATYENQGPSPGYRMEMSIFVY
Chrysemis     SREW KKYDFHYDNVLWALLT LFTVSTGEGWPQV LKHSVDATYENQGPSPGYRMEMSIFVY
*.****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

```

```

Danio          VYFV VPPFFVNI FVALIIIT FQE QGDKMME DYSLEKNERACIDFAISAKPLTRHMPQNK
Ratus         VYFV VPPFFVNI FVALIIIT FQE QGDKMME EYSLEKNERACIDFAISAKPLTRHMPQNK
Homo          VYFV VPPFFVNI FVALIIIT FQE QGDKMME EYSLEKNERACIDFAISAKPLTRHMPQNK
Gallus        VYFV VPPFFVNI FVALIIIT FQE QGDKMME EYSLEKNERACIDFAISAKPLTRHMPQNK
Trachemys     VYFV VPPFFVNI FVALIIIT FQE QGDKMME EYSLEKNERACIDFAISAKPLTRHMPQNK
Transcriptoma VYFV VPPFFVNI FVALIIIT FQE QGDKMME EYSLEKNERACIDFAISAKPLTRHMPQNK
Chrysemis     VYFV VPPFFVNI FVALIIIT FQE QGDKMME EYSLEKNERACIDFAISAKPLTRHMPQNK
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

```

```

Danio          QTFQ YRMWQ FVVS PPF EYTIMAMIALNTIVLMMK YDGASLT YEDV LKMFNHVFTSLFSLE
Ratus         QSFQ YRMWQ FVVS PPF EYTIMAMIALNTIVLMMK FYGASVAYENALRVFNIVFTSLFSLE
Homo          QSFQ YRMWQ FVVS PPF EYTIMAMIALNTIVLMMK FYGASVAYENALRVFNIVFTSLFSLE
Gallus        QSFQ YRMWQ FVVS PPF EYTIMAMIALNTIVLMMK FYDASDAYENVLKMFNHVFTSLFSLE
Trachemys     QSFQ YRMWQ FVVS PPF EYTIMAMIALNTIVLMMK FDKASTAYEDV LKMFNHVFTSLFSLE
Transcriptoma QSFQ YRMWQ FVVS PPF EYTIMAMIALNTIVLMMK FDKASTAYEDV LKMFNHVFTSLFSLE
Chrysemis     QSFQ YRMWQ FVVS PPF EYTIMAMIALNTIVLMMK FDKASTAYEDV LKMFNHVFTSLFSLE
*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*

```


Danio CILKIIAFGALNYFKDAWNIFDFVTVLGSITDILVTELGNNFINLSFLRLFRAARLIKLL
Ratus CVLKVMAFGILNYFRDAWNIFDFVTVLGSITDILVTEFGNNFINLSFLRLFRAARLIKLL
Homo CVLKVMAFGILNYFRDAWNIFDFVTVLGSITDILVTEFGNNFINLSFLRLFRAARLIKLL
Gallus CLLKIMAFGVLNYFRDAWNIFDFVTVLGSITDILVTEFGDNFINLSFLRLFRAARLIKLL
Trachemys CLLKIMAFGVLNYFRDAWNIFDFVTVLGSITDILVTEFGNNFINLSFLRLFRAARLIKLL
Transcriptoma. CLLKIMAFGVLNYFRDAWNIFDFVTVLGSITDILVTEFGNNFINLSFLRLFRAARLIKLL
Chrysemis CLLKIMAFGVLNYFRDAWNIFDFVTVLGSITDILVTEFGNNFINLSFLRLFRAARLIKLL

***** **

Danio RQGETIRILLWTFVQSFKALPYVCLLIAMLFFIYAIIGNQVFGNIGIIEENS-----SA
Ratus RQGYTIRILLWTFVQSFKALPYVCLLIAMLFFIYAIIGNQVFGNIGIDGEDEDSDEDEFQ
Homo RQGYTIRILLWTFVQSFKALPYVCLLIAMLFFIYAIIGNQVFGNIGIDVEDEDSDEDEFQ
Gallus RQGYTIRILLWTFVQSFKALPYVCLLIAMLFFIYAIIGNQVFGNIGIEEEDDE-----SA
Trachemys RQGYTIRILLWTFVQSFKALPYVCLLIAMLFFIYAIIGNQVFGNIGIEDEEED-----SA
Transcriptoma. RQGYTIRILLWTFVQSFKALPYVCLLIAMLFFIYAIIGNQVFGNIGIEDEEED-----SA
Chrysemis RQGYTIRILLWTFVQSFKALPYVCLLIAMLFFIYAIIGNQVFGNIGIEDEEED-----SA

*** *****:*** *: :.:

Danio ITQHNFRTFFQALMLLFRSATGEAWHDIMLSCLSGKPCDILSDNPKPECGSEFAYLYFV
Ratus ITEHNFRTFFQALMLLFRSATGEAWHIMLSCLSGKPCDKNSGKQKPECGNEFAYFYFV
Homo ITEHNFRTFFQALMLLFRSATGEAWHIMLSCLSGKPCDKNSGILTRECGNEFAYFYFV
Gallus ITQHNFRTFFQALMLLFRSATGEAWHEIMLSCLSGKPCDENSIGKEDECGNEFAYFYFV
Trachemys ITEHNFRTFFQALMLLFRSATGEAWHEIMLACLSGKPCDENSIGKEHECGNEFAYFYFV
Transcriptoma. ITEHNFRTFFQALMLLFRSATGEAWHEIMLACLSGKPCDENSIGKEHECGNEFAYFYFV
Chrysemis ITEHNFRTFFQALMLLFRSATGEAWHEIMLACLSGKPCDENSIGKEHECGNEFAYFYFV

:**:***:*** ** * ***,****:***

Danio SFIFLCSFLMLNLFVAVIMDNFEYLTRDSSILGPHHLDEYVRVWAEYDPAACGRIHYKDM
Ratus SFIFLCSFLMLNLFVAVIMDNFEYLTRDSSILGPHHLDEYVRVWAEYDPAACGRIHYKDM
Homo SFIFLCSFLMLNLFVAVIMDNFEYLTRDSSILGPHHLDEYVRVWAEYDPAANGMPYLDM
Gallus SFIFLCSFLMLNLFVAVIMDNFDYLTRDSSIXGPHHLDEFVRVWAEYDPAANGRLTLMDM
Trachemys SFIFLCSFLMLNLFVAVIMDNFEYLTRDSSILGPPPLDEYVRVWAEYDPPAW-----
Transcriptoma. SFIFLCSFLMLNLFVAVIMDNFEYLTRDSSILGPHHLDEYVRVWAEYDPAAW-----
Chrysemis SFIFLCSFLMLNLFVAVIMDNFEYLTRDSSILGPHHLDEYVRVWAEYDPAACGRIHYKDM



*****:*****:***** ** ***,**:****** *

Danio YSLLRVIDPPLGLGKCKPHRVACKRLLRMDLPVADONTVHFNSTLMALIRTALDIKIAKG
Ratus YSLLRVISPPPLGLGKCKPHRVACKRLLRMDLPVADONTVHFNSTLMALIRTALDIKIAKG
Homo YQMLRHMSPPPLGLGKCKPARVAYKRLRMDLPVADONTVHFNSTLMALIRTALDIKIAKG
Gallus YAMLRNMSPPPLGLGKCPPRVAYKRLVLMNMPVAEDMTVHFTSTLMALIRTALDIKIAKG
Trachemys -----
Transcriptoma. -----
Chrysemis YSLLRVISPPPLGLGKCKPHRVACKRLLRMDLPVADONTVHFNSTLMALIRTALDIKIAKG

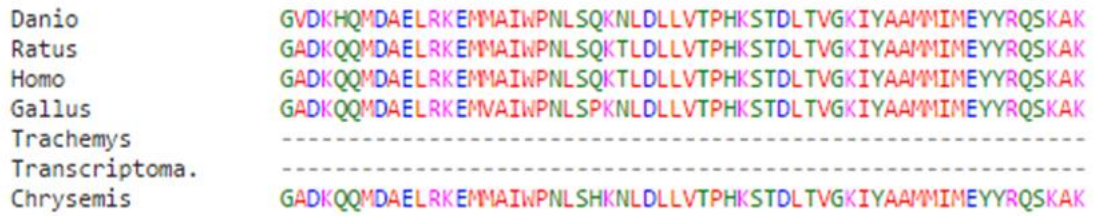


Figura 24. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de la subunidad α_1 de los dominios III y IV y el COOH terminal, en los canales de calcio dependientes de voltaje de la isoforma P/Q. Los organismos de los cuales provienen las secuencias alineadas son: el fragmento amplificado en este trabajo; el reportado en el transcriptoma de embrión de *T. scripta*; el deducido a partir del genoma de la tortuga *C. picta*; de la rata (*R. norvegicus*); del humano (*Homo sapiens*); del pez cebra (*Danio rerio*); y de un ave (*Gallus gallus*). En azul se muestran los aminoácidos ácidos, rosa los aminoácidos básicos, verde los aminoácidos polares sin carga y rojo los aminoácidos no polares o hidrofóbicos. En el recuadro negro se muestran el final del dominio IV, por lo que el fragmento amplificado y el transcriptoma de *T. scripta* presentan un COOH terminal muy corto.

Con el propósito de establecer si la ausencia de la mayor parte del extremo carboxilo terminal del canal tipo P/Q en la tortuga *T. scripta*, en comparación con otras especies, tiene algún efecto funcional en él, sería necesario la clonación completa del ADNc del mismo, seguida de su expresión en un sistema heterólogo y la caracterización de sus propiedades biofísicas y electrofisiológicas.

VII. DISCUSIÓN

La clonación de las diferentes subunidades que componen a los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de alto umbral ha permitido su caracterización molecular y funcional, con lo cual se ha podido identificar las regiones que modulan la actividad de esas proteínas, principalmente mediante interacciones específicas entre las diferentes subunidades que los componen o con otras proteínas relacionadas con su función. Por ejemplo, en el caso del canal tipo P/Q con el sitio de interacción de la subunidad alfa (sitio AID), el sitio synprint o también el dominio CBD, entre otros (Tyson y Snutch, 2013). Consecuentemente, en varios estudios se ha ido ampliando el conocimiento de estas interacciones, principalmente en mamíferos, y cuáles son los cambios cinéticos que van a generar en el canal influyendo en su función. Sin embargo, hasta donde sabemos no se ha llevado a cabo algún estudio en el cual se trate de clonar el canal de calcio tipo P/Q en la tortuga *T. scripta*. Por lo tanto, en este trabajo se clonó el extremo 3' del canal de calcio tipo P/Q en tortuga. Como se muestran en los resultados, el extremo 3' clonado representa una parte de los dominios III y IV, además de solo incluir 37 aminoácidos del carboxilo terminal de los ~690 que se encuentran en la misma región en los mamíferos. Al comparar esta secuencia con la reportada en el transcriptoma del embrión de tortuga se confirmó la existencia de la isoforma, ya que en ambas secuencias se encuentra el codón de paro en seguida del mismo aminoácido.

Puesto que la secuencia que se obtuvo no presenta una diferencia que pudiera provocar algún cambio sustancial en los dominios III y IV (Figura 10), ya que como se había mencionado anteriormente son dominios conservados (Figura 24), nos centraremos en los cambios que provocaría en el canal de calcio tipo P/Q el presentar un COOH terminal tan corto.

Se han identificado sitios de unión para varias moléculas de señalización intracelular que afectan la apertura y cierre del canal en el COOH terminal. Sin duda alguna, entre las interrogantes que se deben de tratar serían algunas de las proteínas que se unen a este sitio como son la calmodulina (CaM), la cual presentan un efecto doble sobre la subunidad

$\text{Ca}_v\alpha_1$ como son la inactivación dependiente de Ca^{2+} y la facilitación dependiente de Ca^{2+} (DeMaria et al., 2001), la cinasa de calcio calmodulina II (CaMKII), así como cuáles podrían ser algunos de los cambios de activación e inactivación de los CCDV con splicing alternativo en el extremo COOH terminal, debido a que es un dominio crítico en la regulación de la función del canal (Krovetz et al., 2000).

1. DOMINIOS DE UNIÓN AL COOH TERMINAL EN LOS CANALES DE Ca^{2+} TIPO P/Q: CALMODULINA Y CAMKII

La calmodulación en el COOH terminal en canales P/Q juega un importante papel en la inactivación así como la facilitación dependiente de Ca^{2+} . Esto puede alterar la eficiencia sináptica y puede contribuir fundamentalmente a las mejoras de la función sináptica en el sistema nervioso (Lee et al., 2003). Estas acciones son reguladas por la calmodulina, cuyo sitio de unión es el dominio CBD (Lee et al., 1999) que por lo general se encuentra a 140 aminoácidos aproximadamente del final del segmento 6 del dominio IV, por lo que al comprobar que nuestra secuencia no presenta este sitio, se puede inferir que la modulación por la calmodulina en esta isoforma podría ser nula.

Estudios en la calmodulina han permitido conocer que está formada por dos lóbulos terminales N y C. Al crear mutaciones para que sólo uno de los lóbulos fuera funcional, se ha mostrado que los lóbulos individuales pueden evocar componentes distintos en la regulación del canal (Ben- Jonhy y Yue, 2014). En la mayoría de los canales Ca_v1 , el lóbulo C induce una fase cinéticamente rápida de inactivación dependiente de Ca^{2+} (IDC), mientras que con el lóbulo N se obtiene un componente más lento (Yang et al., 2006; Dick et al., 2008). Sin embargo, en los canales $\text{Ca}_v2.1$ los lóbulos de la CaM producen polaridades opuestas de regulación, pues en el lóbulo C se produce una facilitación dependiente de Ca^{2+} (FDC), mientras que el lóbulo N evoca una IDC más lenta (DeMaria et al., 2001). En canales $\text{Ca}_v2.2$ y $\text{Ca}_v2.3$ se manifiesta una IDC sobre todo en el lóbulo-N de la CaM. Más allá de la división de la señal de Ca^{2+} , se ha mostrado que la CaM en mamíferos puede descodificar la $[\text{Ca}^{2+}]$ intracelular en diferentes formas: en el lóbulo C se presenta una selectividad local de Ca^{2+} y en el lóbulo N una selectividad global de Ca^{2+} necesaria para los Ca_v2 (Liang et al., 2003). Si esta bipartición orquesta diferentes clases de

comportamiento en los animales de orden superior sigue siendo una cuestión intrigante y abierta (Wei et al., 2003).

Debido a la importancia que tiene la calmodulación para los canales, se han hecho mutaciones en los dominios de unión y en la CaM para ver los efectos que ello provoca. En los canales de Ca^{2+} tipo P/Q se reportó que con solo presentar el COOH terminal hasta el dominio IQ se puede generar la calmodulación aunque en forma reducida (DeMaria et al., 2001; Lee et al., 2003), y cuando el dominio IQ presenta mutaciones en las posiciones 1913 y 1914 con Glu, el canal no puede unirse a la CaM, lo cual genera una aceleración en la inactivación dependiente de voltaje. Esta aceleración de la inactivación podría causar la inactivación del canal antes de la IDC por la CaM (Lee et al, 2003).

Estudios en los canales tipo N y R han permitido identificar también los efectos que provocan mutaciones en el COOH terminal al crear mutantes en su dominio IQ por un cambio con 5 alaninas (Ala). Estas mutantes presentaron una inactivación dependiente de voltaje (IDV) más acelerada de la normal tanto en corrientes de Ba^{2+} (IBa^{2+}) como de Ca^{2+} (Liang et al., 2003) debido a que el péptido mutante IQ/5A muestra una afinidad 30 veces menor por la calmodulina (DeMaria et al., 2001). En los canales tipo L el generar interrupciones segmentarias en el dominio preIQ, donde se muestra la hibridación de preasociación a la apoCam en un ensayo de interacción *in vitro*, provoca una aceleración de la IDV en las corrientes de Ba^{2+} (Romanin et al., 2000). Entretanto en el canal tipo L (α_{1C}) al generar las mismas mutaciones en el dominio IQ con Ala se muestra una inactivación acelerada de las corrientes de Ba^{2+} (Zuhlke et al., 2000), aunque más débil que en los canales tipo N y R. Se cree que este tipo de regulación es independiente de las interacciones del canal con la CaM (DeMaria et al., 2001). Sin embargo, dichas mutaciones o supresiones podrían inducir a la distorsión del orden superior de la estructura general del canal que acelere la IDV por mecanismos no relacionados con desalojar la preasociación de la apoCam. Por tal motivo al aumentar la calmodulina tipo nativa (CaMWT), se restaura el perfil cinético del tipo nativo en los canales con mutaciones en IQ (Liang et al., 2003). Por ello, al eliminar casi en su totalidad el extremo carboxilo en la isoforma encontrada del canal tipo P/Q podría eliminarse totalmente la regulación por la calmodulina al impedirse

su unión, aunque se encuentre en el citoplasma de la célula y así sólo ser regulada por el voltaje.

Un elemento importante que puede interferir en la modulación dependiente de Ca^{2+} son las distintas subunidades β ya que la asociación de estas con la subunidad α_{1A} provoca diferencias en las propiedades de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q en el sistema. Una diferencia es que las subunidades β_1 , β_3 y β_4 aceleran la inactivación de los canales tipo P/Q, mientras la subunidad β_2 ralentiza significativamente la cinética de inactivación y provoca un cambio de despolarización grande en la dependencia de voltaje de la inactivación en estado estacionario (De Waard y Campbell, 1995). Debido a que α_{1A} se distribuye ampliamente por todo el sistema nervioso (Westenbroek et al., 1995), la importancia de la inactivación y facilitación dependiente de Ca^{2+} en los canales tipo P/Q dependerá críticamente de la co-expresión con una subunidad β específica. Por ejemplo, cuando los canales tipo N contienen la subunidad β_3 , están dominados por el estado inactivo cerrado, una forma muy rápida de IDV donde la inactivación se produce preferentemente a partir de estados cerrados (Jones et al., 1999). En comparación, la IDC en esta configuración es suficientemente lenta para llegar a ser inaparente (Patil et al., 1998). También la prominencia de la regulación dependiente de Ca^{2+} en los canales tipo P/Q puede depender de la variante de *splicing* de α_{1A} que se exprese. En un estudio en el que se co-expresó la variante α_{1A-b} , ya sea con β_1 o β_2 , la inactivación dependiente de voltaje es mínima (Bourinet et al., 1999). Consecuentemente, la modulación de los canales α_{1A-b} debería presentar una marcada modulación dependiente de Ca^{2+} , independientemente de la subunidad β expresada. Por lo tanto, la diversidad funcional de los canales de Ca^{2+} tipo P/Q es potencialmente bastante compleja y varias combinaciones de α_{1A} y subunidades β producirán canales que se distinguen por sus propiedades biofísicas, así como su regulación por Ca^{2+} (Lee et al., 2000).

Otra proteína que también presenta un sitio de unión en el COOH terminal como ya se había mencionado es la CaMKII. El sitio de interacción de esta proteína con los canales P/Q está situado entre los aminoácidos 1848-1964 (Magupalli et al., 2013) por lo que la secuencia amplificada en *T. scripta* no incluye esta zona. La CaMKII es una cinasa de proteínas Ser/Thr, se compone de 6-12 subunidades principalmente α y β (Hoelz et al.,

2002). En condiciones basales, el extremo NH₂ de la CaMKII se une al dominio catalítico y bloquea el acceso de ATP y sustratos por lo que está inactiva. En respuesta al flujo de Ca²⁺, el complejo Ca²⁺/CaM se une al dominio auto-inhibitorio y estimula la auto-fosforilación de la Thr-286 y la fosforilación de otros sustratos, resultando en su forma activa. En los canales P/Q la proteína CaMKII al ser auto-fosforilada aumenta su unión al canal, e incluso después de la desfosforilación y eliminación del estímulo sigue unida al mismo, por lo que se encuentra enlazada constitutivamente (Schworer et al., 1988).

La interacción de la CaMKII con el canal Ca_v2.1 regula la transmisión sináptica y procesos de señalización relacionados con el Ca²⁺, ya que aumenta la disponibilidad de los canales para ser activados debido a que provoca un cambio positivo en la dependencia al voltaje de la inactivación, y prolonga la apertura del canal por una ralentización de la inactivación incrementando la entrada de Ca²⁺, con lo cual se mejora considerablemente la facilitación dependiente de Ca²⁺ (Jiang et al., 2008). Sin embargo, cuando en los canales Ca_v2.1, se utilizó un inhibidor de la CaMKII, la CaM-KIIN, provocó en las células TsA-201 una aceleración en la inactivación dependiente de voltaje, así como un cambio de hiperpolarización de 10 mV en la dependencia de voltaje de la inactivación, por lo que al desplazar negativamente su dependencia de voltaje hay menos canales disponibles para su activación y por lo tanto hay una reducción en la entrada de Ca²⁺ lo que conlleva a que no haya una facilitación dependiente de Ca²⁺ (Magupalli et al., 2013).

2. CAMBIOS EN LA ACTIVACIÓN E INACTIVACIÓN DE LOS CANALES DE CA²⁺ POR *SPLICING* ALTERNATIVO EN EL EXTREMO COOH TERMINAL

En distintas isoformas de los canales de Ca²⁺ se ha encontrado que variaciones por *splicing* alternativo en la estructura de la subunidad α₁, más específicamente en el extremo COOH terminal, actúan como otro regulador importante de las señalizaciones mediadas por los CCDV (Krovetz et al., 2000). Tal es el caso de variantes por *splicing* alternativo en el canal de Ca²⁺ tipo L Ca_v1.3 en ratón y humano en el que el uso del exón 42 da lugar a una forma larga del COOH terminal (Ca_v1.3₄₂), mientras que el uso del exón 42A (Hui et al., 1991) da lugar a una forma corta, presentando una mayor presencia en las neuronas motoras del asta

ventral, en la zona intermedia y el asta dorsal, dominando la isoforma con el extremo COOH terminal largo (Hetzenauer et al., 2006). La activación de la corriente de Ca^{2+} a través de los canales con la forma corta del extremo COOH terminal ($\text{Ca}_V1.3_{42A}$) fue mayor en los voltajes más negativos con un $V_{50\text{act}}$ de -23.15 mV en comparación de los -12.28 mV en $\text{Ca}_V1.3_{42}$. La inactivación en esta isoforma $\text{Ca}_V1.3_{42A}$ es más rápida debido a una inactivación dependiente de Ca^{2+} mejorada (Zhen et al., 2011).

Las variantes de *splicing* alternativo de los $\text{Ca}_V1.3$ en el exón 41 causan ya sea la eliminación de sólo el dominio IQ ($\text{Ca}_V1.3_{\Delta 41}$) o la eliminación de todo el exón 41, generando en esta última un codón de paro prematuro en la mitad del dominio IQ ($\text{Ca}_V1.3_{\Delta IQ}$). El canal $\text{Ca}_V1.3_{\Delta 41}$ es la única de las variantes de *splicing* alternativo que no se activa a potenciales más negativos con un $V_{50\text{act}}$ de -11.37 mV, ya que el $\text{Ca}_V1.3_{42}$ se activa a $V_{50\text{act}} = -12.28$ mV, pero la densidad de corriente de $\text{Ca}_V1.3_{\Delta 41}$ es mucho menor con 26.53 ± 4.22 pA/pF en comparación a la isoforma con el extremo COOH terminal largo ($\text{Ca}_V1.3_{42}$) que presentaba una corriente de 88.39 ± 12.48 pA/pF (Zhen et al., 2011). La isoforma $\text{Ca}_V1.3_{\Delta IQ}$ se ha reportado en las células ciliadas externas del oído, y los cambios que se generan al presentar el extremo COOH solo hasta la mitad de dominio IQ son potenciales de activación media ($V_{50\text{act}}$) un poco menores con -13.83 mV en comparación con la isoforma larga con -18.76 mV, así como una IDC mínima o nula, independientemente de la elección de la subunidad β auxiliar con la que se expresó. Al presentar una IDC mínima podría favorecer una transmisión sináptica de las células ciliadas externas a un número limitado de conexiones nerviosas aferentes, así como sostener el efecto de los canales iónicos dependientes de voltaje para ampliar el “límite de frecuencia RC” de electromotilidad en las células ciliadas externas, mejorando así la función de amplificador coclear (Shen et al., 2006). Caso contrario es el canal tipo $\text{Ca}_V1.3$ en las células ciliadas internas del oído con el extremo COOH terminal completo, en el cual su IDC es más rápida, pero es limitada al interaccionar con la proteína CaBP (proteína homóloga de la CaM), lo que elimina o minimiza la IDC (Yu et al., 2006).

Por otra parte, para los canales P/Q se ha encontrado que el procesamiento por *splicing* alternativo del exón 47 resulta ya sea en un codón de paro o la inserción de cinco bases que conducen a un cambio del marco de lectura y un alargamiento del extremo COOH terminal

de 244 aminoácidos (Zhuchenko et al., 1997). Funcionalmente estas isoformas no difirieron significativamente cuando se co-expresan con las cuatro subunidades β diferentes (Tsunemi et al., 2002). La exclusión del exón 44 en los Ca_V P/Q provocó que se disminuyera la inactivación dependiente de voltaje.

Por último, otras variantes cortas de los CCDV que se han encontrado son las producidas por procesamiento proteolítico del COOH terminal. Este procesamiento provoca que el canal permee más Ca^{2+} , por lo que la escisión del canal podría tener efectos profundos en las propiedades eléctricas de una neurona cambiando las propiedades de los canales de Ca^{2+} tipo L que es donde más se presenta este tipo de regulación (Gomez-Ospina et al., 2006). El fragmento resultante del procesamiento proteolítico del COOH terminal, también llamado CCAT, puede regular la transcripción así como reducir la entrada de calcio a través de los $\text{Ca}_V1.2$ (An et al., 2000). Por lo tanto el CCAT puede ser una parte importante de una vía de retroalimentación negativa. Además del $\text{Ca}_V1.2$, también se han informado que los canales $\text{Ca}_V1.3$ (Hell et al., 1993), $\text{Ca}_V2.1$ y $\text{Ca}_V2.2$ (Westenbroek et al., 1992) son truncados en las neuronas. En el caso de $\text{Ca}_V2.1$ el producto de escisión es de aproximadamente 60-75 kDa de igual forma que en los $\text{Ca}_V1.2$, y ha sido localizado en el núcleo de las neuronas de Purkinje en el cerebelo (Kordasiewicz et al., 2006). Las alteraciones proteolíticas o mutaciones genéticas en los canales P/Q pueden tener consecuencias funcionales importantes. En los ratones homocigotos para la mutación “leaner corto” (Tgla), que expresan las subunidades α_{1A} que carecen del extremo COOH terminal y produce la pérdida del dominio de unión a la calmodulina (CBD), muestran una ataxia grave, degeneración en las células de Purkinje y si no reciben atención en ~ 21 días la muerte (Fletcher et al., 1996).

La expresión selectiva de las distintas variantes de *splicing* de los canales de Ca^{2+} de la subunidad α_{1A} en diferentes regiones del sistema nervioso, así como las modificaciones proteolíticas que presentan los extremos COOH terminales, añaden una nueva dimensión de la diversidad de señalizaciones de los CCDVs en las neuronas que puede ser importante para optimizar la liberación de los transmisores dependientes del potencial de acción en diferentes sinapsis así como sus muchas otras funciones. Y en el caso de variantes cortas

que carecen de una modulación funcional del extremo COOH terminal, evitar la excesiva acumulación de Ca^{2+} durante la explosión de disparo en las neuronas (Bock et al., 2011).

VIII. CONCLUSIÓN

Nuestros resultados evidenciaron que el fragmento aislado por clonación molecular, correspondiente al extremo 3' de la subunidad α_1 del canal P/Q de los CCDV, muestra un extremo COOH corto, con lo cual no contiene varios dominios de regulación importantes para estos canales. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo la clonación completa de la subunidad α_1 de esta isoforma, para de esta forma realizar estudios que permitan identificar si este canal presenta cambios electrofisiológicos y/o funcionales con respecto a los CCDV en mamíferos. De la misma forma resulta interesante determinar las regiones del sistema nervioso en las que se exprese esta variante de *splicing*, y otras posibles, del canal P/Q así como cuál es su nivel de expresión y las consecuentes implicaciones funcionales.

IX. REFERENCIAS

- Agnew WS. (1984). Voltage-regulated sodium channel molecules. *Annu Rev Physiol* 46, 517-530.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3): 403-410.
- An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, Hinson JW, Mattsson, KI, Strassle BW, Trimmer JS, Rhodes KJ. (2000). Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature.* 403: 553-556
- Arnadottir J y Chalfie M. (2010). Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu Rev Biophys.* 39:111-137.
- Barral J, Toro S, Galarraga E, Bargas J. (2000). GABAergic presynaptic inhibition of rat neostriatal afferents is mediated by Q- type Ca(2+) channels. *Neurosci Lett.*283:33-36.
- Bickler PE. (2004). Clinical perspectives: neuroprotection lessons from hypoxia-tolerant organisms. *J Exp Biol.* 207, 3243-3249
- Barnes S. y Kelly M,E. (2002) Calcium channels at the photoreceptor synapse. *Adv Exp Med Biol.* 514:465-476.
- Ben-Jonhy M y Yue TD. (2014). Calmodulin regulation (calmodulation) of voltage-gated calcium channels. *J Gen. Physiol.* 143(6): 679-692
- Birnbaumer L, Campbell KP, Catterall WA, Harpold MM, Hofmann F, Horne WA, Mori Y, Schwartz A, Snutch TP y Tanabe T. (1994). The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron.* 13(3): 505-506.
- Bock G, Gebhart M, Scharinger A, Jangsangthong W, Busquet P, Poggiani C, Sartori S, Mangoni E.M, Sinnegger- Brauns J.M, Herzig S, Striessnig J, Koschak, A. (2011). Functional Properties of a Newly Identified C-terminal Splice Variant of Ca_v1.3 L-type Ca²⁺Channels. *The J of Biol Chem.*, 286 (49): 42736-42748.
- Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, Zamponi GW, Nargeot J, Snutch TP (1999) Splicing of $\alpha 1A$ subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci* 2:407- 415.
- Cannon SC. (2007). Physiologic principles underlying ion channelopathies. *Neurotherapeutics.* 4: 174-183.
- Canto- Bustos M, Loeza-Alcocer E, González-Ramírez R, Gandini MA, Delgado-Lezamar y Feliz R. (2014). Functional expression of T-type Ca²⁺ channels in spinal motoneurons of the adult turtle. *PLoS One.* 25,e108187.
- Castro A, Aguilar J, Elias D, Felix R, Delgado-Lezama R. (2007). G-protein-coupled GABAB receptors inhibit Ca²⁺ channels and modulate transmitter release in descending turtle spinal cord terminal synapsing motoneurons. *J Comp Neurol.* 503:624-654.
- Castro A, Andrade A, Vergara P, Segovia J, Aguilar J, Felix R, Delgado-Lezama R. (2009). Involvement of R-type Ca²⁺ channels in neurotransmitter release from spinal dorsolateral funiculus terminals synapsing motoneurons. *J Comp Neurol.* 513(2):188-196.

- Catterall W.A. (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16:521-55.
- Catterall WA. (2011). Voltage- gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3: a003947.
- Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, y Striessnig J. (2005) International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol Rev.* 57(4): 411-425.
- Chandy KG y Gutman GA. (1993) Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol. Sci.* 14(12): 434.
- Chaudhuri D, Chang SY, DeMaria CD, Alvania RS, Soong TW, Yue DT. (2004). Alternative splicing as a molecular switch for Ca^{2+} /calmodulin-dependent facilitation of P/Q-type Ca^{2+} channels. *J Neurosci .* 24:6334-6342.
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987). Single- step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
- Collingridge LG, Richard W, Olsen R, Peters J, Spedding M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology .* 56: 2-5
- Connolly CN y Wafford KA. (2004). Molecular Structure in ligand- gated ion channel function. *Biochem Soc.* 32: 529-534.
- Crozier IG, Loughnan A, Dow LJ, Low CJ, Ikram H. (1989). Congenital long QT syndrome in adults. *N Z Med J.* 102: 340-1.
- DeMaria CD, Soong TW, Alseikhan BA, Alvania RS, Yue DT. (2001). Calmodulin bifurcates the local Ca^{2+} signal that modulates P/Q-type Ca^{2+} channels. *Nature.* 411:484-489
- De Waard M, Campbell KP (1995) Subunit regulation of the neuronal α_{1A} $\text{Ca}_v2.1$ channel expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol (Lond)* 485:619-634.
- De Waard M, Liu H, Walker D, Scott VE, Gurnett CA, Campbell KP. (1997). Direct binding of G-protein $\beta \gamma$ complex to voltage-dependent calcium channels. *Nature.* 385:446-450.
- Dieffenbach, CW y Dveksler, GS. PCR primer: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2003).
- Dick IE, Tadross MR, Liang H, Tay LH, Yang W, Yue DT. (2008). A modular switch for spatial Ca^{2+} selectivity in the calmodulin regulation of Ca_v channels. *Nature.* 451:830-834
- Dolphin A.C. (1995) The G.L. Brown Prize Lecture. Voltage-dependent calcium channels and their modulation by neurotransmitters and G proteins. *Exp Physiol.* 80(1): 1-36.
- Engbrecht J, Brent R, Kaderbhai MA. (2001). Minipreps of plasmid DNA. In EW Harkins, ed, Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York.

- Ertel EA, Campbell KP, Harpold MM, Hofmann F, Mori Y, Perez-Reyes E, Schwartz A, Snutch T.P, Tanabe T, Birnbaumer L, Tsien R.W, y Catterall W.A. (2000) Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron*. 25(3): 533-535.
- Fletcher, C.F., Lutz, C.M., O'Sullivan, T.N., Shaughnessy, J.D., Jr, Hawkes, R., Frankel, W.N., Copeland, N.G. and Jenkins, N.A. (1996) Absence epilepsy in tottering mutant mice is associated with calcium channel defects. *Cell*. 87: 607-617.
- Galli JGL, Taylo WE, Shiels HA. (2006). Calcium Flux in turtle ventricular myocytes. *AJP-Regul Integr Comp Physiol*. 291: 1781-1789.
- George AL, Jr, (2005). Inherites disorders of voltage-gated sodium channels. *J Clin Invest*. 115: 1990-1999.
- Gillespie PG y Walker RG. (2001). Molecular basis of mechanotransduction. *Nature*. 413: 194-202
- Glossmann H, y Striessnig J. (1990) Molecular properties of calcium channels. *Rev Physiol Biochem. Pharmacol*. 114: 1-105.
- González C, Mendoza J, Avila-Costa MR, Arias JM, y Barral J. (2013). Golgi study of médium spiny neurons from dorsolateral striatum of the turtle *Trachemys scripta elegans*. *Neurosci Lett*. 556: 227-231
- Gomez-Ospina N, Tsuruta F, Barreto-Chang O, Hu L, Dolmetsch R. (2006). The C Terminus of the L-Type Voltage-Gated Calcium Channel CaV1.2 Encodes a Transcription Factor. *Cell*. 127: 591-606.
- Gross RA y Macdonald RL. (1987). Dynorphin A selectively reduces a large transient (N-type) calcium current of mouse dorsal root ganglion neurons in cell culture. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84(15):5469-5473.
- Haeseleer F, Imanishi Y, Sokal I, Filipek S, Palczewski K. (2002). Calcium-binding proteins: intracellular sensors from the calmodulin superfamily. *Biochem Biophys Res Commun*. 290:615-623.
- 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.
- Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. (1988). Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sino-atrial node cells. *J Physiol*. 395, 233-253.
- Hell JW, Westenbroek RE, Warner C, Ahlijanian MK, Prystay W, Gilbert MM, Snutch TP, Catterall WA. (1993). Identification and differential subcellular localization of the neuronal class C and class D L-type calcium channel alpha 1 subunits. *J Cell Biol*. 123: 949-962.
- Hetzenauer A, Sinnegger-Brauns MJ, Striessnig J, Singewald N. (2006). Brain activation pattern induced by stimulation of L-type Ca²⁺-channels: contribution of Ca(V)1.3 and Ca(V)1.2 isoforms. *Neuroscience*. 139(3):1005-15.
- Hille B. (1989). The Sharpey-Schafer Lecture. Ionic channels: evolutionary origins and modern roles. *Q J Exp Physiol*. 74: 785-804
- Hille, B. (2001). Ion Channels of Excitable Membranes, 3rd edn. Sunderland, MA: Sinauer Associates Inc

- Hillman D, Chen S, Aung TT, Cherksey B, Sugimori M y Llinas RR. (1991) Localization of P- type calcium channels in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:7076-7080.
- Hirata H. (1993). Review of molecular structure and function of ion channels. *Nihon Rinsho*. 51 (4):1065-1082
- Hofmann F, Biel M y Flockerzi V. (1994) Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annu Rev Neurosci*. 17:399-418.
- Hofmann F, Lacinova L y Klugbauer N. (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol*. 139: 33-87.
- Hoelz, A., Nairn, A. C., and Kuriyan, J. (2003) Crystal structure of a tetradecameric assembly of the association domain of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II. *Mol Cell*. 11: 1241-1251
- Hormigo A, Dalmau J, Roseblum NK, River ME y Posner JB. (1994). Immunological and pathological study of anti- Ri associated encephalopathy. *Ann Neuronal*. 36: 896-902.
- Hucho F y Weise C. (2001). Ligand-Gated Ion Channels. *Angew Chem Int Ed*.40:3100-3116.
- Hui A, Ellinor PT, Krizanova O, Wang JJ, Diebold RJ, Schwartz A. (1991). Molecular cloning of multiple subtypes of a novel rat brain isoform of the alpha 1 subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Neuron*. 7(1):35-44.
- Ishikawa T, Kaneko M, Shin HS, Takahashi T (2005). Presynaptic N-type and P/Q-type Ca²⁺ channels mediating synaptic transmission at the calyx of Held of mice. *J Physiol*. 568: 199-209.
- Jeziorski MC, Greenberg RM, Clark KS, Anderson PA. (1998). Cloning and functional expression of voltage-gated calcium channel alpha1 subunit from jellyfish. *J Biol Chem*. 273(35):22792-22799.
- Jiang X, Lautermilch JN, Waatari H, Westenbroek ER, Scheuer T, Catterall WA. (2008) Modulation of CaV2.1 channels by Ca²⁺ /calmodulindependent protein kinase II bound to the C-terminal domain. *PNAS*. 105(1): 341-346.
- Jones LP, De Maria CD, Yue DT. (1999). N-type calcium channel inactivation probed by gating-current analysis. *Biophys J*. 76: 2530-2552.
- Jones SW y Marks TN. (1989). Calcium currents in bullfrog sympathetic neurons. I. activation kinetics and pharmacology. *J Gen Physiol*. 94(1):151-167.
- Katz E, Ferro PA, Cherksey BD, Sugimori M, Llinas R, Uchitel OD. (1995). Effects of calcium channel blockers on transmitter release and presynaptic currents at the frog neuromuscular junction. *J Physiol*. 486:695-706.
- Kaplinsky NJ, Gilbert SF, Cebra-Thomas J, Lillevali K, Saare M, Chang EY, Edelman HE, Frick MA, Guan Y, Hammond RM, Hampilos NH, Opokus DS, Sariahmed K, Sherman EA y Watson R. (2013). The embryonic Transcriptome of the Red- Eared Slider Turtle (*Trachemys scripta*). *PLOS One*. 8(6): e66357.
- Kordasiewicz HB, Thompson RM, Clark HB, Gomez CM. (2006). C-termini of P/Q-type Ca²⁺ channel alpha1A subunits translocate to nuclei and promote polyglutamine-mediated toxicity. *Hum Mol. Genet*. 15: 1587-1599.

- Krovetz SH, Helton DT, Crews AL, Horne WA. (2000). C-Terminal Alternative Splicing Changes the Gating Properties of a Human Spinal Cord Calcium Channel $\alpha 1A$ Subunit. *J Neurosci.* 20(20): 7564-7570.
- Lacinová L. (2005). Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys.* 24:1-78
- Lee A, Wong ST, Gallagher D, Li B, Storm DR, Scheuer T, Catterall WA. (1999). Ca^{2+} /calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature.* 399:155-159.
- Lee AH, Scheuer T, Catterall AW. (2000). Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Facilitation and Inactivation of P/Q-Type Ca^{2+} Channels. *J Neurosci.* 20(18):6830-6838.
- Lee AH, Zhou T, Scheuer, Catterall WA. (2003). Molecular determinants of Ca^{2+} /calmodulin-dependent regulation of Cav2.1 channels. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 100:16059-16064.
- Liang H, DeMaria CD, Erickson MG, Mori MX, Alseikhan BA, Yue DT. (2003). Unified mechanisms of Ca^{2+} regulation across the Ca^{2+} channel family. *Neuron.* 39:951-96
- Li B, Zhong H, Scheuer T, Catterall WA. (2004). Functional role of a C-terminal $G\beta\gamma$ -binding domain of $Ca(v)2.2$ channels. *Mol Pharmacol.* 66:761-769.
- Liebesskind BJ, Hillis DM, Zakon HH. (2011) Evolution of sodium channels predates the origin of nervous systems in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:9154-9159.
- Lindgren CA, Moore JW (1989) Identification of ionic currents at presynaptic nerve endings of the lizard. *J Physiol.* 414:201-222.
- Llinas R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B. (1992). Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent calcium channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci.* 15: 351-355.
- Llinas R, Sugimori M, Hillman DE, Cherksey B. (1995). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 1689-1693.
- Llinas R, Yarom Y. (1981). Properties and distribution of ionic conductances generating electroresponsiveness of mammalian inferior olivary neurons in vitro. *J Physiol.* 315: 569-584.
- Lovell VP, Carleton BJ y Mello VC. (2013). Genomics analysis of potassium channel genes in songbirds reveals molecular specializations of brain circuits for the maintenance and production of learned vocalizations. *BMC Genomics.* 14: 470.
- Magupalli GV, Mochida S, Yan J, Jiang X, Westenbroek ER, Nairs CA, Scheuer T, Catterall W. (2013). Ca^{2+} -independent Activation of Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinase II Bound to the C-terminal Domain of $CaV2.1$ Calcium Channels. *J Biol Chem.* 288(7): 4637-4648.
- Mckeow L, Robinson P, Jones OT. (2006). Molecular basis of inherited calcium channelopathies: roles of mutations in pore-forming subunits. *Acta Farmc Sinc.* 27:789-812.

- Michaelis EK. Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog Neurobiol.* 54(4):369-415.
- Minke B y Cook,B. (2002). TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev.* 82: 429-472.
- Mizuta E, Miake J, Yano S, Furuichi H, Manabe K, Sasaki N. (2005). Subtype switching of T-type Ca²⁺ channels from Cav3.2 to Cav3.1 during differentiation of embryonic stem cells to cardiac cell lineage. *Circ J.* 69:1284-9.
- Montell C, Birnbaumer L y Flockerzi V. (2002). The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell.* 108: 595-598.
- Murakami M, Fleischmann B, De Felipe C, Freichel M, Trost C, Ludwig A, Wissenbach U, Schwegler H, Hofmann F, Hescheler J, Flockerzi V, y Cavalie A. (2002). Pain perception in mice lacking the beta3 subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem.* 277(43): 40342-40351.
- Moran Y, Gur BM, Liebeskind JB y Zakon HH. (2015). Evolution of voltage – gated ion channels at the emergence of Metazoa. *The J of Exp Biol.* 218: 515-525.
- Muth J.N., Varadi G., & Schwartz A. (2001) Use of transgenic mice to study voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci.* 22(10): 526-532.
- Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, Schmalzing G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17: 3016-3028.
- Nimmrich V y Gross G. (2012). P/Q- type calcium channel modulators. *British Journ of Pharmac.* 167:741-759.
- Nowycky MC, Fox AP y Tsien RW. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different agonist sensitivity. *Nature.* 316: 440-443.
- Patil PG, Brody DL, Yue DT. (1998). Preferential closed-state inactivation of neuronal calcium channels. *Neuron* 20:1027-1038.
- Pape HC. (1996). Queer current and pacemaker: the hyperpolarization activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol.* 58: 299-327
- Perez-Reyes E. (2003). Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev.* 83:117-61
- Perozo E, y Rees DC. (2003). Structure and mechanism in prokaryotic mechanosensitive channels. *Curr Opin Struct Biol.* 13: 432-442.
- Peterson BZ, DeMaria CD, Adelman JP, Yue DT.(1999). Calmodulin is the Ca²⁺ sensor for Ca²⁺-dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron.* 22:549-558.
- Platzer J, Engel J, Schrott-Fisher A, Stephan K, Bova S, Chen H, Zheng H, Striessnig J. (2000). Congenital deafness and sinoatrial node dysfunction in mice lacking class D L-type Ca²⁺ channels. *Cell.* 102(1):89-97.

- Pongs O, Kecskemethy N, Müller R, Krah-Jentgens I, Baumann A, Kiltz HH, Canal I, Llamazares S, y Ferrus A. (1988). Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J.* 7:1087-1096.
- Randall A y Tsien RW. (1995). Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci.* 15: 2995-3012.
- Renh H. (1991). *Eur J Biochem.* 202:701-713.
- Richter RP, Brisson A. (2003). Characterization of lipid bilayers and protein assemblies supported on rough surfaces by atomic force microscopy. *Langmuir.* 19:1632-40
- Richter TA, Kolaj M, Renaud LP. (2005). Low voltage- activated Ca²⁺ channels are coupled to Ca²⁺- induced Ca²⁺ release in rat thalamic midline neurons. *J Neurosci.* 25: 8267-8271.
- Romanin C, Gamsjaeger R, Kahr H, Schaufler D, Carlson O, Abernethy DR, Soldatov NM. (2000). Ca²⁺ sensors of L-type Ca²⁺ channel. *FEBS Lett.* 487: 301–306.
- Rosich P. (2008). Canalopatías autoinmunes del sistema nervioso central). TESIS DOCTORAL. Universidad de Barcelona.
- Sakmann B y Neher E. (1995). Single-channel recording. (Plenum Press, New York)
- Sanchez- Mejorada E, Sanchez- Mondragon G, Pineda JC, Gonzalez M, Barral J. (2009). N-type calcium channels mediate a GABA(B) presynaptic modulation in the corticostriatal synapse in turtle's paleostriatum augmentatum. *Synapse.* 63:855-862.
- Sands Z, Grottesi A, Sansom SPM. (2005) Voltage- gated ion channels. *Current Biol.* 15: 44-47
- Sanger F, Nicklen S y Coulson AR. (1977). DNA secuencing with chain- terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74(12): 5463-5467.
- Schworer CM, Colbran RJ, Keefe JR, Soderling T R. (1988) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. Identification of a regulatory autophosphorylation site adjacent to the inhibitory and calmodulin binding domains. *J Biol Chem.* 263: 13486-13488.
- Shenee ME. y Ricci AL. Biophysical and pharmacological characterization of voltaje-gated calcium current in turtle auditory hair cell. *J Physiol.* 549:697-717
- Snutch TP. (1992). Reiner PB. Calcium channels: diversity of form and function. *Curr Opin Neurobiol.* 2;2:247-253.
- Sokabe M y Sachs F. (1990). The structure and dynamics of patch clamped membrane, a study using differential interference contrast microscopy. *J Cell Biol.* 111: 599-606.
- Stein WD. (1984). Ion channels: molecular and physiological aspects. *Academic Press.* ISBN. 21
- Striedter, G.F. (2005). Principles of brain evolution (Sinauer Associates, Sunderland, Mass.).

- Strong M, Chandy K G y Gutman G A. (1993). Molecular evolution of voltage sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability. *Mol Biol Evol.*10:221-242.
- Sugiura Y, Woppmann A, Milijanich GP y Ko GP. (1995). A novel omega- conopeptide for the presynaptic localization of calcium channels at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurocytol.* 24: 15-27.
- Sudhof TC. (2004).The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci .* 27:509-547.
- Tanabe TK, Beam G, Powell JA y Numa S. (1988). Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature.* 336:134-139
- Tang CM, Presser F, Morad M. (1988). Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel. *Science* 240, 213-215.
- Tsien RW, Lipscombe D, Madison DV, Bley KR, Fox AP.(1988). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* 11: 431-438.
- Tsunemi T, Saegusa H, Ishikawa K, Nagayama S, Murakoshi T, Mizusawa H, Tanabe T. (2002). Novel Cav2.1 splice variants isolated from Purkinje cells do not generate P-type Ca^{2+} current. *J Biol Chem.* 277: 7214-7221.
- Tyson JR. y Snutch TP. (2013) . Molecular nature of voltage- gated calcium channels: structure and species comparison. *WIREs Membr Transp Signal.* 2:181-206.
- Tzika AC, Helaers R, Schramm G, Milinkovitch MC. (2011). Reptilian- transcriptome v1.0, a glimpse in the brain transcriptome of five divergent Sauropsida lineages and the phylogenetic position of turtles. *Evodevo.* 2(1):19.
- Uchitel OD, Protti DA, Sanchez V, Chersky BD, Sugimori M, LLina's R. (1992). P-type voltage-dependent calcium channel mediates presynaptic calcium influx and transmitter release in mammalian synapses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:3330 -3333.
- Wang Z, et al. (2013). The draft genomes of soft-shell turtle and green sea turtle yield insights into the development and evolution of the turtle-specific body plan. *Nat Genet.* 45(6):701-706.
- Wei F, Xia XM, Tang J, Ao H, Ko S, Liauw J, Qiu CS, Zhuo M. (2003). Calmodulin regulates synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex and behavioral responses: a microelectroporation study in adult rodents. *J Neurosci.* 23:8402-8409.
- Wen H, Linhoff MW, Hubbard JM, Nelson NR, Stensland D, Dallman J, Mandel G, Brehm P. (2013). Zebrafish calls for reinterpretation for the roles of P/Q calcium channels in neuromuscular transmission. *J Neurosci.* 33(17):7384-92.
- Westenbroek RE, Hell JW, Warner C, Dubel SJ, Snutch TP, y Catterall WA. (1992). Biochemical properties and subcellular distributionof an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* 9: 1099-1115.
- Westenbroek RE, Sakurai T, Elliott EM, Hell JW, Starr TVB, Snutch TP, Catterall WA. (1995). Immunochemical identification and subcellular distribution of the $\alpha 1A$ subunits of brain calcium channels. *J Neurosci* 15:6403- 6418.

- Yaari Y, Hamon B, y Lux HD. (1987). Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science*. 235, 680-682
- Yang PS, Alseikhan BA, Hiel H, Grant L, Mori MX, Yang W, Fuchs PA, Yue DT. (2006). Switching of Ca²⁺-dependent inactivation of Cav1.3 channels by calcium binding proteins of auditory hair cells. *J. Neurosci*. 26:10677-10689.
- Yu FH, y Catterall WA. (2004). The VGL chanome: a protein superfamily specialized for electrical signaling and ionic homeostasis. *Science STKE* 253: re 15.
- Yu HF, Yarov- Yarovoy V, Gutman AG y Catterall W. (2005) Overview of molecular relationships in the voltage- gated ion channel superfamily. *Pharmacol Rev*. 57: 387-395.
- Zabori N y Haverkamp S. (2013). Calcium channel-dependent molecular maturation of photoreceptor synapses. *PLoS One* 8, e63853.
- Zhang JF, Randall AD, Ellinor PT, Horne WA, Sather WA, Tanabe T, Schwarz TL y Tsien RW. (1993). Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal calcium channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology*. 1993;32(11):1075-1088.
- Zhen TB. Jiang F, Yeong TM, Yu D, Huang H, Shen Y, Wah ST. (2011). Functional Characterization of Alternative Splicing in the C Terminus of L-type CaV1.3 Channels. *J Biol Chem*. 286(49): 42725-42735.
- Zuhlke RD, Pitt GS, Tsien RW, Reuter H. (2000). Ca²⁺- sensitive inactivation and facilitation of L-type Ca²⁺ channels both depend on specific amino acid residues in a consensus calmodulin- biding motif in the α_{1C} subunit. *J Biol Chem*. 275: 21121-21129.
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC. (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the α_{1A} -voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet*. 15:62-69.