



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**INTERACCIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE CON LA
DISTROFINA Y EL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DISTROFINA EN CEREBRO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LEYVA LEYVA MARGARITA

TUTOR PRINCIPAL: DR. RICARDO GONZÁLEZ RAMÍREZ
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

COMITÉ TUTOR: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA, I.P.N.

DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, U.N.A.M.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

SEPTIEMBRE, 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**INTERACCIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE CON LA
DISTROFINA Y EL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DISTROFINA EN CEREBRO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

LEYVA LEYVA MARGARITA

TUTOR PRINCIPAL: DR. RICARDO GONZÁLEZ RAMÍREZ
HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ"

COMITÉ TUTOR: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA, I.P.N.

DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, U.N.A.M.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

SEPTIEMBRE, 2023.

COORDINACIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO
COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
ENTIDAD (FACULTAD DE MEDICINA)
OFICIO: CGEP/CPCB/FMED/548/2023
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **17 de abril de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **LEYVA LEYVA MARGARITA** con número de cuenta **77000581** con la tesis titulada **“INTERACCIÓN DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE CON LA DISTROFINA Y EL COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A DISTROFINA EN CEREBRO”**, realizada bajo la dirección del **DR. RICARDO GONZÁLEZ RAMÍREZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MYRIAN VELASCO TORRES
Vocal: DR. ÁNGEL ALFONSO ZARAIN HERZBERG
Vocal: DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS
Vocal: DRA. ALICIA ELIZABETH HERNÁNDEZ ECHEAGARAY
Secretario: DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 29 de junio de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA

c. c. p. Expediente del alumno

AGNS/RCHT/EARR/rcht



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.) por proporcionar la plataforma para realizar este proyecto de formación académica y poder contribuir con una minúscula pieza al inmenso universo del conocimiento científico.

A mi tutor, el Dr. Ricardo González Ramírez, mi agradecimiento por su entusiasmo y fortaleza inquebrantable para enfrentar y dar solución a las dificultades. Mi enorme gratitud por su guía para poder llevar a término este proyecto, por su amplia visión para contextualizar el trabajo científico y por su generoso esfuerzo para extender mi creatividad.

Agradezco al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez y al Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez, miembros del Comité tutor, por sus valiosas aportaciones para el progreso de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al Dr. Ricardo Félix por su valioso apoyo y liderazgo. Aprecio enormemente su capacidad ejemplar para visualizar y abordar el trabajo científico.

Al Dr. Alejandro Sandoval, a la Dra. Alejandra Corzo López y a la Dra. Sara Luz Morales Lázaro por la generosidad y disposición que mostraron siempre para lograr la colaboración que enriqueció este trabajo.

A los miembros del Jurado por sus comentarios para la elaboración del escrito de esta tesis.

Mi agradecimiento al Hospital General “Dr. Manuel Gea González” por las facilidades que esta institución me otorgó para llevar a cabo el presente proyecto de investigación.

A mis compañeros y amigos del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” y del laboratorio del Dr. Ricardo Félix del CINVESTAV, con cariño y gratitud.

DEDICATORIA

A

Andrea y Angélica

Hoy y siempre, con inmenso cariño.

ÍNDICE

Lista de figuras	
Lista de tablas	
Lista de abreviaturas y símbolos	
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. Distrofia muscular de Duchenne	3
1.2. Distrofina	4
1.2.1. Expresión de distrofina	4
1.2.2. Función de la distrofina y el complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina	6
1.2.3. La ausencia de distrofina impacta el funcionamiento normal del sistema nervioso central	7
1.2.3.1 En el humano	7
1.2.3.2 En el modelo de ratón <i>mdx</i>	9
1.3. Interacción entre distrofina y canales iónicos o receptores	10
1.4. Interacción entre distrofina y los canales Cav	14
1.4.1. Generalidades sobre los canales Cav	14
1.4.2. Interacciones de distrofina y el DGC con los Cav en cerebro	15
1.4.3. Papel de distrofina en la función de los canales iónicos	16

2. Justificación	18
3. Hipótesis	19
4. Objetivos	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos específicos	20
5. Metodología	21
5.1. Manejo de animales	21
5.2. Ensayos de inmunoprecipitación	21
5.3. Western blot	22
5.4. Inmunohistoquímica	23
5.5. Ensayo de ligamiento por proximidad	23
5.6. Amplificación del cDNA de Dp140, α 1-sintrofina y $\text{Ca}_v\beta_{4e}$	25
5.7. Clonación de Dp140, α 1-sintrofina y $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ en vectores de expresión	25
5.8. Cultivo celular y transfección	26
5.9. Determinación de la vida media de la proteína $\text{Ca}_v2.1$	26
5.10. Electrofisiología	27
6. Resultados	29
6.1. Distrofina y α 1-sintrofina interactúan con el canal $\text{Ca}_v2.1$ en el cerebro	29
6.2. Dp140 interactúa con la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ en el cerebro	30
6.3. Las subunidades auxiliares $\text{Ca}_v\beta$ y $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ interactúan con α 1-sintrofina en el cerebro	32

6.4. Co-localización entre Cav $\alpha_2\delta$ -1 y distrofina en el cerebro de ratón	33
6.5. Interacción entre distrofina/Cav2.1 y distrofina/Cav $\alpha_2\delta$ -1 en el hipocampo	34
6.6. Interacción entre distrofina/Cav2.1 y distrofina/Cav $\alpha_2\delta$ -1 en el cerebelo	36
6.7. Clonación del cDNA de Dp140 y α 1-sintrofina	38
6.8. Clonación de Cav β_{4e}	41
6.9. Dp140 y α 1-sintrofina incrementan la vida media del canal Cav2.1	44
6.10. Dp140 y α 1-sintrofina aumentan la actividad de los canales Cav2.1	45
7. Discusión	48
8. Conclusiones	51
9. Perspectivas	52
10. Referencias bibliográficas	53
11. Anexo (Artículo requisito para la obtención del grado)	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las diferentes isoformas de distrofina	6
Figura 2. Organización molecular del DGC	7
Figura 3. Organización molecular y clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje	15
Figura 4. La ausencia de distrofina altera la función de los canales iónicos	17
Figura 5. Interacción de los canales Cav2.1 con distrofina y α 1-sintrofina	30
Figura 6. Interacción de Cav α 2 δ -1 con distrofina	31
Figura 7. Interacción de α 1-sintrofina con las diferentes subunidades auxiliares	33
Figura 8. Co-localización de la distrofina y la subunidad Cav α 2 δ -1 en el cerebro	34
Figura 9. Interacción entre distrofina/Cav2.1 y distrofina/Cav α 2 δ -1 en el hipocampo	35
Figura 10. Interacción entre distrofina/Cav2.1 y distrofina/Cav α 2 δ -1 el área CA1 del hipocampo	36
Figura 11. Interacción entre distrofina/Cav2.1 y distrofina/Cav α 2 δ -1 en el cerebelo	37
Figura 12. Interacción entre distrofina/Cav2.1 y distrofina/Cav α 2 δ -1 en la región del paraflocculo del cerebelo	38
Figura 13. Amplificación de los cDNA de α 1-sintrofina y Dp140	39
Figura 14. Clonación del cDNA de α 1-sintrofina	40
Figura 15. Clonación del cDNA de Dp140	40
Figura 16. Expresión heteróloga de Dp140-GFP y α 1-sintrofina-GFP	41
Figura 17. Amplificación del cDNA de Cav β 4e	42
Figura 18. Clonación del cDNA de Cav β 4e	43
Figura 19. Expresión heteróloga de Cav β 4e	43
Figura 20. Dp140 y α 1-sintrofina incrementan la estabilidad de la proteína Cav2.1	44
Figura 21. Dp140 y α 1-sintrofina aumentan el número de canales Cav2.1 en la membrana plasmática	46
Figura 22. El efecto de Dp140 y α 1-sintrofina sobre la actividad de los canales Cav2.1 no depende de Cav β 4a	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. La expresión de las diferentes isoformas de distrofina está controlada por varios promotores ubicados a lo largo del gen <i>DMD</i>	5
Tabla 2. Interacciones descritas de los canales iónicos con el DGC	11
Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en este trabajo	24

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

bp	pares de bases
BSA	albúmina sérica bovina
CA1	sector de Sommer región I
CA3	sector de Sommer región III
C _{av}	canales de calcio dependientes de voltaje
cDNA	DNA complementario
DAPI	4,6'-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
DGC	complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina
DMB	distrofia muscular de Becker
DMD	distrofia muscular de Duchenne
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	ácido desoxirribonucleico
Dp	isoforma de distrofina
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
GABA _A	receptores GABA tipo A
GFP	proteína verde fluorescente
HEK	human embryonic kidney
HVA	canales de alto umbral de activación
IHC	inmunohistoquímica
IQ	coeficiente intelectual
kb	kilobases
kDa	kilodaltones
LVA	canales de bajo umbral de activación
M	molar
Mb	megabases
<i>mdx</i>	modelo de ratón deficiente en Dp427
<i>mdx52</i>	modelo de ratón deficiente en Dp427 y Dp140
mM	milimolar
mRNA	RNA mensajero

µg	microgramos
µl	microlitros
µm	micrómetros
nm	nanómetros
PBS	solución salina amortiguada con fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PFA	paraformaldehído
PLA	ensayo de ligamiento por proximidad
RNA	ácido ribonucleico
SNC	sistema nervioso central
TAE	solución amortiguadora Tris-acetato-EDTA
VGLUT1	transportador vesicular de glutamato 1
x g	veces gravedad (unidades de fuerza centrífuga relativa)

RESUMEN

La distrofina y el complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC, por sus siglas en inglés) son proteínas que funcionan como un andamio molecular en donde se unen diversas moléculas de señalización, entre las que se encuentran receptores y canales iónicos como, por ejemplo, los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav). Los canales Cav están conformados por la subunidad formadora del poro Cav α_1 y, al menos, dos subunidades auxiliares llamadas Cav β y Cav $\alpha_2\delta$. Además de las subunidades auxiliares, el estudio del proteoma en el cerebro completo de ratón ha revelado que los canales Cav2 están embebidos en un microambiente de alrededor de 200 proteínas, algunas de las cuales pertenecen al DGC. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar las interacciones entre el canal Cav2.1 y el DGC en el cerebro de ratón, así como analizar las repercusiones funcionales de estas interacciones. Mediante experimentos de inmunoprecipitación, definimos la composición de un complejo proteico formado por Dp140 y α 1-sintrofina con Cav2.1, Cav $\alpha_2\delta$ -1 y Cav β_{4e} . Por medio del ensayo de ligamiento por proximidad (PLA), encontramos que Cav2.1 y Cav $\alpha_2\delta$ -1 interactúan con la distrofina en el hipocampo y el cerebelo. Además, demostramos que la asociación del canal con Dp140 y α 1-sintrofina cambia la estabilidad de la proteína Cav2.1, aumentando significativamente su vida media de $\sim 24.3 \pm 5.2$ a $\sim 62.4 \pm 10.9$ horas ($P < 0.02$). Los ensayos de electrofisiología mostraron que la co-expresión de Dp140 y α 1-sintrofina con el complejo del canal Cav2.1/Cav $\alpha_2\delta$ -1/Cav β_{4e} provocó un aumento sustancial en la actividad del canal. Con los resultados obtenidos en este trabajo hemos identificado a Dp140 y α 1-sintrofina como compañeros nuevos de interacción del canal neuronal Cav2.1 y, por primera vez, proporcionamos evidencia experimental de que esta interacción regula positivamente la función de Cav2.1.

ABSTRACT

Dystrophin and the dystrophin-associated glycoprotein complex (DGC) are molecular scaffolds for binding various signaling molecules, including receptors and ion channels like voltage-gated Ca^{2+} (Ca_v) channels. Ca_v channels comprise the pore-forming subunit $\text{Ca}_v\alpha_1$ and at least two auxiliary subunits called $\text{Ca}_v\beta$ and $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$. Besides the auxiliary subunits, proteome study in the whole mouse brain has revealed that Ca_v2 channels are embedded in a microenvironment of about 200 proteins, some of which belong to the DGC. This work aimed to study the interactions between the $\text{Ca}_v2.1$ channel and the DGC in the mouse brain and analyze the functional implications of these interactions. Using immunoprecipitation experiments, we defined the composition of a protein complex formed by Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin with $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$, and $\text{Ca}_v\beta_{4e}$. Using proximity ligation assay (PLA), we determined that $\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ interact with dystrophin in the hippocampus and the cerebellum. We showed that the association of the channel with Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin changes the stability of $\text{Ca}_v2.1$ protein, significantly increasing the half-life of $\text{Ca}_v2.1$ from $\sim 24.3 \pm 5.2$ to $\sim 62.4 \pm 10.9$ hours ($P < 0.02$). Electrophysiology assays showed that coexpression of Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin with the $\text{Ca}_v2.1/\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1/\text{Ca}_v\beta_{4e}$ channel complex caused a substantial increase in channel activity. With the results obtained in this work, we have identified Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin as novel interaction partners of the neuronal $\text{Ca}_v2.1$ channel and provided experimental evidence for the first time that this interaction positively regulates $\text{Ca}_v2.1$ function.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Distrofia muscular de Duchenne

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una enfermedad hereditaria recesiva ligada al cromosoma X que se caracteriza por la degeneración progresiva de los músculos, alteraciones cardíacas y cognitivas. Generalmente, los pacientes con DMD son diagnosticados entre los 2 y 7 años, ya que durante este período presentan retraso en el desarrollo con dificultad para sentarse, caminar y hablar. Casi todos los pacientes pierden la capacidad de caminar antes de la adolescencia, lo que los lleva al uso de sillas de ruedas. Por lo general, estos pacientes fallecen por complicaciones cardíacas o respiratorias durante la tercera década de vida (Birnkrant et al., 2018). La DMD es causada por mutaciones en el gen *DMD* que codifica a la proteína distrofina. El espectro de mutaciones del gen *DMD* incluye 80% de eliminaciones y duplicaciones grandes (de uno a varios exones); el 20% corresponde a mutaciones pequeñas (menores a un exón), las cuales incluyen mutaciones puntuales, eliminaciones, inserciones y mutaciones que afectan a los sitios de *splicing* (Bladen et al., 2015). Debido a que el gen *DMD* tiene una tasa de mutación relativamente alta, frecuentemente, se identifican nuevas mutaciones en este gen (Tuffery-Giraud et al., 2009; Vieitez et al., 2017).

La “hipótesis del marco de lectura” (Monaco et al., 1988) señala que las mutaciones en el gen *DMD*, que eliminan el marco de lectura abierto, conducen a la pérdida de la distrofina y causan la DMD, con una incidencia de aproximadamente 1 en 3,500 varones recién nacidos (Emery, 2002; Mah et al., 2014). En cambio, mutaciones que mantienen el marco de lectura abierto causan una disminución en la cantidad o alteran el tamaño de la distrofina, produciendo una variante de la enfermedad, clínicamente menos severa, conocida como distrofia muscular de Becker (DMB) (Bladen et al., 2015; Koenig et al., 1989); en esta variación de la enfermedad, la proteína mutada puede compensar parcialmente la función de la distrofina. Varios estudios han reportado alrededor del 9% de excepciones a la hipótesis del marco de lectura; es decir, pacientes con DMB que tienen eliminaciones o duplicaciones con

pérdida del marco de lectura abierto y pacientes con DMD que presentan mutaciones que conservan el marco de lectura (Aartsma-Rus et al., 2006).

1.2. Distrofina

1.2.1. Expresión de distrofina

La distrofina es una proteína del citoesqueleto, asociada a la membrana plasmática; es miembro de la familia de espectrinas que incluye α - y β -espectrina, α -actinina, distrofina y utrofina (Nicolas et al., 2014). Las proteínas α - y β -espectrina pueden formar dímeros o tetrámeros, α -actinina forma dímeros, mientras que distrofina y utrofina permanecen como monómeros (Broderick and Winder, 2005). La distrofina es codificada por el gen *DMD*, el cual es uno de los genes más grandes del genoma humano; se ubica en el brazo corto del cromosoma X, abarca 2.22 Mb y codifica un transcrito de 14 kb que dirige la expresión de distrofina (Hoffman et al., 1987). La transcripción del gen *DMD* es controlada por siete promotores independientes, específicos de tejido, que originan tres distrofinas de 427 kDa, denominadas “distrofinas de longitud completa” y cuatro isoformas de menor tamaño. Las isoformas de distrofina se denominan con las letras Dp seguidas de su peso molecular. La expresión de Dp427 es controlada por tres promotores distintos y se denominan Dp427c, Dp427m y Dp427p. Las isoformas de menor tamaño, cuya expresión es controlada por promotores internos, son: Dp260, Dp116, Dp140 y Dp71 (tabla 1 y figura 1). Además de estas isoformas, el *splicing* alternativo hacia el extremo 3' del mRNA del gen *DMD* produce numerosas variantes, tanto de la distrofina de longitud completa como de las isoformas de menor tamaño (Feener et al., 1989; Gazzoli et al., 2016; Tuffery-Giraud et al., 2017).

La caracterización del transcriptoma del gen *DMD* se ha dificultado por su tamaño y complejidad, ya que además de contener 79 exones y siete promotores, el gen *DMD* tiene intrones excepcionalmente largos (rango de 107 bp a 360 kb), dos sitios de poliadenilación y numerosos transcritos alternativos (Gazzoli et al., 2016).

Tabla 1. La expresión de las diferentes isoformas de distrofina está controlada por varios promotores ubicados a lo largo del gen *DMD*.

Isoforma	Promotor	Ubicación del promotor	Expresión	Referencias (reportes originales)
Dp427c	B (Brain)	5' río arriba del promotor M	Hipotálamo, corteza y músculos estriados. Tejidos fetales	(Barnea et al., 1990; Chelly et al., 1990; Gorecki et al., 1992)
Dp427m	M (Muscle)	5' del gen	Músculo esquelético y cardíaco. Tejidos fetales	(Barnea et al., 1990; Chelly et al., 1990)
Dp427p	P (Purkinje)	3' río abajo del promotor M	Neuronas cerebelares de Purkinje	(Gorecki et al., 1992; Holder et al., 1996)
Dp260	R (Retinal)	Intrón 29	Retina, cerebro y tejido cardíaco	(D'Souza et al., 1995)
Dp140	B3 (Brain3)	Intrón 44	Cerebro, retina y tejidos renales	(Lidov et al., 1995)
Dp116	S (Schwann cells)	Intrón 55	Nervios periféricos de adulto	(Byers et al., 1993)
Dp71	G (General)	Intrón 62	Cerebro, retina, riñón, hígado y pulmón	(Blake et al., 1992; Hugnot et al., 1992; Lederfein et al., 1992)

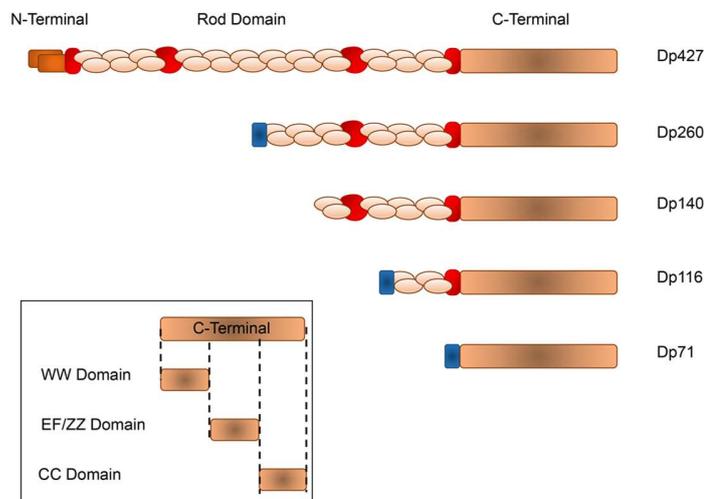


Figura 1. Esquema de las diferentes isoformas de distrofina. En el recuadro se muestran los principales dominios del extremo carboxilo, presente en todas las isoformas de distrofina. Modificado de (Leyva-Leyva et al., 2018).

1.2.2. Función de la distrofina y el complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina

Campbell y Kahl reportaron el aislamiento de distrofina de membranas de músculo esquelético y encontraron una estrecha asociación entre distrofina y un complejo de glicoproteínas (Campbell and Kahl, 1989) al que denominaron complejo de glicoproteínas asociadas a distrofina (DGC) (Ervasti et al., 1990; Ervasti and Campbell, 1991; Yoshida and Ozawa, 1990). La distrofina se une, por medio de su extremo carboxilo, a proteínas integrales de membrana y proteínas citosólicas que componen el DGC (Ervasti, 2007) (figura 2). El DGC incluye a las sintrofinas y α -distrobrevina, que son proteínas citoplasmáticas, y a los sarcoglicanos, sarcospan y distroglicano, que son proteínas transmembranales. La función de este complejo es comunicar el interior de la célula con la matriz extracelular. A través de α -distroglicano, el complejo puede unir varias proteínas de la matriz extracelular como perlecan en músculo esquelético, neurexinas en neuronas (Reissner et al., 2014; Sugita et al., 2001) y laminina y agrina en la glía; mientras que el dominio intracelular corto de β -distroglicano interactúa con distrofina. La distrofina, a su vez, se une a los filamentos de actina por medio de su dominio amino-terminal completando así el enlace entre el citoesqueleto y la matriz extracelular (figura 2). En el músculo esquelético, el DGC proporciona estabilidad al

sarcolema durante las contracciones musculares; en el caso del SNC, el papel que desempeña el DGC parece tener otras funciones dependiendo del tipo celular y es probable que en el cerebro predomine un papel de señalización.

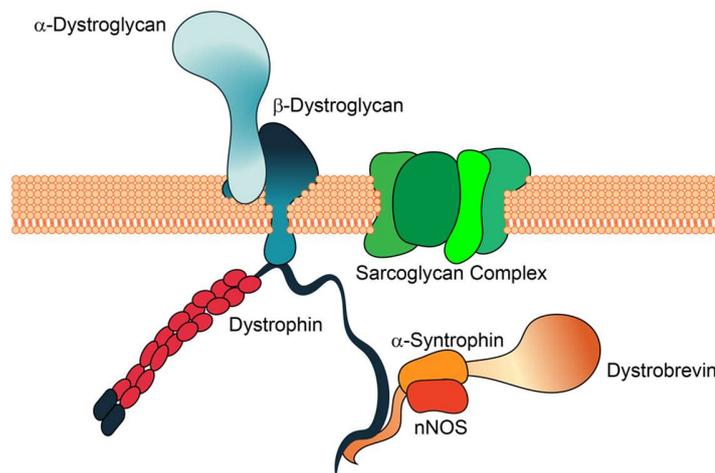


Figura 2. Organización molecular del DGC. Tomado de (Leyva-Leyva et al., 2018).

1.2.3. La ausencia de distrofina impacta el funcionamiento normal del sistema nervioso central

1.2.3.1. En el humano

La distrofina desempeña un papel importante en la señalización en el SNC y su ausencia o su alteración conducen a diversas patologías neurológicas. Existen reportes de pacientes con DMD y DMB que presentan discapacidad intelectual, trastorno del aprendizaje y algunos desórdenes neuropsiquiátricos que, a diferencia de los síntomas musculares, no son progresivos. La gravedad de la discapacidad intelectual tampoco se correlaciona con la severidad de la debilidad muscular. Incluso se han reportado casos de pacientes con mutaciones en el gen *DMD* que afectan solamente a Dp427 o a Dp71, que no producen distrofia muscular, pero sí ocasionan discapacidad intelectual (de Brouwer et al., 2014; Srour et al., 2008).

De acuerdo con un extenso metaanálisis que incluyó datos de 1146 pacientes con DMD obtenidos de 32 estudios publicados, el coeficiente intelectual (IQ) promedio de pacientes con DMD se encuentra en un valor de alrededor de 80, lo que corresponde a una desviación estándar por debajo del IQ promedio de 100 de la población general (Cotton et al., 2001; Cotton et al., 2005). Estos autores encontraron que el 34.8% de los pacientes con DMD tuvieron discapacidad intelectual (IQ menor a 70), con una mayoría en el rango de discapacidad intelectual leve (79.3%) y moderada (19.3%). Generalmente, se han determinado anormalidades en la función verbal, memoria y función ejecutiva (Wicksell et al., 2004). La mayoría de los estudios concuerdan que el IQ verbal está más afectado que el IQ de desempeño en los pacientes con DMD y que presentan dificultad del aprendizaje (Billard et al., 1998; Hinton et al., 2000). Incluso, en una población de pacientes con DMD que no presentan discapacidad intelectual global, se han observado deficiencias claras en aspectos específicos de la función ejecutiva como la memoria de trabajo y la inhibición (Battini et al., 2018), los cuales están orientados a la resolución de problemas complejos que requieren planeación. La prevalencia elevada de discapacidad intelectual (alrededor del 30%) en los pacientes con DMD contrasta con los valores del 1 al 3% estimados para la población general. Además de la discapacidad intelectual, los pacientes con DMD y DMB presentan una incidencia mayor de algunos desórdenes neuropsiquiátricos, en comparación con la población general. En el caso del trastorno por hiperactividad y déficit de atención, se ha reportado una frecuencia del 12-32% (Hendriksen and Vles, 2008; Pane et al., 2012) en comparación con el 3-7% en la población general.

Diversos estudios han mostrado una elevada prevalencia del trastorno del espectro autista entre los pacientes de DMD, con valores que alcanzan hasta el 21% (Colombo et al., 2017; Hinton et al., 2009; Ricotti et al., 2016). Adicionalmente, pacientes con DMD también presentan una incidencia incrementada de trastorno obsesivo-compulsivo (5-14%) (Banihani et al., 2015; Hendriksen and Vles, 2008; Lee et al., 2018). Finalmente, la epilepsia también es una comorbilidad asociada con DMD, con una prevalencia de 6.3% a 7.9% en estos pacientes (Hendriksen et al., 2018; Pane et al., 2013) en comparación con la población pediátrica general (0.5-1%). Además, se ha reportado que algunos desórdenes como el trastorno de hiperactividad y déficit de atención, trastorno obsesivo-compulsivo y ansiedad tienen una

prevalencia con un incremento adicional cuando la epilepsia está presente en pacientes con DMD (Hendriksen et al., 2018).

1.2.3.2. En el modelo de ratón *mdx*

El ratón *mdx* es el modelo animal más comúnmente usado para estudios de deficiencia de distrofina. El ratón *mdx* carece de las distrofinas de longitud completa debido a una mutación puntual espontánea en el exón 23 del gen *dmd*. El análisis de la secuencia del cDNA del ratón *mdx* reveló una sustitución de una citosina por una timina en la posición nucleotídica 3185, generando un codón de paro prematuro (Sicinski et al., 1989). A diferencia de los pacientes con DMD, los ratones *mdx* adultos no desarrollan deterioro en la movilidad general, lo que se ha atribuido a que se encuentran activos procesos de regeneración a lo largo de la vida de estos ratones (Turk et al., 2005). Al no tener alteraciones de la función motora que interfieran con las evaluaciones cognitivas, el ratón *mdx* resulta ser un modelo genético bastante útil para estudiar aspectos del SNC. Diversos estudios han reportado evidencias de que el ratón *mdx* presenta una variedad de deficiencias neurológicas, como las que se describen a continuación.

Los ratones *mdx* presentan un comportamiento defensivo incrementado en comparación con ratones silvestres, lo que se manifiesta por inmovilidad posterior a un procedimiento de manipulación (Comim et al., 2019; Vaillend and Chaussonot, 2017). El tratamiento de los ratones *mdx* con oligonucleótidos morfolinicos antisentido, que ocasionan el salto del exón 23 y restauran el marco de lectura, rescata la expresión de distrofina. Esta estrategia experimental permitió reducir parcialmente el comportamiento defensivo inducido por inmovilización en los ratones *mdx*, lo que sugiere que el incremento en la respuesta defensiva en este modelo se puede atribuir a la deficiencia de distrofina (Sekiguchi et al., 2009). Además, los ratones *mdx* mostraron un comportamiento tipo depresivo al ser evaluados mediante la prueba de nado forzado (Comim et al., 2019) o al utilizar el ensayo de suspensión de cola (Manning et al., 2014). En ambos ensayos, los ratones *mdx* estuvieron más tiempo inmóviles y presentaron menor latencia a la inmovilidad que los ratones silvestres, resultados acordes con un comportamiento tipo depresivo. Vaillend y colaboradores

presentaron evidencias de que los ratones *mdx* tienen afectada la memoria de reconocimiento de objetos, así como la memoria espacial a largo plazo, usando un protocolo de entrenamiento masivo en el laberinto de agua (Vaillend et al., 2004).

Los ratones *mdx* también manifiestan un comportamiento tipo ansiedad evaluado en el laberinto elevado plus, o mediante exploración de la zona central en un campo abierto o en un ensayo de elección luz-oscuridad (Comim et al., 2019; Manning et al., 2014; Rummelink et al., 2016). Sin embargo, se ha reportado una gran variabilidad en la expresión de este comportamiento, atribuida a la dependencia del ambiente del ensayo y a la duración de la prueba de ansiedad (Rummelink et al., 2016).

1.3. Interacción entre distrofina y canales iónicos o receptores

Como hemos visto, la distrofina tiene un papel importante en la función normal del SNC, y se cree que algunas de estas funciones dependen de la interacción de la distrofina y el DGC con algunos canales iónicos. La evidencia reportada por múltiples estudios apoya la idea de que la distrofina y los miembros del DGC actúan como andamios moleculares que regulan la organización estructural de ciertos microdominios de membrana especializados en donde se ubican los canales iónicos y otras proteínas de señalización (Constantin, 2014; Leyva-Leyva et al., 2018). Estas interacciones son cruciales para la homeostasis celular y las alteraciones en la organización de estos microdominios membranales tienen consecuencias sobre el funcionamiento correcto de los canales iónicos. En la tabla 2 se presenta un resumen de las interacciones que se han descrito entre el DGC y receptores o canales iónicos. Estos canales regulan diversas funciones celulares y, específicamente, los canales de calcio dependientes de voltaje participan en la regulación de procesos fisiológicos importantes.

Como podemos ver en la tabla 2, la mayor parte de las interacciones entre distrofina y los canales iónicos han sido descritas en músculo cardíaco y esquelético. Sin embargo, en el cerebro, específicamente en las neuronas y en la glía, también se han descrito interacciones entre la distrofina y algunos canales iónicos.

Tabla 2. Interacciones descritas de los canales iónicos con el DGC. Modificado de (Leyva-Leyva et al., 2018).

Canal/Receptor	Nombre	Tejido	Referencias
TRP	TRPC1 TRPC3 TRPC4 TRPV2	Músculo esquelético	(Iwata et al., 2003; Iwata et al., 2009; Millay et al., 2009; Sabourin et al., 2009; Vandebrouck et al., 2007)
Nav	Nav1.4 Nav1.5	Músculo esquelético Músculo cardíaco	(Gavillet et al., 2006; Gee et al., 1998; Hirn et al., 2008; Petitprez et al., 2011; Shy et al., 2014)
Cav	Tipo L	Músculo esquelético Músculo liso Músculo cardíaco	(Friedrich et al., 2004; Friedrich et al., 2008; Johnson et al., 2005; Koenig et al., 2014; Liu et al., 2020; Quignard et al., 2001; Sadeghi et al., 2002; Woolf et al., 2006)
K _{ir}	K _{ir} 4.1	Retina Cerebro	(Connors and Kofuji, 2002; Connors et al., 2004; Dalloz et al., 2003; Guadagno and Moukhles, 2004; Noel et al., 2005; Rurak et al., 2007; Satz et al., 2009)
BK	SLO-1 SLO-2	Músculo esquelético	(Abraham et al., 2010; Carre-Pierrat et al., 2006; Kim et al., 2009)
GABA	Tipo A	Hipocampo Amígdala	(Knuesel et al., 1999; Kueh et al., 2008; Kueh et al., 2011; Sekiguchi et al., 2009)
NMDA AMPA		Hipocampo Neuronas de Purkinje	(Daoud et al., 2009; Helleringer et al., 2018)

En los astrocitos, los canales de potasio tienen la función de promover el amortiguamiento del potasio en el SNC, por lo que es necesario que se encuentren localizados en dominios específicos en la membrana plasmática para que estos canales funcionen correctamente. Es interesante que en los astrocitos, la Dp71 tiene la función de controlar el direccionamiento y la distribución subcelular de los canales de potasio de rectificación entrante $K_{ir}4.1$ (Connors et al., 2004). Además, en estas células gliales, los canales $K_{ir}4.1$ co-localizan con el canal de agua, la acuaporina 4 (AQP4), lo cual sugiere que el amortiguamiento del potasio mediado por $K_{ir}4.1$ podría estar acoplado al transporte de agua a través de AQP4 (Nagelhus et al., 2004). Adicionalmente, AQP4 se asocia con $\alpha 1$ -sintrofina, Dp71 y β -dístroglicano en astrocitos perivasculares (Neely et al., 2001). $K_{ir}4.1$ y AQP4 pueden unir, cada uno, a una molécula de $\alpha 1$ -sintrofina, permitiendo que ambos canales sean parte del mismo complejo, lo que proporciona evidencia que el DGC funciona como un soporte para estos canales y determina su localización en subdominios membranales.

La ausencia de dístrofina conduce a un funcionamiento anormal de ambos canales, lo que tiene como consecuencia fisiológica el aumento en la concentración extracelular de iones K^+ y un incremento en la salida de agua de los astrocitos a los capilares, lo que provoca que los astrocitos se hinchen y se comprometa la función de la barrera hematoencefálica. Estos dos eventos generan activación glial y excitabilidad neuronal (Connors et al., 2004).

En las neuronas, la Dp427 contribuye a la localización correcta de los receptores GABA tipo A ($GABA_A$) en la densidad postsináptica de las neuronas del hipocampo, células piramidales corticales y células cerebelares de Purkinje. Dp427 co-localiza con los receptores $GABA_A$ en las sinapsis inhibitorias y parece jugar un papel crítico en el anclaje y agrupamiento de estos receptores (Knuesel et al., 1999); esta localización es necesaria para la transducción eficiente de señales sinápticas. La ausencia de Dp427 en las neuronas del ratón *mdx* provoca la difusión lateral de los receptores hacia regiones extrasinápticas y su desestabilización en la membrana, lo que puede incrementar la excitabilidad neuronal a consecuencia de una inhibición sináptica disfuncional (Hendriksen et al., 2015). También produce la reducción significativa del número y tamaño de las agrupaciones de los receptores $GABA_A$ en el hipocampo (Knuesel et al., 1999) y en la amígdala (Sekiguchi et al., 2009). La reducción en el

número de receptores funcionales localizados en las sinapsis GABAérgicas en las células cerebelares de Purkinje en el ratón *mdx* concuerda con el incremento de los receptores GABA_A extrasinápticos (Kueh et al., 2011). Los niveles de expresión de los receptores GABA_A no se modificaron, apoyando la idea de que se encuentra afectada la localización de estos receptores en las sinapsis en los ratones *mdx* y no la expresión de la proteína (Kueh et al., 2008). Esta deslocalización de los receptores GABA_A postsinápticos en los ratones *mdx* se ha asociado con el comportamiento tipo ansiedad observado en este modelo (Vaillend and Chausseot, 2017).

Resultados similares fueron obtenidos con la eliminación de distrobrevinas α y β , componentes del DGC, (Grady et al., 2006), ya que ratones knockout para estas dos proteínas presentaron disminución en los agrupamientos del receptor GABA_A, tanto en tamaño como en número, en las sinapsis inhibitorias en el cerebelo. De esta manera, las isoformas de distrofina Dp427 y la distrobrevina contribuyen al establecimiento de las sinapsis GABAérgicas y su función en la neurotransmisión, lo cual ayuda a explicar el comportamiento tipo ansiedad observado en los ratones *mdx* (Vaillend and Chausseot, 2017).

Adicionalmente, la Dp71 se detectó en las postsinapsis excitadoras, donde interactúa con los receptores NMDA y AMPA, los cuales son canales catiónicos activados por glutamato que permiten el paso de iones Na⁺ y K⁺. Estudios de electrofisiología realizados con ratones transgénicos carentes de Dp71 mostraron que la transmisión excitadora se encuentra incrementada selectivamente en las sinapsis glutamatérgicas en las neuronas cerebelares de Purkinje (Helleringer et al., 2018), así como en las sinapsis glutamatérgicas del área CA1 del hipocampo (Daoud et al., 2009). Estos resultados sugieren que la expresión de Dp71 en las neuronas tiene un papel en la regulación de la organización y función de las sinapsis glutamatérgicas (Daoud et al., 2009). En concordancia con estos resultados, mediante microscopía electrónica se demostró que la pérdida de Dp71 altera la organización ultraestructural presináptica de las sinapsis glutamatérgicas centrales (Miranda et al., 2011).

Como podemos observar, el papel que tienen las diferentes isoformas de distrofina en el cerebro parece estar relacionado con su capacidad de funcionar como un componente

central del DGC y estructurar un andamio molecular para regular la organización de moléculas de señalización. La interacción con los canales y receptores mencionados anteriormente abre la posibilidad de que alguna de las isoformas de distrofina o un componente del DGC pueda estar agrupando o regulando otra clase de canales iónicos, como por ejemplo los canales de calcio dependientes de voltaje. A continuación, expondremos las evidencias que podrían sustentar esta idea.

1.4. Interacción entre distrofina y los canales Cav

1.4.1. Generalidades sobre los canales Cav

Los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav) representan la principal vía de entrada de iones calcio a las células desde el espacio extracelular, en respuesta a una despolarización de la membrana plasmática. El calcio que entra a través de estos canales actúa como un segundo mensajero de la señalización eléctrica y contribuye a la regulación de diversos procesos fisiológicos como la contracción muscular, la transcripción génica, la plasticidad sináptica, la división celular, la secreción de hormonas, la liberación de neurotransmisores y la propagación del potencial de acción cardíaco (Catterall, 2011; Felix, 2005; Lacinova, 2005). Los Cav se clasifican, con base en su potencial de activación, en dos familias: a) Los canales HVA (canales de alto umbral de activación). Para su activación, estos canales requieren voltajes de membrana desde -30 mV. Esta familia agrupa a los canales Cav1 y Cav2. Los miembros de la familia HVA son complejos proteicos conformados por una subunidad principal α_1 (Cav α_1) regulada por las subunidades auxiliares β (Cav β), $\alpha_2\delta$ (Cav $\alpha_2\delta$) y, en músculo esquelético, también por la subunidad γ (Cav γ) (figura 3, imagen superior izquierda). La subunidad Cav α_1 es una proteína transmembranal que forma el poro por donde pasan los iones calcio, en la cual se encuentra el filtro de selectividad y el sensor de voltaje; también, contiene la mayoría de los sitios de unión para todos los agonistas y antagonistas conocidos que se unen al canal de calcio.

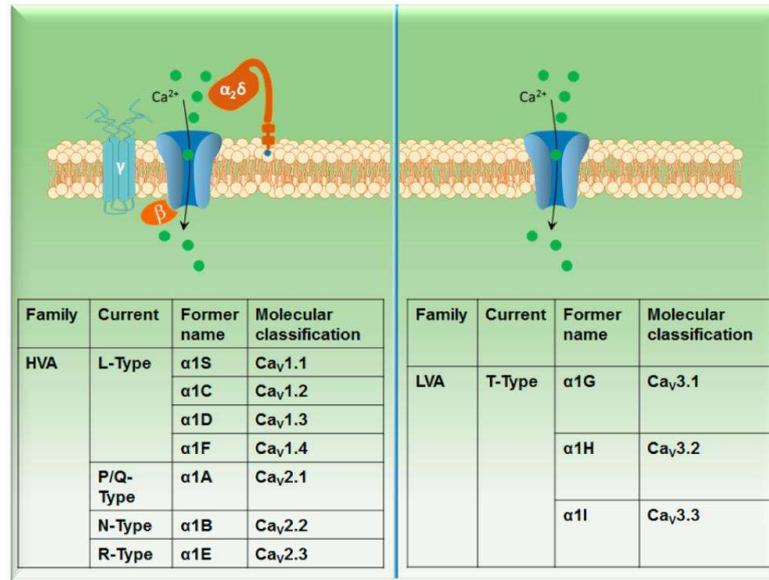


Figura 3. Organización molecular y clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje.

Tomado de (Gonzalez-Ramirez and Felix, 2018).

b) Los canales LVA (canales de bajo umbral de activación). Son activados a voltajes de alrededor de -70 mV. La corriente se activa e inactiva rápidamente y la conductancia de canal único es pequeña, por lo que también son llamados canales tipo T. En contraste con los canales de la familia HVA, los canales LVA pueden funcionar solamente con la subunidad Cav α 1, en ausencia de subunidades auxiliares (figura 3, imagen superior derecha).

1.4.2. Interacciones de distrofina y el DGC con los Cav en cerebro

Las interacciones entre el DGC y los Cav se han estudiado, principalmente, en músculo esquelético y cardíaco (tabla 2). Sin embargo, Müller y colaboradores en el 2010 describieron el proteoma de los canales de calcio Cav2 en el cerebro completo de ratón (Muller et al., 2010). Estos autores utilizaron una estrategia de proteómica cuantitativa en combinación con espectrometría de masas de alta resolución. El análisis mostró que los canales Cav2, compuestos de la subunidad Cav α 1 y la subunidad auxiliar Cav β , están embebidos en una red proteica integrada por un grupo de 200 proteínas. Entre las proteínas que encontraron interactuando con estos canales de calcio había algunas proteínas que forman parte del DGC

como la α -dystrobrevina y la enzima óxido-nítrico sintetasa NOS1, la cual se une a α -sintrofina (figura 2). Adicionalmente, en este análisis, los autores encontraron interacción con una proteína de la matriz extracelular llamada α -neurexina, la cual se une directamente a α -dystroglicano (Sugita et al., 2001), proteína que también forma parte del DGC.

Los Cav tienen una importancia crítica para la función normal del cerebro, por lo que su expresión inapropiada, su disfunción o desregulación, originan una amplia variedad de desórdenes neurológicos entre los que se incluyen la epilepsia mioclónica juvenil, desorden bipolar, esquizofrenia, migraña hemipléjica familiar, ataxia episódica, dolor neuropático, desorden del espectro autista, depresión y otros (Nanou and Catterall, 2018; Simms and Zamponi, 2014). Por lo tanto, el estudio de las interacciones que pueden formar los canales de calcio con la distrofina y los miembros del DGC en cerebro es de gran relevancia debido a que, en este tejido, el DGC participa en ensamblajes macromoleculares que anclan receptores y canales a sitios específicos de la membrana plasmática.

1.4.3 Papel de distrofina en la función de los canales iónicos

Uno de los papeles de la distrofina y el DGC es agrupar a diferentes proteínas de señalización para que lleven a cabo su función. Como hemos mencionado anteriormente, la distrofina y el DGC interactúan con algunos canales iónicos, y esta interacción regula la actividad de los canales. Siguiendo esta idea, la ausencia de distrofina puede afectar el funcionamiento normal de los canales iónicos y se han propuesto dos mecanismos diferentes (Leyva-Leyva et al., 2018). El primer mecanismo podría modificar directamente el funcionamiento de los canales, como se ha reportado para el caso de los canales TRPC (Millay et al., 2009; Sabourin et al., 2009) y los canales Nav1.4 (Hirn et al., 2008). El segundo mecanismo afecta la localización y el tráfico celular de los canales, como se demostró para los canales de sodio Nav1.5 (Petitprez et al., 2011) y los canales de potasio Kir4.1 (Rurak et al., 2007). Es interesante plantear la hipótesis de que la distrofina y el DGC podrían también interactuar con los canales Cav en el cerebro y de esta manera regular su actividad.

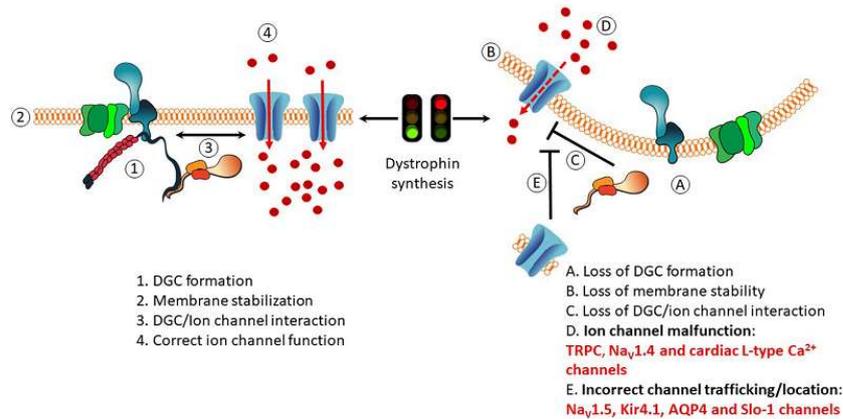


Figura 4. La ausencia de distrofina altera la función de los canales iónicos.

La distrofina agrupa a ciertos canales iónicos en la membrana plasmática y su ausencia altera la función de estos canales. Tomado de (Leyva-Leyva et al., 2018).

Hasta el momento, la función de la distrofina y el DGC ha sido estudiada detalladamente en el músculo esquelético (Blake et al., 2002; Davies and Nowak, 2006; McNally and Pytel, 2007); sin embargo, la función que realizan en el SNC no ha sido investigada con suficiente atención (Sekiguchi, 2005), por lo que nos hemos planteado el objetivo de estudiar las probables interacciones de los Cav2 con distrofina y el DGC en el cerebro.

2. JUSTIFICACIÓN

Las funciones neuronales dependen de la expresión y la correcta localización de los canales de calcio, por lo que es importante determinar si la distrofina y los miembros del DGC pueden establecer interacciones con los Cav2 y regular su actividad. Este trabajo contribuirá a conocer la base molecular de la participación de estos complejos multiproteicos en la homeostasis del calcio en el SNC.

3. HIPÓTESIS

La distrofina y el DGC interaccionan con los Cav2 en el cerebro y, de esta forma, pueden regular su actividad o su estabilidad en la membrana plasmática.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar las interacciones entre el DGC y los Cav2.1 en el cerebro de ratón y evaluar si estas interacciones regulan la actividad o la estabilidad en la membrana plasmática de los Cav2.1.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1. Identificar las interacciones del DGC con los Cav2.1 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación.

4.2.2. Localizar en cerebro la interacción del DGC con los Cav2.1 mediante inmunohistoquímica y el ensayo de ligamiento por proximidad (PLA), utilizando anticuerpos que reconozcan a las proteínas de interés.

4.2.3. Amplificar el cDNA completo de la Dp140 y de α 1-sintrofina de ratón y clonarlos en el vector pcDNA3.1-CT-GFP.

4.2.4. Amplificar el cDNA completo de Cav β_{4e} de ratón y clonarlo en el vector pCMV-Tag2B.

4.2.5. Transfectar células HEK-293 con el complejo del canal Cav2.1/Cav $\alpha_2\delta$ -1/Cav β_{4e} en presencia o ausencia de la Dp140 y α 1-sintrofina.

4.2.6. Evaluar los cambios en la vida media del Cav2.1 mediante ensayos con cicloheximida en presencia o ausencia de la Dp140 y α 1-sintrofina.

4.2.7. Medir la actividad de los Cav2.1 mediante registros electrofisiológicos utilizando la técnica de patch-clamp en presencia o ausencia de la Dp140 y α 1-sintrofina.

5. METODOLOGÍA

5.1. Manejo de animales

Los ratones macho de la cepa singénica C57BL/6J de 8 a 10 semanas de edad se mantuvieron en un ambiente de ciclos controlados de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, así como acceso libre a agua y alimentos. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con los lineamientos éticos estipulados dentro de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999 "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" y fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Hospital General "Dr. Manuel Gea González" (Ciudad de México, México).

5.2. Ensayos de inmunoprecipitación

Se extrajeron proteínas totales de cerebro completo, hipocampo y cerebelo de ratón. Cada tejido se homogenizó con buffer de inmunoprecipitación (IP) [Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, Tritón X-100 1%, PMSF 0.5 mM, NaF 10 mM, Na₃VO₄ 1 mM y mezcla de inhibidores de proteasas libre de EDTA Complete 2X (Roche Applied Science)] a 4°C. Las proteínas se cuantificaron utilizando el método del ácido bicinonínico (Smith et al., 1985). Alícuotas de 1-2 mg de proteínas totales se mezclaron con 30 µl de Proteína G Agarosa recombinante (rPGA, Invitrogen) previamente equilibrada con buffer IP conteniendo BSA (albúmina sérica bovina) al 1%, como agente bloqueador, y se incubaron a 4°C con agitación constante durante 2 horas en un volumen final de 500 µl con el fin de preclarificar los lisados proteicos. La rPGA fue eliminada por centrifugación a 12,470 x g durante 5 min y se recuperaron los sobrenadantes. Los extractos proteicos preclarificados se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante con 20 µl de rPGA nueva (previamente equilibrada y bloqueada) y con cada uno de los siguientes anticuerpos específicos (ver Tabla 3): 5 µl de anti-distrofina H4, 2.5 µl anti-α1-sintrofina C4, 2.5 µg de anti-Cavα_{2δ}-1 o anti-GST (IgG₀ irrelevante) como un control negativo. Posteriormente, los complejos inmunes fueron recuperados por centrifugación a 12,470 x g durante 5 min y lavados 3 veces con 1 ml de

buffer de lavado [Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 1%, SDS 0.1%, PMSF 0.5 mM] y dos veces con 500 μ l de PBS a 4°C con agitación constante durante 10 min. Después de centrifugación a 12,470 x g durante 5 min, las pastillas fueron suspendidas con buffer de muestra Laemmli (Laemmli, 1970) 2X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.004%) y calentadas en un baño con agua a ebullición durante 5 min. Después de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) desnaturizantes Mini-Protean TGX Precast al 10%, las proteínas co-inmunoprecipitadas fueron analizadas por ensayos de Western blot.

5.3. Western blot

Alícuotas de 50-100 μ g de extractos de proteínas totales y proteínas co-inmunoprecipitadas se diluyeron con buffer de muestra Laemmli 2X, calentadas en agua a ebullición durante 5 min y separadas por SDS-PAGE. Después de electroforesis, las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF (Amersham Pharmacia GE Healthcare), las cuales fueron bloqueadas con caseína grado Hammerstein (MP Biomedicals) al 1% en TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, NaCl 15 mM, Tween 20 0.05%) durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas a 4°C toda la noche en agitación constante con los siguientes anticuerpos primarios (ver Tabla 3) diluidos en TBS-T: anti-Cav2.1, anti-Cav α 2 δ -1, anti-distrofina H4, anti-Cav β 1, anti-Cav β 2, anti-Cav β 3 o anti-Cav β 4. Después de 3 lavados con TBS-T, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes dependiendo del origen del anticuerpo primario usado: anti-ratón de cabra conjugado a HRP (Horseradish peroxidase) (Zymed) o anti-conejo de cabra conjugado a HRP (Jackson ImmunoResearch) diluidos en TBS-T conteniendo 5% de leche sin grasa. La incubación se realizó a temperatura ambiente durante 1 h en agitación constante. La detección quimioluminiscente se realizó con el Sistema Immun-Star HRP (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se expusieron placas de rayos X a la membrana durante diferentes tiempos.

5.4. Inmunohistoquímica

Los ratones fueron anestesiados con una combinación de ketamina (100 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) por vía intramuscular. Una vez anestesiados, se sometieron a perfusión cardíaca a través del ventrículo izquierdo utilizando PBS frío a pH 7.4, seguido por una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. Los cerebros completos se retiraron cuidadosamente de los cráneos y se fijaron por inmersión en PFA al 4% en PBS durante 24 h a 4°C. Posteriormente, los cerebros se sumergieron en soluciones de sacarosa al 10%, 20% y 30% (en PBS) durante 24 h en cada una. Después, los cerebros fueron embebidos en Tissue-Tek O.C.T., se congelaron y se realizaron cortes coronales de 20 µm en un criostato. Los cortes se mantuvieron en PFA al 4% en PBS hasta su uso. Los cortes se sometieron a recuperación de antígeno (SDS al 1% en PBS durante 5 min a temperatura ambiente), permeabilización (Tritón X-100 al 0.2% en PBS durante 10 min) y después incubación con solución de bloqueo [BSA (Jackson ImmunoResearch) 1%, gelatina 0.1%, suero fetal bovino (SFB) 2%, Tritón X-100 0.1% en PBS] a 37°C durante 30 min en una cámara húmeda previamente calentada. Los cortes se incubaron toda la noche a 4°C, en una cámara húmeda, con diluciones 1:50 de los anticuerpos primarios (ver Tabla 3) en las combinaciones siguientes: anti-distrofina MANDRA1 con anti-Cav2.1 y anti-distrofina H4 con anti-Cav α 2 δ -1 (Sigma-Aldrich, Inc.).

5.5. Ensayo de ligamiento por proximidad

Las interacciones de distrofina con Cav2.1 y Cav α 2 δ -1 en cerebro y en cerebelo se detectaron mediante el ensayo de ligamiento por proximidad (PLA) (Alam, 2018) usando el Duolink *in situ* red starter kit (Sigma-Aldrich, Inc.) para la combinación de anticuerpos de ratón/conejo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para visualizar las estructuras neuronales, los cortes se incubaron con el marcador neuronal conjugado con Alexa Flúor 488 (ver Tabla 3) durante 2 h a temperatura ambiente. La señal de fluorescencia en rojo (624 nm) se detectó usando el mismo filtro que corresponde a Texas Red. Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Zeiss LSM 710 Duo usando el objetivo de inmersión 63X. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa Zen 2012.

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en este trabajo.

Anticuerpo	Clonalidad / Isotipo	Posición del antígeno (Inmunógeno)	Referencia / Fuente
H4 (pan-distrofinas)	Policlonal / conejo IgG	C-terminal aa 3663-3678	(Daoud et al., 2009)
MANDRA1 (pan-distrofinas)	monoclonal / ratón IgG1	C-terminal aa 3558-3684	ab7164, Abcam
C4 (α 1-sintrofina)	policlonal / conejo IgG	aa 141-206	(Daoud et al., 2009)
Cav α 2 δ -1	policlonal / conejo IgG	N-terminal aa 27-41	ACC-015, Alomone Laboratories
Cav α 2 δ -1	monoclonal / ratón IgG2a	conejo subunidad α 2	D219, Sigma-Aldrich, Inc.
GST	monoclonal / ratón IgG1k	GST de <i>S. japonicum</i>	sc-374171, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Cav2.1	policlonal / conejo IgG	aa 865-881 rata Cav2.1	ACC-001, Alomone Laboratories
Cav β 1	monoclonal / ratón IgG2a	recombinante humano Cav β 1	sc-134377, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Cav β 2	monoclonal / ratón IgG1k	recombinante humano Cav β 2	sc-81890, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Cav β 3	monoclonal / ratón IgG1	recombinante rata Cav β 3	sc-130560, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Cav β 4	monoclonal / ratón IgG2a	C-terminal aa 425-463 humano	sc-376432, Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Marcador neuronal	monoclonal / ratón IgG1	conjugado con Alexa Flúor 488	MAB2300X, Millipore Corporation
Actina	monoclonal / ratón	región central conservada	Dr. J. M. Hernández, CINVESTAV

5.6. Amplificación del cDNA de Dp140, α 1-sintrofina y Cav β _{4e}

El RNA total se aisló de cerebro completo de ratón utilizando el reactivo TRIzol™ (Invitrogen) (Chomczynski, 1993). Para sintetizar el cDNA, se realizó la transcripción reversa con 1 μ g de RNA total utilizando el sistema de transcripción ImProm-II™ (Promega Corporation). Posteriormente, se realizó la amplificación de la región codificante de Dp140, α 1-sintrofina y Cav β _{4e} por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para cada secuencia.

a) Dp140. Debido a que no se ha reportado en el NCBI la secuencia de la Dp140 de ratón, realizamos el alineamiento de la secuencia de Dp140 de humano (NM_004013) con la secuencia de distrofina de longitud completa de ratón (NM_007868) para ubicar la región que corresponde a la isoforma Dp140. Una vez ubicado el codón de inicio, se diseñaron los iniciadores que flanquean toda la región que corresponde a Dp140. Iniciador sentido (F): 5'-ATGCCATCTTCCTTGATG-3' e iniciador anti-sentido (R): 5'-CCATTGTGTCCTCTCTCAT-3'. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial (94°C / 5 min); 40 ciclos (desnaturalización a 94°C / 30 s, alineamiento a 52°C / 10 s y extensión a 68°C / 4 min) y extensión final (68°C / 10 min).

b) α 1-sintrofina (NM_009228). Iniciador sentido (F): 5'-ATGGCGTCAGGCAGGCGC-3' e iniciador anti-sentido (R): 5'-CGGCCAAGAGCCCCAAGCG-3'. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial (94°C / 5 min); 30 ciclos (desnaturalización a 94°C / 20 s, alineamiento a 55°C / 20 s y extensión a 68°C / 2 min) y extensión final (68°C / 10 min).

c) Cav β _{4e} (NM_001285428). Iniciador sentido (F): 5'-GGATCCATGGTATCAGGAACATTCCG-3' e iniciador anti-sentido (R): 5'-GTCGACTCAAAGCCTATGTCTGGGAGT-3'. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial (94°C / 5 min); 30 ciclos (desnaturalización a 94°C / 30 s, alineamiento a 58°C / 10 s y extensión a 68°C / 1 min) y extensión final (68°C / 10 min).

5.7. Clonación de Dp140, α 1-sintrofina y Cav β _{4e} en vectores de expresión

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1%, se visualizaron las bandas amplificadas por tinción con bromuro de etidio y se purificaron usando el QIAquick gel extraction kit (Qiagen). Posteriormente, Dp140 y α 1-sintrofina se clonaron en el vector pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO® (Invitrogen) para expresar estas proteínas con la

proteína verde fluorescente (GFP) fusionada al extremo carboxilo, siguiendo las especificaciones del fabricante. La Cav β_{4e} se clonó en los sitios BamHI y Sall del vector pCMV-Tag2B (Agilent Technologies, Inc.) con el fin de expresar a esta proteína fusionada con el epítipo FLAG en el extremo amino. Las clonas se caracterizaron por medio de análisis de restricción y fueron secuenciadas en un secuenciador automatizado ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer/Applied Biosystems) para la verificación definitiva de identidad.

5.8. Cultivo celular y transfección

Las células HEK (Human embryonic kidney)-293 (ATCC, CRL-11268) se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, GIBCO) con alta glucosa suplementado con 10% de SFB, L-glutamina al 1%, piruvato de sodio 110 mg/l y antibióticos, a 37°C bajo una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂ / 95% de aire. Las células HEK-293 se cultivaron en cajas Petri de 35 mm a una densidad de 60-70% de confluencia. Para la condición control, las células HEK-293 se transfectaron transitoriamente con 1 μ g de cada uno de los siguientes plásmidos que contienen el cDNA de Cav2.1 α_{1A-2} de humano (AF004883) (Hans et al., 1999a; Hans et al., 1999b), Cav $\alpha_{2\delta-1}$ (M86621) (Kim et al., 1992) y Cav β_{4e} (esta tesis) y se mezclaron con 12 μ l de TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) en 200 μ l de DMEM libre de suero. Para la condición problema, además de la combinación de plásmidos usados anteriormente, se agregaron los vectores pcDNA3.1-Dp140-GFP (esta tesis) y pcDNA3.1- α 1-sintrofina-GFP (esta tesis). Para las mediciones electrofisiológicas, ambas condiciones (control y problema) se co-transfectaron con 0.6 μ g de un plásmido de cDNA que codifica a GFP (Green-Lantern; Invitrogen) a fin de identificar y seleccionar a las células HEK-293 transfectadas.

5.9. Determinación de la vida media de la proteína Cav2.1

La vida media del Cav2.1 se determinó mediante el ensayo de inhibición de la síntesis de proteínas utilizando cicloheximida (CHX) (Kao et al., 2015). Brevemente, las células HEK-293 se transfectaron con la combinación de los plásmidos Cav2.1 α_{1A-2} /Cav $\alpha_{2\delta-1}$ /Cav β_{4e} en ausencia y presencia de Dp140 y α 1-sintrofina. Después de 24 horas de la transfección, las

células se trataron con CHX (Sigma-Aldrich, Inc.) a una concentración de 50 µg/ml en medio DMEM. Se cosecharon las células a las 0, 8, 24, 32 y 48 horas después del tratamiento y se lisaron para obtener extractos de proteínas totales; se cuantificaron los extractos y se analizaron por Western blot usando anticuerpos anti-Cav2.1 y anti-actina como control de carga. Después de la detección quimioluminiscente, se cuantificó la intensidad relativa de cada una de las bandas correspondientes a las proteínas Cav2.1 y actina con el programa GelAnalyzer 19.1. Los promedios de las densidades de Cav2.1, de tres ensayos independientes, se normalizaron contra los promedios de las densidades de actina en cada tiempo. Posteriormente, los datos se normalizaron contra el tiempo 0 y se obtuvo el logaritmo natural (ln) de los datos, se graficaron y la curva se ajustó a una función exponencial de primer orden utilizando la regresión lineal por el método de mínimos cuadrados. Esta maniobra fue usada para determinar la constante de la tasa de decaimiento (k , la pendiente), la cual se usó para calcular el valor de la vida media de la proteína Cav2.1 con la siguiente fórmula:

$$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k}$$

En donde, $T_{1/2}$ es la vida media y k es la constante de la tasa de decaimiento (Belle et al., 2006). Los experimentos se realizaron por triplicado y los datos agrupados se sometieron a análisis estadístico.

5.10. Electrofisiología

Después de 48 h de la transfección, se registraron las corrientes de Ba^{2+} a través de los canales Cav2.1 recombinantes. El registro electrofisiológico se realizó usando la técnica de patch-clamp en la configuración de célula completa (Sandoval et al., 2004) a temperatura ambiente (22-24°C). La solución extracelular contenía: $BaCl_2$ 5 mM, TEA-Cl 125 mM, HEPES 10 mM y glucosa 15 mM (pH 7.3). La solución intracelular contenía: CsCl 110 mM, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 10 mM, HEPES 10 mM, Na-ATP 4 mM, Na-GTP 0.1 mM (pH 7.3). Las células transfectadas se identificaron al observar la fluorescencia de la GFP en un microscopio invertido Nikon TE300. Los registros se realizaron utilizando un amplificador Axopatch 200B

(Axon Instruments; Molecular Devices, LLC.). Las corrientes se digitalizaron a una frecuencia de muestreo de 5.71 kHz y se filtraron a 2 kHz (filtro Bessel de cuatro polos). La adquisición y el análisis de los datos se realizó empleando una interfase Digidata 1320A (Molecular Devices, LLC.) con el programa pClamp10 (Molecular Devices, LLC.) y SigmaPlot versión 11.0 (Systat Software, Inc.) como se ha reportado con anterioridad (Sandoval et al., 2007a; Sandoval et al., 2007b). Los componentes de fuga lineal y la capacitancia residual se restaron en línea usando un protocolo P/4. La capacitancia de membrana (C_m) se determinó como se ha descrito previamente (Avila et al., 2004) y se usó para normalizar las corrientes.

6. RESULTADOS

6.1. Distrofina y α 1-sintrofina interactúan con el canal Cav2.1 en el cerebro

Como hemos visto, la distrofina interactúa con una gran variedad de canales iónicos y receptores (tabla 2). Con el fin de identificar las probables interacciones de distrofina con los canales Cav2.1, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación a partir de extractos proteicos totales de cerebro. El primer acercamiento fue usar un anticuerpo que reconoce a todas las isoformas de distrofina (H4) e inmunoprecipitarlas del extracto de cerebro de ratón. Posteriormente, mediante Western blot se detectaron a las proteínas que co-inmunoprecipitaban con la distrofina. Como se observa en la figura 5A, se logró detectar una banda de ~190 kDa tanto en el control de carga (carril IN) como en la inmunoprecipitación (carril IP) que corresponde al peso reportado para el canal Cav2.1 (Aikawa et al., 2017; Westenbroek et al., 1995).

Además, realizamos ensayos de inmunoprecipitación con un anticuerpo dirigido contra α 1-sintrofina, que forma parte del DGC. El análisis de Western blot nos mostró que el canal Cav2.1 también co-inmunoprecipitó con α 1-sintrofina (figura 5B, carril IP). Estos ensayos de co-inmunoprecipitación fueron específicos, ya que no se detectaron estas proteínas con un anticuerpo no relacionado que se usó como control negativo de interacción (carril IgG₀, en ambos incisos). Estos resultados sugieren que distrofina y α 1-sintrofina interactúan con el canal Cav2.1 en el cerebro del ratón.

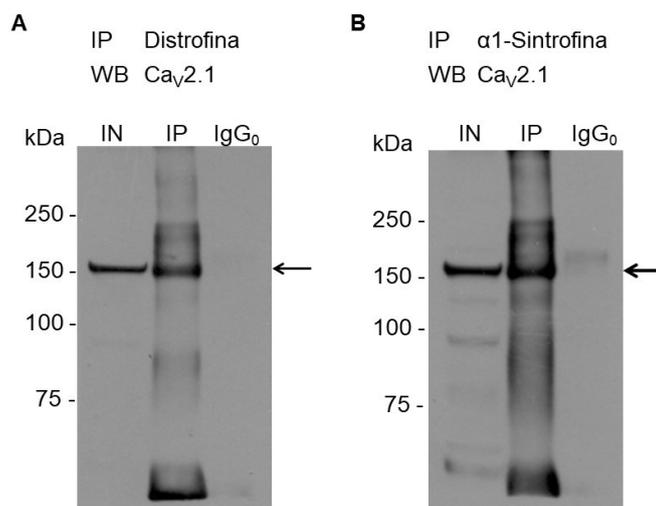


Figura 5. Interacción de los canales Cav2.1 con distrofina y α1-sintrofina. A) Análisis de Western blot con anticuerpo específico anti-Ca_v2.1 después de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-distrofina. B) Análisis de Western blot con anticuerpo específico anti-Ca_v2.1 después de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-α1-sintrofina. Las flechas muestran una banda de ~190 kDa que corresponde al canal Cav2.1 que co-inmunoprecipita con distrofina y α1-sintrofina. IP, anticuerpo usado para la inmunoprecipitación; WB, anticuerpo usado para el Western blot. Carriles: IN, control de carga; IP, co-inmunoprecipitación; IgG₀, control negativo. Los ejemplos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

6.2. Dp140 interactúa con la subunidad auxiliar Cavα2δ-1 en el cerebro

Los canales Ca_v2.1 están asociados a las subunidades auxiliares Cavα2δ y Cavβ (Catterall, 2011), por lo que decidimos investigar si estas subunidades eran parte de las interacciones que observamos entre distrofina y el canal Ca_v2.1 en el cerebro. Realizamos ensayos de inmunoprecipitación utilizando como anticuerpo inmunoprecipitante al H4 y se realizó el análisis de Western blot con un anticuerpo dirigido contra la subunidad auxiliar Cavα2δ-1, la cual es común a los siete canales Cav que integran a la familia HVA. Como podemos observar en la figura 6A, se detectó una banda de aproximadamente 140 kDa que corresponde al peso esperado de la subunidad Cavα2δ-1, tanto en el control de carga (carril IN), como en la co-inmunoprecipitación (carril IP), lo que sugiere la interacción entre distrofina y la subunidad Cavα2δ-1. Esta interacción es específica porque en el control negativo (carril IgG₀) no se detectó a la subunidad Cavα2δ-1.

El siguiente paso fue conocer la isoforma de la distrofina que estaba interactuando con el complejo del canal $Ca_v2.1$. Como se sabe, en el cerebro de ratón adulto se expresan varias isoformas de distrofina, principalmente Dp427, Dp140 y Dp71, siendo Dp71 la isoforma más abundante en este tejido. Para identificar cuál de estas isoformas de distrofina estaba interaccionando con la subunidad auxiliar $Ca_v\alpha_2\delta-1$, realizamos un ensayo de co-inmunoprecipitación cruzada, en el cual utilizamos, como anticuerpo inmunoprecipitante, el anticuerpo dirigido contra $Ca_v\alpha_2\delta-1$. El análisis de Western blot se realizó con el anticuerpo H4 que reconoce a estas tres isoformas de distrofina que se expresan en cerebro y algunas variantes pequeñas de la Dp71 (con un peso menor que Dp71, figura 6B, carril IN). Estas isoformas de distrofina se observan en el primer carril de la figura 6B, que corresponde al control de carga (IN). En el segundo carril (IP), podemos observar que solamente la isoforma de distrofina Dp140 co-inmunoprecipitó con $Ca_v\alpha_2\delta-1$ en los lisados de cerebro de ratón, a pesar de que Dp71 es la isoforma más abundante en el cerebro, como se puede observar en la figura 6B (IN). Como control negativo del ensayo de inmunoprecipitación se utilizó un anticuerpo no relacionado (carril IgG₀).

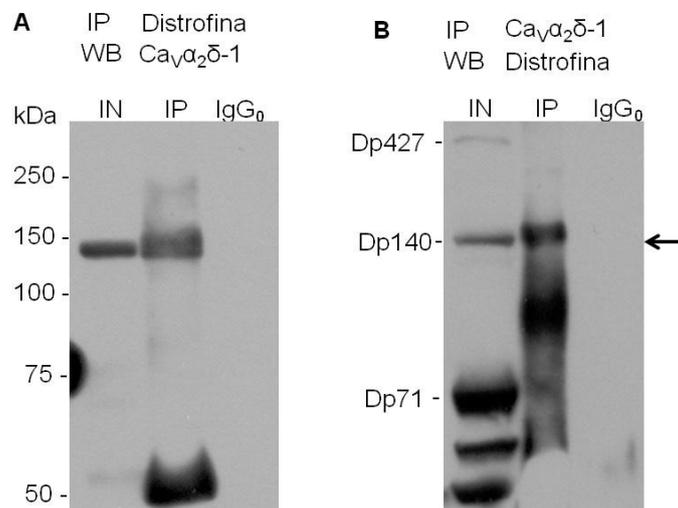


Figura 6. Interacción de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ con distrofina. A) Análisis de Western blot, posterior a la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-distrofina, muestra la detección de una banda de 140 kDa que corresponde a la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta-1$ (carril IP). B) Análisis de Western blot, posterior a la inmunoprecipitación con un anticuerpo específico anti- $Ca_v\alpha_2\delta-1$. En el carril IN se observan a todas las isoformas de distrofina expresadas en el cerebro (Dp427, Dp140, Dp71 y variantes pequeñas de Dp71) detectadas con el anticuerpo H4. En el carril IP se observa que

solamente la Dp140 co-inmunoprecipita con la subunidad Cav $\alpha_2\delta$ -1 (flecha). Como control negativo (carril IgG₀), se usó un anticuerpo irrelevante. Los ejemplos mostrados son representativos de tres experimentos independientes.

6.3. Las subunidades auxiliares Cav β y Cav $\alpha_2\delta$ -1 interactúan con α 1-sintrofina en el cerebro

En el cerebro se expresan una gran variedad de isoformas de la subunidad auxiliar Cav β (Buraei and Yang, 2010); estas isoformas tienen una amplia distribución, pero es en el hipocampo y el cerebelo donde hay una mayor expresión. Por esta razón, en los ensayos de inmunoprecipitación, además de extractos proteicos de cerebro completo, incluimos extractos de cerebelo y de hipocampo con el propósito de ubicar en estas regiones la interacción de α 1-sintrofina y las diferentes subunidades auxiliares Cav β . La inmunoprecipitación se realizó con un anticuerpo dirigido contra α 1-sintrofina y el Western blot se hizo con los anticuerpos que reconocen a cada una de las cuatro diferentes subunidades Cav β .

Como se puede observar en la figura 7A, la subunidad Cav β_1 no co-inmunoprecipita con la α 1-sintrofina. La subunidad Cav β_2 tiene un peso molecular aparente de 68 kDa (carril IN); sin embargo, se observa que inmunoprecipita una proteína de menor tamaño (carril IP), que posiblemente sea una isoforma pequeña de Cav β_2 . Esta isoforma se expresa principalmente en cerebelo, mientras que en los extractos de hipocampo y de cerebro total no se alcanza a detectar. En el caso de Cav β_3 , que tiene un peso molecular de 55 kDa, también se encontró que una isoforma de menor peso co-inmunoprecipitó con α 1-sintrofina; al parecer esta isoforma se expresa en cerebelo e hipocampo, mientras que en los extractos de cerebro total no se distingue. Para la subunidad Cav β_4 de 58 kDa ocurrió algo similar, una banda de menor peso es la que co-inmunoprecipitó con α 1-sintrofina. Esta isoforma pequeña de Cav β_4 se observa en los extractos de cerebro total y cerebelo, mientras que en el hipocampo su expresión es baja.

Finalmente, también se encontró la interacción entre la subunidad Cav $\alpha_2\delta$ -1 y α 1-sintrofina en los tres distintos extractos. Como podemos observar en la figura 7B, se detectó una banda de aproximadamente 140 kDa que corresponde al peso esperado de la subunidad

auxiliar $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$, tanto en el control de carga (carril IN), como en la co-inmunoprecipitación (carril IP). En este caso, la expresión de esta subunidad es igual en el cerebro total, cerebelo e hipocampo.

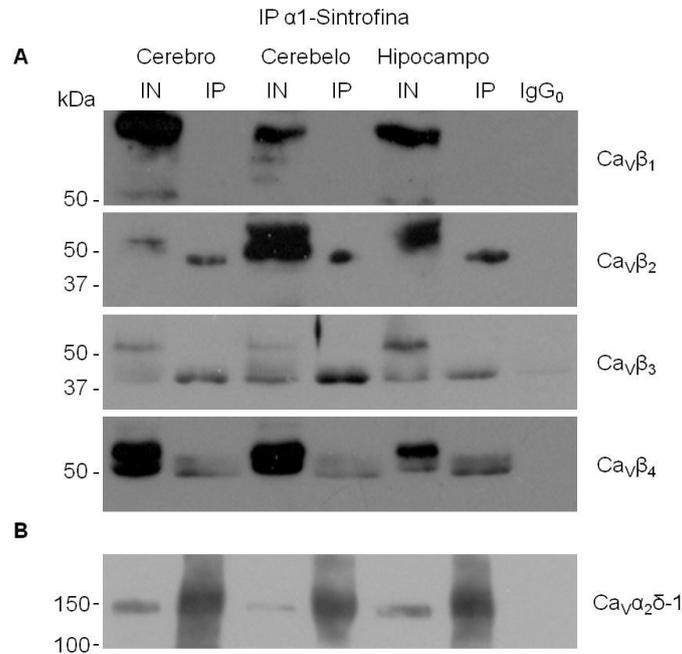


Figura 7. Interacción de $\alpha 1$ -sintrofina con las diferentes subunidades auxiliares. A) Análisis de Western blot con anticuerpos específicos anti- $\text{Cav}\beta_1$, anti- $\text{Cav}\beta_2$, anti- $\text{Cav}\beta_3$ y anti- $\text{Cav}\beta_4$. B) Western blot con anticuerpo específico anti- $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$. La inmunoprecipitación se realizó con anticuerpo anti- $\alpha 1$ -sintrofina en extractos proteicos de cerebro completo, cerebelo e hipocampo de ratón.

6.4. Co-localización entre $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$ y distrofina en el cerebro de ratón

Los experimentos de co-inmunoprecipitación nos permitieron definir la composición de un complejo de proteínas formado por Dp140, $\alpha 1$ -sintrofina y el complejo del canal $\text{Cav}2.1/\text{Cav}\alpha_2\delta-1/\text{Cav}\beta$. La siguiente pregunta de esta investigación fue determinar la localización de este complejo en el cerebro de ratón, para lo cual realizamos ensayos de inmunohistoquímica (IHC) utilizando cortes coronales de cerebro completo. En primer lugar, realizamos ensayos de IHC mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos dirigidos contra la subunidad $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$ y distrofina. Las dos proteínas se encuentran distribuidas en

todo el cerebro de ratón (figura 8), y se pudo observar que existe cierto grado de co-localización en varias regiones del cerebro. También observamos que mediante esta técnica la sensibilidad que tenemos es muy baja. Sin embargo, a pesar de esta limitación, podemos ver zonas en color amarillo que indican la co-localización de ambas proteínas. Se ve una aparente co-localización de estas dos proteínas en la capa polimórfica del giro dentado del hipocampo, en la capa molecular del giro dentado y la capa stratum oriens del CA1 (figura 7, óvalos blancos).

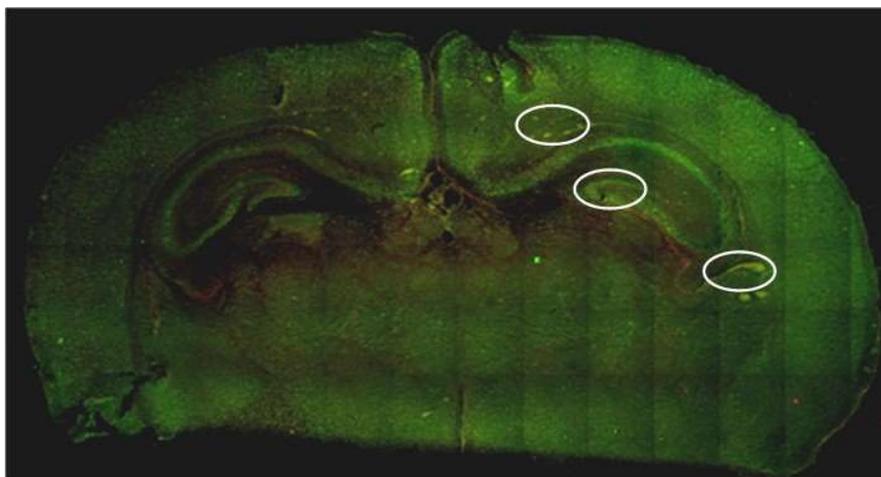


Figura 8. Co-localización de la distrofina y la subunidad $Cav\alpha_2\delta-1$ en el cerebro.

Se observa la co-localización de distrofina y la subunidad $Cav\alpha_2\delta-1$ en la región del hipocampo. Imágenes confocales de barrido en cortes coronales de 20 μm del cerebro completo de ratón. Los cortes se incubaron con anticuerpos específicos anti-distrofina y anti- $Cav\alpha_2\delta-1$, seguidos por los anticuerpos secundarios Alexa flúor 555 (rojo) y Alexa flúor 488 (verde) respectivamente. Esta figura fue tomada con un objetivo 10X, no tiene una escala de tamaño ya que la figura es una composición de múltiples fotografías.

6.5. Interacción entre distrofina/ $Cav2.1$ y distrofina/ $Cav\alpha_2\delta-1$ en el hipocampo

Debido a la baja resolución que tiene la IHC para detectar la co-localización de dos proteínas (aproximadamente 200 nm), decidimos utilizar el ensayo PLA, el cual permite ubicar la interacción *in situ* entre dos proteínas que se encuentran a una distancia menor de 40 nm (Alam, 2018); las señales de interacción se amplifican y se visualizan como puntos fluorescentes en el tejido o la célula. Realizamos el análisis de PLA en cortes coronales del

cerebro y cerebelo de ratón con la combinación de los anticuerpos MANDRA1/Cav2.1 y H4/Cav $\alpha_2\delta$ -1. Las señales positivas del PLA (puntos rojos) fueron detectadas predominantemente en regiones que corresponden a la formación hipocampal CA1, CA3 y el giro dentado (figura 9A), lo cual es indicativo de interacción entre Cav2.1 y distrofina en el hipocampo. Adicionalmente, las señales positivas también fueron detectadas entre Cav $\alpha_2\delta$ -1 y distrofina en las mismas áreas del hipocampo (figura 9B). Se puede observar una interacción notablemente mayor en el área CA1 del hipocampo en comparación con CA3 y el giro dentado, tanto entre distrofina y el canal Cav2.1, como en la interacción entre distrofina y la subunidad auxiliar Cav $\alpha_2\delta$ -1. Al ampliar las imágenes de la región CA1, podemos ver que algunos de los puntos de interacción siguen una trayectoria lineal a lo largo de las prolongaciones neuronales (figura 10, panel de acercamiento).

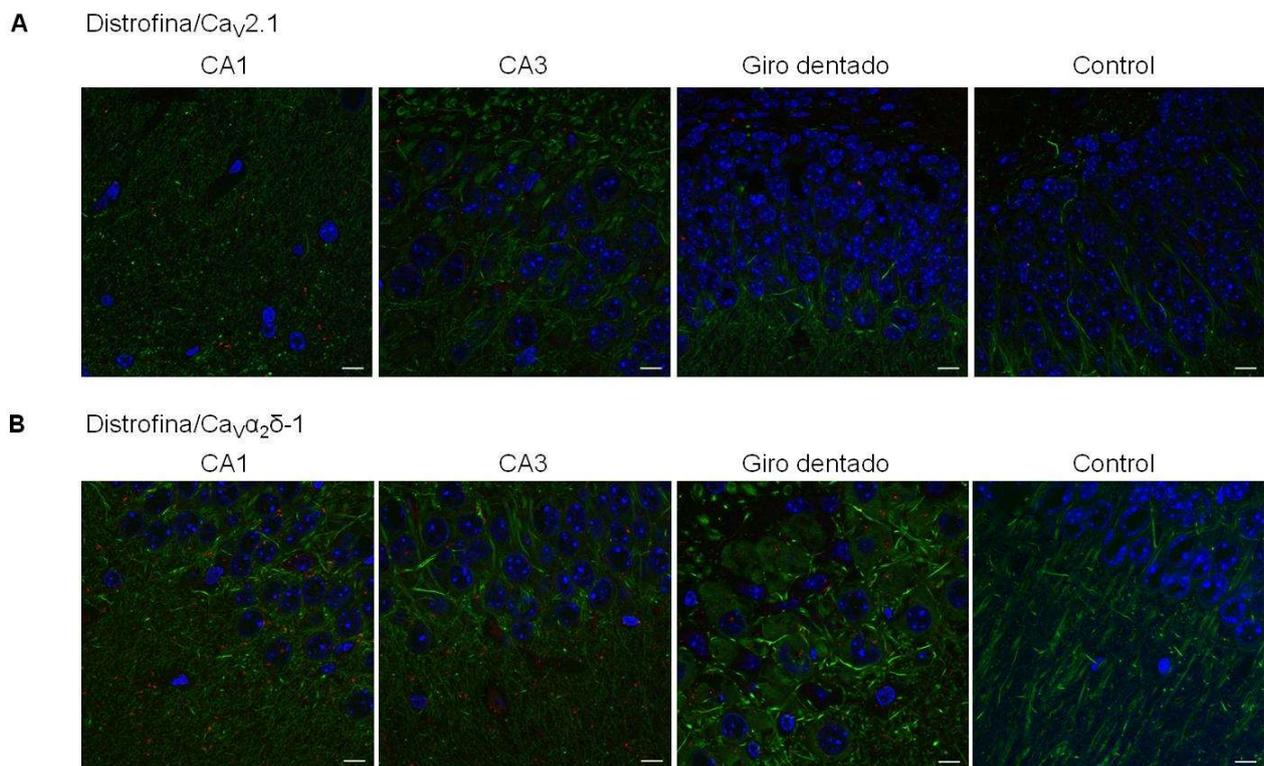


Figura 9. Interacción entre distrofina/Cav2.1 y distrofina/Cav $\alpha_2\delta$ -1 en el hipocampo. Imágenes confocales de cortes coronales de cerebro de ratón de 20 μ m después del ensayo de PLA entre distrofina/Cav2.1 (A) y distrofina/Cav $\alpha_2\delta$ -1 (B). Las señales de PLA positivas se visualizan como puntos rojos. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y los cuerpos de las neuronas fueron teñidos en verde con un anticuerpo que reconoce

proteínas neuronales. Las imágenes son resultados representativos de tres réplicas independientes. Barra de escala = 10 μ m. El control se realizó omitiendo los anticuerpos primarios.

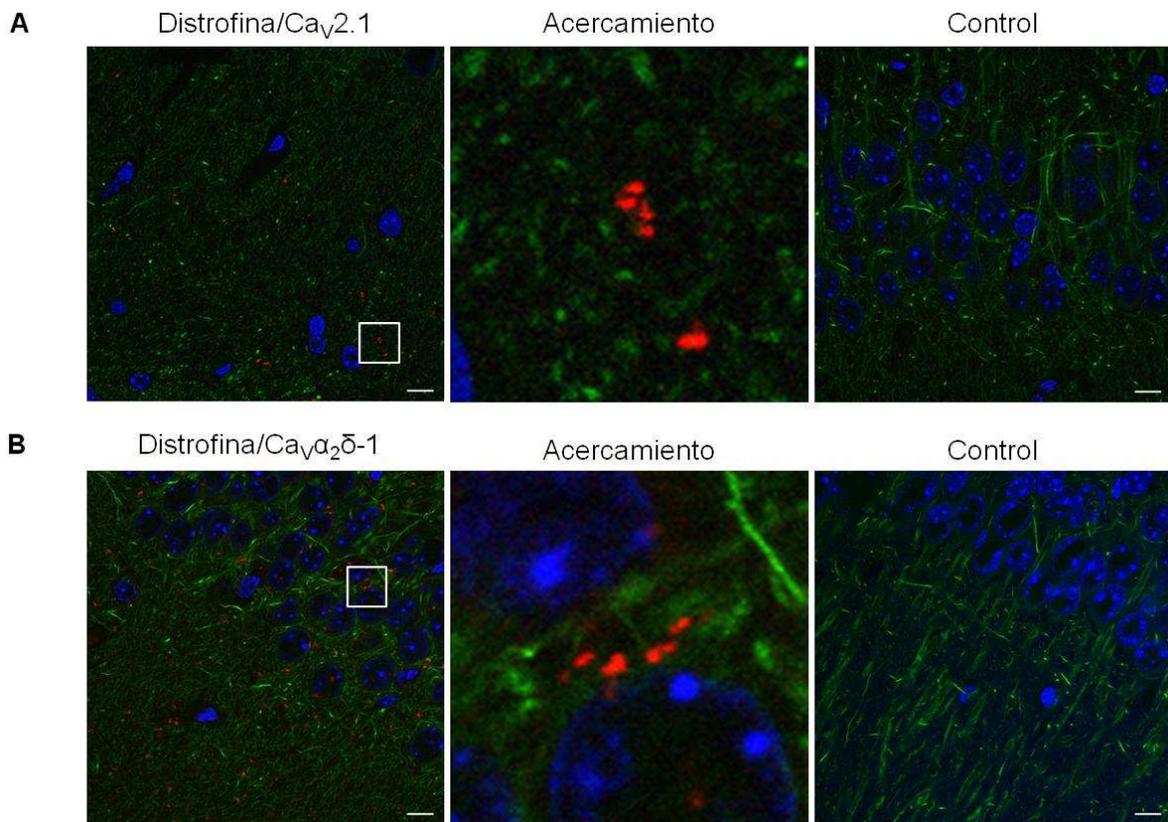


Figura 10. Interacción entre distrofina/Cav2.1 y distrofina/Cav α 2 δ -1 en el área CA1 del hipocampo. Imágenes confocales de cortes coronales de cerebro de ratón de 20 μ m después del ensayo PLA entre distrofina/Cav2.1 (A) y distrofina/Cav α 2 δ -1 (B). Las señales de PLA (rojo) representan la interacción entre distrofina y Cav2.1 o Cav α 2 δ -1; los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y los cuerpos de las neuronas fueron teñidos en verde. Las imágenes son resultados representativos de tres réplicas independientes. Barra de escala = 10 μ m. El control se realizó omitiendo los anticuerpos primarios.

6.6. Interacción entre distrofina/Cav2.1 y distrofina/Cav α 2 δ -1 en el cerebelo

Para evaluar la interacción entre distrofina y Cav2.1 o Cav α 2 δ -1 en el cerebelo, realizamos el análisis de PLA en cortes coronales del cerebelo completo de ratón. Los cortes fueron incubados con los anticuerpos anti-distrofina y anti-Cav2.1 o anti-Cav α 2 δ -1. Las señales positivas del PLA (puntos rojos) fueron detectadas predominantemente en regiones que

corresponden al lóbulo II, lóbulo III y paraflóculo (figura 11A), lo cual es indicativo de interacción entre Cav2.1 y distrofina en el cerebelo. Adicionalmente, las señales positivas también fueron detectadas entre Cav α 2 δ -1 y distrofina en las mismas áreas del cerebelo (figura 11B). Particularmente, observamos una interacción mayor en la región del paraflóculo del cerebelo en comparación con el lóbulo II y el lóbulo III, tanto entre distrofina y el canal Cav2.1, como en la interacción entre distrofina y la subunidad auxiliar Cav α 2 δ -1. Al ampliar las imágenes (figura 12), podemos ver que los puntos de interacción (puntos rojos) se acumulan en las prolongaciones neuronales formando líneas que siguen su trayectoria.

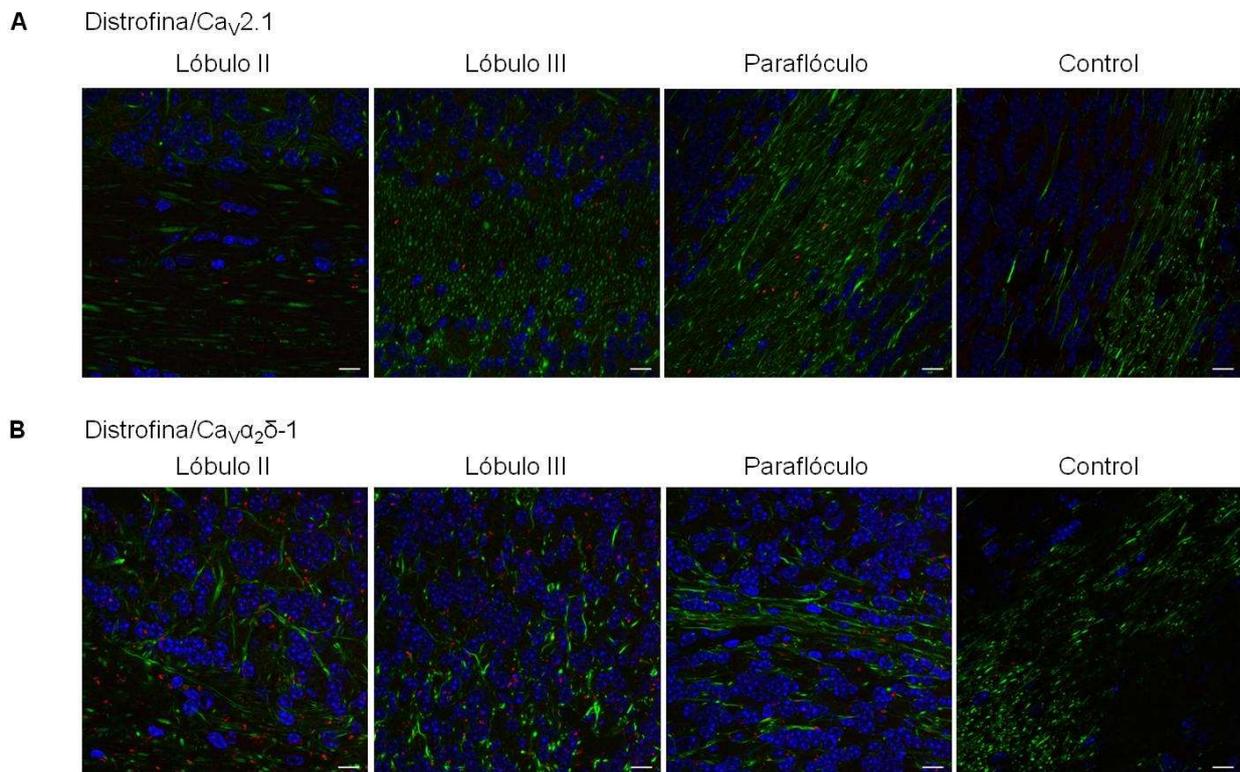


Figura 11. Interacción entre distrofina/Cav2.1 y distrofina/Cav α 2 δ -1 en el cerebelo. Imágenes confocales de cortes coronales de cerebelo de ratón de 20 μ m después del ensayo PLA entre distrofina/Cav2.1 (A) y distrofina/Cav α 2 δ -1 (B). Las señales de PLA (puntos rojos) representan la interacción entre distrofina y Cav2.1 o Cav α 2 δ -1; los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y los cuerpos de las neuronas fueron teñidos en verde. Las imágenes son resultados representativos de tres réplicas independientes. Barra de escala = 10 μ m. El control se realizó omitiendo los anticuerpos primarios.

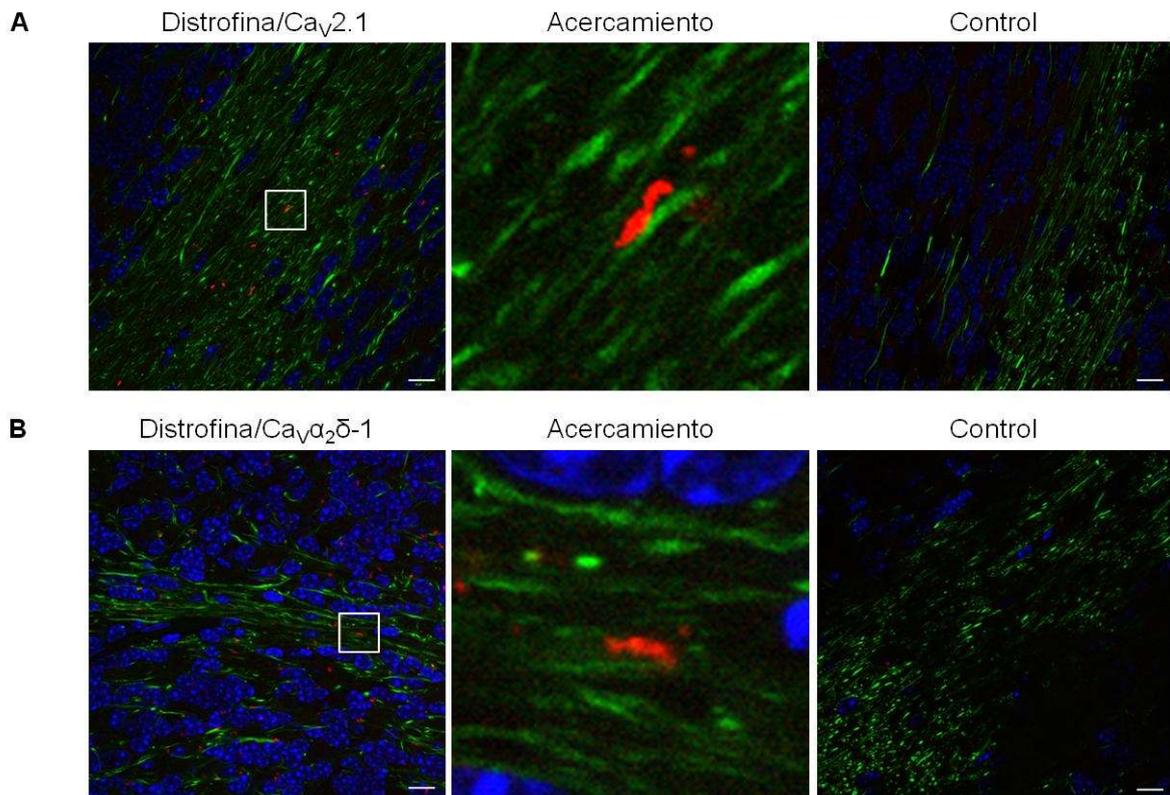


Figura 12. Interacción entre distrofina/Cav2.1 y distrofina/Cav α 2 δ -1 en la región del paraflóculo del cerebelo. Imágenes confocales de cortes coronales de cerebelo de ratón de 20 μ m después del ensayo PLA entre distrofina/Cav2.1 (A) y distrofina/Cav α 2 δ -1 (B). Las señales de PLA (rojo) representan la interacción entre distrofina y Cav2.1 o Cav α 2 δ -1; los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) y los cuerpos de las neuronas fueron teñidos en verde. Las imágenes son resultados representativos de tres réplicas independientes. El control se realizó omitiendo los anticuerpos primarios. Barra de escala = 10 μ m.

Con los experimentos de inmunoprecipitación y los ensayos PLA, se pudo determinar que el complejo del canal Cav2.1/Cav α 2 δ -1/Cav β _{4e} forma un complejo multiproteico con la Dp140 y α 1-sintrofina, en el cerebro de ratón.

6.7. Clonación del cDNA de Dp140 y α 1-sintrofina

Los experimentos de inmunoprecipitación mostraron que la Dp140 y α 1-sintrofina forman un complejo con el canal Cav2.1. Considerando estos resultados, decidimos clonar a α 1-sintrofina y a la isoforma Dp140 con el fin de sobre-expresar a estas proteínas y realizar

los ensayos de vida media y los experimentos de electrofisiología. Como primer paso, se amplificaron los cDNA completos de α 1-sintrofina y de Dp140 de cerebro de ratón por medio de RT-PCR. Como puede observarse en la figura 13, se obtuvo un producto de 1501 bp para α 1-sintrofina (figura 13A) y de 3679 bp para Dp140 (figura 13B).

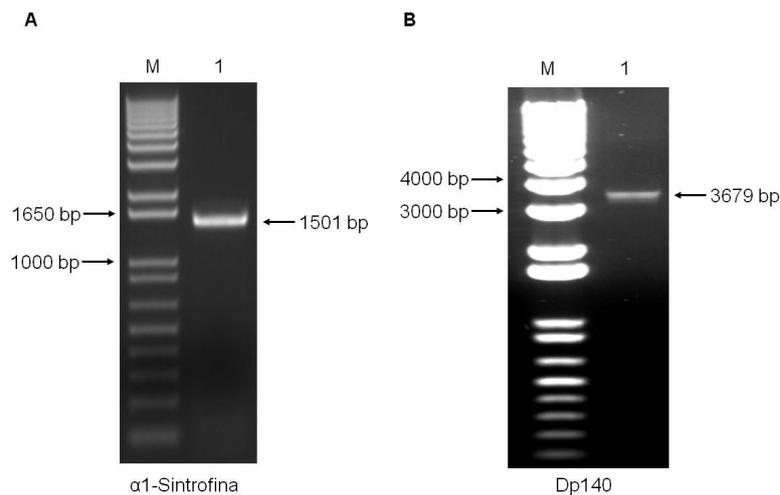


Figura 13. Amplificación de los cDNA de α 1-sintrofina y Dp140. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la amplificación de los cDNA completos de α 1-sintrofina (A) y de Dp140 (B) de cerebro de ratón por medio de RT-PCR. M, marcador; 1, producto de PCR.

Los cDNA completos de α 1-sintrofina y de Dp140 se clonaron en un vector de expresión TOPO que tiene la ventaja de proporcionar una estrategia de clonación altamente eficiente para la fusión directa de los productos de PCR a la proteína GFP. Posteriormente, se analizaron las clonas para ver si estaban en la orientación correcta y marco de lectura. En el caso de α 1-sintrofina, se realizaron cortes con las enzimas de restricción EcoRI y EcoRV. En la figura 14A se muestra la electroforesis del producto digerido que corresponde al tamaño esperado de 1000 pb. En la figura 14B se muestra el esquema de la construcción después de clonar α 1-sintrofina en el vector de expresión.

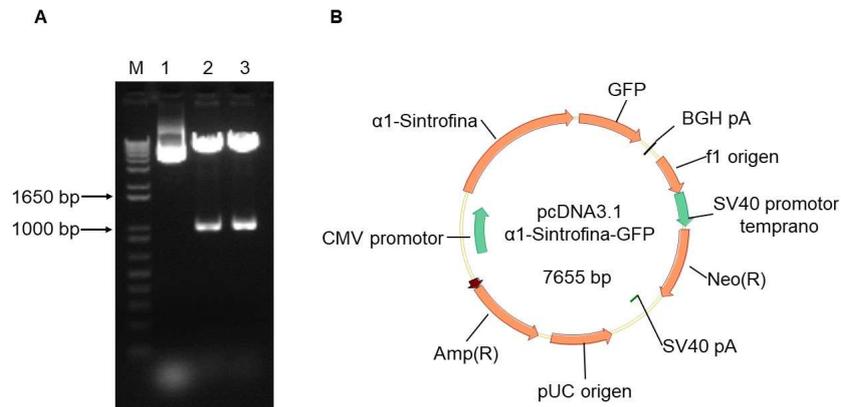


Figura 14. Clonación del cDNA de α 1-sintrofina. A) El cDNA completo de α 1-sintrofina se clonó en el vector de expresión pcDNA3.1-TOPO y se confirmó la orientación correcta al liberarse una banda de 1000 bp al digerir las posibles clonas con las enzimas EcoRI y EcoRV. M, marcador; 1, clona número 1 sin digerir; 2, clona número 1 digerida; 3, clona número 2 digerida. B) Mapa final del vector generado después de la clonación del cDNA completo de α 1-sintrofina.

En el caso de Dp140, se realizaron cortes con la enzima de restricción EcoRV. En la figura 15A se muestra la electroforesis de los productos obtenidos por la digestión y que corresponden con los tamaños esperados de 1639 y 1189 bp. En la figura 15B se muestra el esquema de la construcción después de clonar Dp140 en el vector de expresión.

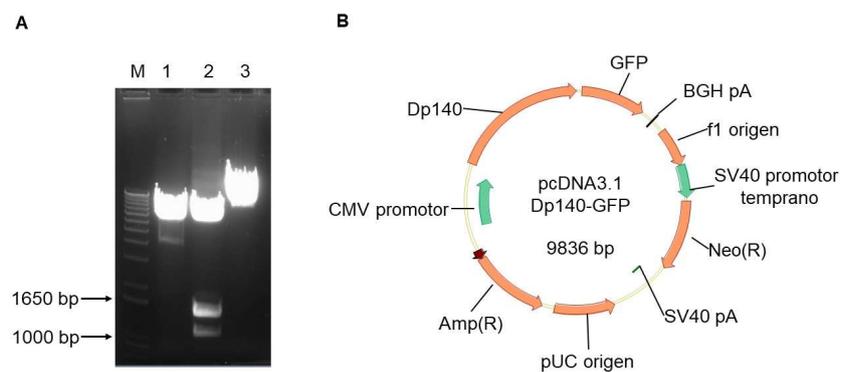


Figura 15. Clonación del cDNA de Dp140. A) El cDNA completo de Dp140 se clonó en el vector de expresión pcDNA3.1-TOPO y se confirmó la orientación correcta mediante ensayo de restricción utilizando la enzima EcoRV. M, marcador; 1, clona número 1 digerida; 2, clona número 2 digerida; 3, clona número 2 sin digerir. B) Mapa final del vector generado después de la clonación del cDNA de Dp140.

Finalmente, las clonas de α 1-sintrofina y de Dp140 seleccionadas se secuenciaron para la verificación definitiva de su identidad. Para comprobar que estas clonas generaban las proteínas de interés, se procedió a expresarlas, de manera heteróloga, para lo cual realizamos transfección transitoria en las células HEK-293. Determinamos, por ensayos de Western blot, la expresión de Dp140 y de α 1-sintrofina utilizando anticuerpos dirigidos contra estas proteínas. En la figura 16 se observa la expresión de Dp140 y de α 1-sintrofina, con un incremento de aproximadamente 27 kDa en su peso molecular debido a la fusión con GFP (figura 16).

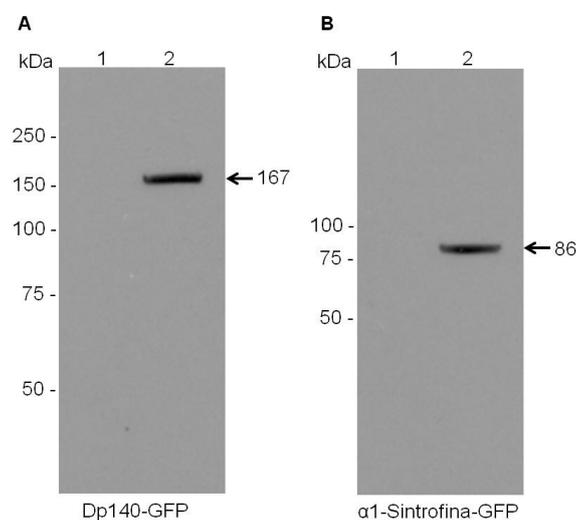


Figura 16. Expresión heteróloga de Dp140-GFP y α 1-sintrofina-GFP. A) Análisis de la expresión de Dp140-GFP en un extracto de proteínas totales obtenido de células HEK-293 transfectadas con el vector pcDNA3.1-Dp140-GFP. B) Análisis de la expresión de α 1-sintrofina-GFP en un extracto de proteínas totales obtenido de células HEK-293 transfectadas con el vector pcDNA3.1- α 1-sintrofina-GFP. 1, Células HEK-293 transfectadas con el vector vacío; 2, HEK-293 transfectadas con los vectores pcDNA3.1-Dp140-GFP y pcDNA3.1- α 1-sintrofina-GFP, respectivamente.

6.8. Clonación de Cav β _{4e}

Los ensayos de inmunoprecipitación con α 1-sintrofina mostraron que varias subunidades auxiliares Cav β (Cav β ₂, Cav β ₃ y Cav β ₄) interaccionan con esta proteína. Llama la atención que son isoformas que tienen un peso molecular menor que las isoformas de

longitudes completas (figura 7). De todas estas isoformas elegimos a $\text{Ca}_v\beta_4$, ya que es la subunidad $\text{Ca}_v\beta$ más abundante en el cerebro y los reportes en la literatura indican que la variante de *splicing* $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ es la segunda subunidad $\text{Ca}_v\beta_4$ más abundante en el cerebelo y puede interactuar funcionalmente con $\text{Ca}_v2.1$ en las células tsA201 y en neuronas cultivadas. Además, se ha reportado que $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ favorece la expresión en la membrana plasmática de $\text{Ca}_v2.1$ y el direccionamiento de estos canales hacia la terminal nerviosa (Etemad et al., 2014).

Como primer paso, se amplificó el cDNA completo de $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ de cerebro de ratón por medio de RT-PCR (figura 17) y se clonó en un vector de expresión pCMV-Tag2B, con el fin de expresar a la subunidad $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ fusionada con el epítipo FLAG en el extremo amino. Posteriormente, se analizaron las clonas para ver si estaban en la orientación correcta y marco de lectura, para lo cual se realizaron cortes con las enzimas de restricción BamHI y Sall. En la figura 18A se muestra la electroforesis del producto digerido que corresponde al tamaño esperado de 1005 pb. En la figura 18B se muestra el esquema de la construcción después de clonar $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ en el vector de expresión.

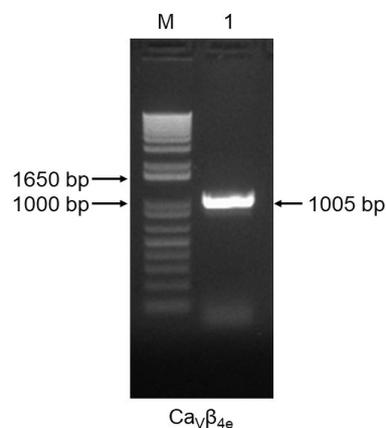


Figura 17. Amplificación del cDNA de $\text{Ca}_v\beta_{4e}$. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la amplificación del cDNA completo de $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ de cerebro de ratón por medio de RT-PCR. M, marcador; 1, producto de PCR.

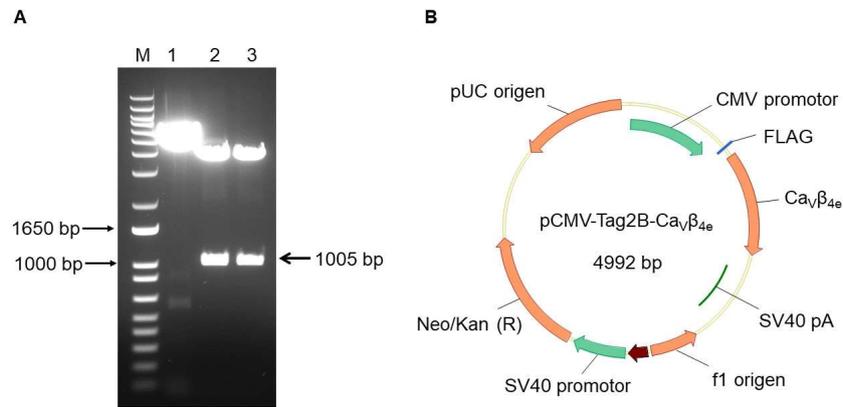


Figura 18. Clonación del cDNA de $\text{Ca}_v\beta_{4e}$. A) El cDNA completo de $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ se clonó en el vector de expresión pCMV-Tag2B y se confirmó la orientación correcta mediante ensayo de restricción utilizando las enzimas BamHI y Sall. M, marcador; 1, clona número 1 sin digerir; 2, clona número 1 digerida; 3, clona número 2 digerida. B) Mapa final del vector generado después de la clonación del cDNA de $\text{Ca}_v\beta_{4e}$.

Finalmente, la clona de $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ seleccionada se secuenció para la verificación definitiva de su identidad. Para comprobar que esta clona generaba la proteína de interés, se procedió a expresarla, de manera heteróloga, para lo cual realizamos transfección transitoria en las células HEK-293. Determinamos, por ensayos de Western blot, la expresión de $\text{Ca}_v\beta_{4e}$. En la figura 19 se observa la expresión de $\text{Ca}_v\beta_{4e}$.

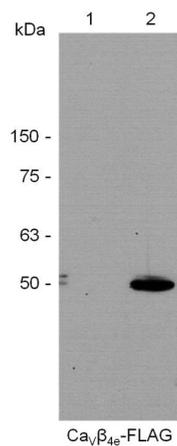


Figura 19. Expresión heteróloga de $\text{Ca}_v\beta_{4e}$. Análisis de la expresión de $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ en un extracto de proteínas totales obtenido de células HEK-293 transfectadas con el vector pCMV-Tag2B- $\text{Ca}_v\beta_{4e}$. 1, HEK-293 transfectadas con el vector vacío; 2, HEK-293 transfectadas con el vector pCMV-Tag2B- $\text{Ca}_v\beta_{4e}$.

6.9. Dp140 y α 1-sintrofina incrementan la vida media del canal Cav2.1

Las interacciones que ocurren entre los componentes del DGC y los canales iónicos en la membrana plasmática conducen al funcionamiento correcto de los canales. En ausencia de distrofina, estas interacciones ya no se dan y pueden afectar a los canales por dos diferentes mecanismos (Leyva-Leyva et al., 2018): A) afectando directamente el funcionamiento del canal como se ha reportado para los canales TRPC y los canales Nav1.4. B) alterando la localización y el tráfico, como se ha reportado para los canales de sodio Nav1.5 y los canales de potasio Kir4.1. Considerando esta segunda posibilidad, se decidió determinar la vida media de la proteína del canal Cav2.1. Para cumplir con este objetivo se transfectaron células HEK-293 con el complejo del canal (Cav2.1, Cav β _{4e} y Cav α 2 δ -1) en ausencia (control) o presencia (problema) de Dp140 y α 1-sintrofina. Posterior a la transfección, se inhibió la síntesis de las proteínas con CHX y se obtuvieron extractos proteicos totales a diferentes tiempos. Como se observa en la figura 20, la presencia de la Dp140 y α 1-sintrofina aumentaron significativamente la estabilidad de la proteína del canal Cav2.1 de $\sim 24.3 \pm 5.2$ a $\sim 62.4 \pm 10.9$ horas ($P < 0.02$). El aumento en la vida media del canal Cav2.1 por la presencia de Dp140 y α 1-sintrofina sugiere que el número de canales en la membrana podría estar aumentado.

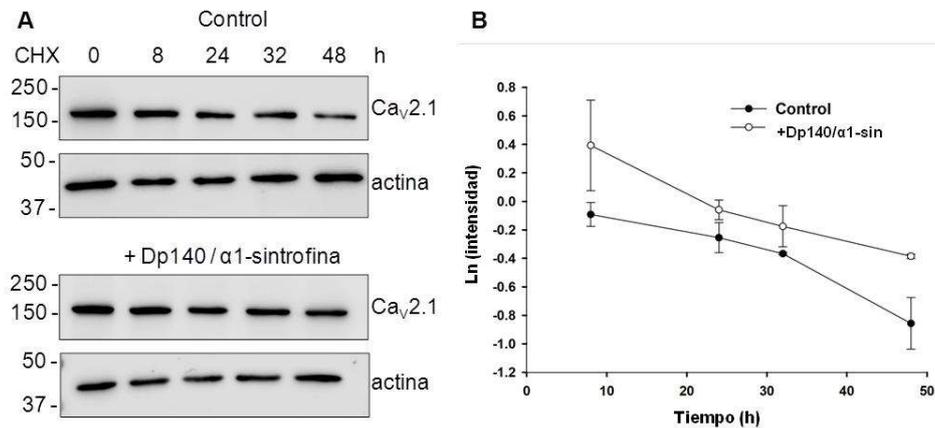


Figura 20. Dp140 y α 1-sintrofina incrementan la estabilidad de la proteína Cav2.1. A) Immunoblots representativos que muestran el efecto de la co-expresión de Dp140 y α 1-sintrofina sobre la estabilidad de Cav2.1 después del tratamiento con CHX durante los tiempos indicados (h). Panel superior, control: transfección del complejo del canal Cav2.1/Cav α 2 δ -1/Cav β _{4e}. Panel inferior, transfección con el complejo del canal y

Dp140/ α 1-sintrofina. Las intensidades de las bandas de Cav2.1 fueron normalizadas con actina. B) Cuantificación de la vida media de la proteína Cav2.1 en ausencia (círculos negros) y presencia (círculos blancos) de Dp140/ α 1-sintrofina.

6.10. Dp140 y α 1-sintrofina aumentan la actividad de los canales Cav2.1

A continuación, tratamos de determinar el posible impacto funcional de las interacciones moleculares descritas. Para ello, se realizaron registros electrofisiológicos utilizando la técnica patch-clamp en la modalidad de célula completa mediante el método de fijación de voltaje. Se utilizaron células HEK-293 que expresaban de forma heteróloga al complejo del canal Cav2.1 (Cav2.1 α 1/Cav α 2 δ -1/Cav β 4e), en ausencia o presencia de Dp140 y α 1-sintrofina. La figura 21A muestra los trazos representativos de las corrientes superpuestas en respuesta a pulsos de prueba a 10 mV desde un potencial de mantenimiento de -80 mV. Los resultados muestran que la presencia de Dp140 y α 1-sintrofina produce un aumento significativo en la amplitud de la corriente. El aumento de la densidad de corriente máxima (I_m/C_m) fue de alrededor del 40% ($P < 0.05$; figura 21B). Este aumento también es significativo a varios voltajes evaluados, como muestra la comparación de las curvas corriente-voltaje en la figura 21C. Por el contrario, la presencia de Dp140 y α 1-sintrofina no modificó la posición de las curvas de conductancia e inactivación en el eje de voltaje (figura 21D y E, respectivamente). Del mismo modo, ni la activación ni la inactivación durante el pulso se ve afectada por la presencia de Dp140 y α 1-sintrofina (figura 21F). El hecho de que haya un aumento en la densidad de corriente, sin afectar la cinética o la dependencia del voltaje de las corrientes, sugiere que el efecto de Dp140 y α 1-sintrofina es en el número de canales en la membrana plasmática y no en sus propiedades funcionales. Estos hallazgos concuerdan completamente con los datos obtenidos en los ensayos con CHX, que muestran un aumento de los canales Cav2.1 α 1 en la membrana plasmática.

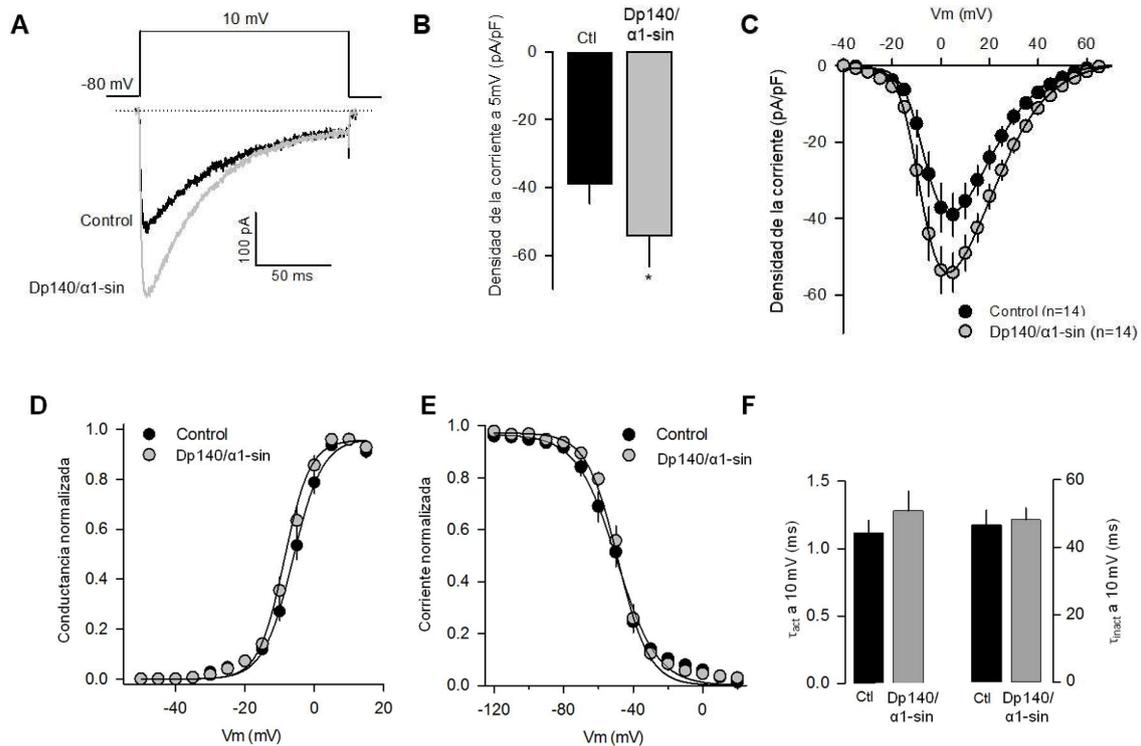


Figura 21. Dp140 y α 1-sintrofina aumentan el número de canales $\text{Ca}_v2.1$ en la membrana plasmática. A) Trazos de corriente representativos registrados en células HEK-293 que expresan transitoriamente a los canales $\text{Ca}_v2.1/\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1/\text{Ca}_v\beta_{4e}$ en ausencia y presencia de Dp140 y α 1-sintrofina. B) Gráfico de barras comparando la densidad de corriente pico media (pA/pF) a través de los canales, el asterisco indica significancia estadística ($p < 0,05$ prueba t de Student). C) Curvas I-V de los canales $\text{Ca}_v2.1$. El número de células registradas se indica entre paréntesis. D) Comparación de las curvas de conductancia máxima normalizada en función del voltaje en ausencia y presencia de Dp140/ α 1-sintrofina. E) Comparación de las curvas de inactivación en estado estacionario en ausencia y presencia de Dp140/ α 1-sintrofina. F) Gráfico de barras que compara la constante de tiempo (τ) de activación (izquierda) e inactivación durante el pulso (derecha) en células de control y co-transfectadas con Dp140/ α 1-sintrofina.

Además, los resultados de nuestros ensayos funcionales muestran que la actividad de los canales $\text{Ca}_v2.1$ en presencia de la subunidad $\text{Ca}_v\beta_{4a}$ (la isoforma de tamaño completa) no cambia significativamente cuando se co-expresan Dp140 y α 1-sintrofina. La figura 22A muestra los trazos de corriente representativos superpuestos, mostrando que la presencia de Dp140 y α 1-sintrofina no tiene efecto sobre la amplitud. Lo mismo ocurre para todos los voltajes explorados, como se muestra en la comparación de las curvas de corriente y conductancia-voltaje (figura 22B y C, respectivamente). En conjunto, estos resultados

sugieren que el efecto Dp140 y α 1-sintrofina sobre la actividad del canal depende de $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ y es independiente de la subunidad $\text{Ca}_v\beta_{4a}$.

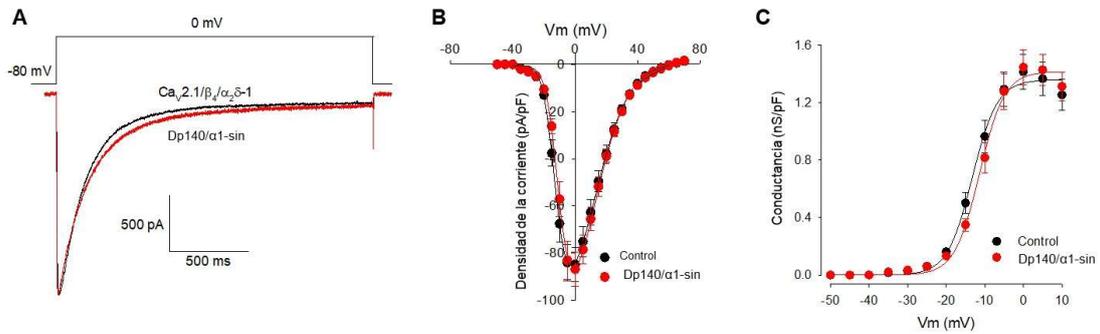


Figura 22. El efecto de Dp140 y α 1-sintrofina sobre la actividad de los canales $\text{Ca}_v2.1$ no depende de $\text{Ca}_v\beta_{4a}$. A) Trazos de corriente representativos a través de canales $\text{Ca}_v2.1$ superpuestos, obtenidos en células HEK-293 transfectadas en la condición de control (con el cDNA que codifica para $\text{Ca}_v2.1/\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1/\text{Ca}_v\beta_{4a}$) y co-transfectadas con Dp140/ α 1-sintrofina. En este caso, el complejo incluía la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\beta_{4a}$ (de longitud completa). B) Comparación de las curvas I-V de los canales $\text{Ca}_v2.1$ registrados en células HEK-293. C) Comparación de las curvas de conductancia máxima en función del voltaje en ausencia y presencia de Dp140/ α 1-sintrofina.

7. DISCUSIÓN

Los canales Cav2 constan de una subunidad formadora del poro Cav α_1 y, al menos, dos subunidades auxiliares distintas denominadas Cav β y Cav $\alpha_2\delta$ (Zamponi et al., 2015). Asimismo, estudios del proteoma han revelado que la subfamilia Cav2 forma parte de un microambiente de unas 200 proteínas además de las subunidades auxiliares mencionadas. De esta manera, varias clases de proteínas forman este macrocomplejo, siendo interesante que algunas de estas proteínas pertenecen al DGC (Muller et al., 2010). El presente trabajo muestra evidencia de que el canal Cav2.1 interactúa con la distrofina y el DGC. Nuestros ensayos de inmunoprecipitación muestran la identidad molecular de un complejo formado por el canal Cav2.1 y sus subunidades auxiliares Cav β_{4e} y Cav $\alpha_2\delta$ -1 junto con Dp140 y α 1-sintrofina en el cerebro de ratón. Mediante ensayos PLA confirmamos la interacción del Cav2.1 con distrofina en algunas regiones del cerebro; la distribución de estos complejos moleculares es una sucesión de puntos a lo largo del axón. Además, mostramos que la asociación del canal con Dp140 y α 1-sintrofina cambia la estabilidad de la proteína Cav2.1 aumentando su vida media.

Especulamos que este cambio puede tener una consecuencia funcional, ya que ayuda a estabilizar el canal en la membrana plasmática, aumentando su número y la densidad de corriente. Estudios recientes han demostrado que la ausencia de Dp140 deteriora la transmisión glutamatérgica en neuronas basolaterales de la amígdala en ratones *mdx52* (Hashimoto et al., 2022). En particular, hay una disminución en la relación de corriente postsináptica excitadora/inhibitoria y la frecuencia de las corrientes postsinápticas excitadoras en miniatura. Estos datos sugieren que la plasticidad de las sinapsis es diferente en los ratones que carecen de Dp140. Además, la ausencia de Dp140 también disminuye la expresión de VGLUT1 y, en consecuencia, el número de vesículas presinápticas (Hashimoto et al., 2022). Curiosamente, los canales Cav2.1 localizados en las terminales presinápticas, las membranas del soma y las dendritas tienen un papel destacado en la liberación de neurotransmisores desencadenada por el potencial de acción y en la liberación espontánea de neurotransmisores en estado de reposo (Pietrobon, 2010; Sara et al., 2005). Además, la liberación glutamatérgica espontánea se desencadena por un aumento de Ca²⁺ producido por

la apertura estocástica de los canales Cav (Ermolyuk et al., 2013). Esta liberación espontánea de neurotransmisores es un proceso dependiente de la calmodulina y requiere vesículas presinápticas cerca de los canales Cav2.1 (Lee et al., 2022). Como se mencionó anteriormente, la distrofina forma un complejo molecular más grande compuesto de distroglicanos, sarcoglicanos, sarcospan, distrobrevinas y sintrofina (Bhat et al., 2018; Cohn and Campbell, 2000; Constantin, 2014). Las sintrofinas son una familia de proteínas adaptadoras asociadas a la membrana celular que pueden interactuar con varias proteínas, implicando a las sintrofinas en numerosas vías de señalización celular (Constantin, 2014). Por ejemplo, en el cerebro α 1-sintrofina puede interactuar con la nNOS en neuronas y también puede unirse al carboxilo terminal de los canales de sodio activados por voltaje en músculo esquelético y cardíaco (Gavillet et al., 2006). La idea de que el complejo distrofina/sintrofina interactúa con canales iónicos y regula su función también ha sido propuesta para los canales TRPC (Vandebrouck et al., 2007). Estos estudios destacan el papel central de la α 1-sintrofina en el mantenimiento de un complejo de señalización anclado al andamio de distrofina necesario para la expresión y función apropiada del canal iónico. Otro componente esencial en la organización de la membrana presináptica es la subunidad auxiliar Cav α 2 δ -1. Se sabe que la liberación de neurotransmisores mediada por los canales Cav2.1 depende de la interacción de Cav α 2 δ -1 con la α -neurexina. Esta última proteína es un regulador positivo de los canales Cav2.1 y se sabe que interactúa con α -distroglicano, un miembro del DGC (Sugita et al., 2001). Esto revela que la transmisión glutamatérgica es un proceso en el que Cav2.1 y Cav α 2 δ -1 están cumpliendo una función importante. En este contexto, nuestros resultados sugieren que Dp140 y α 1-sintrofina agrupan el complejo del canal Cav2.1 en un nanodominio donde la calmodulina y las vesículas que contienen neurotransmisor están en estrecha proximidad. Los resultados del ensayo PLA apoyan esta especulación, ya que la interacción entre Dp140 y el complejo Cav2.1/Cav α 2 δ -1 tiene una localización somato dendrítica en el hipocampo. Además, nuestros análisis electrofisiológicos mostraron que esta interacción aumenta la vida media de la proteína y también influye en la actividad de los canales, lo que podría determinar la liberación adecuada de neurotransmisores. Una característica distintiva de esta nueva interacción molecular entre la Dp140/ α 1-sintrofina y el complejo del canal Cav2.1 es la participación de la subunidad Cav β 4e. Esta proteína es una variante corta de la subunidad auxiliar Cav β 4 expresada principalmente en el hipocampo, la corteza y el cerebelo

(Schlick et al., 2010). A nivel celular, la isoforma Cav β_{4e} es abundante en el axón distal y, a diferencia de la subunidad Cav β_4 de longitud completa, no muestra propiedades de orientación nuclear. Además, esta variante cumple funciones que dependen de su asociación con los canales Cav en la presinapsis (Etemad et al., 2014). En particular, los resultados de nuestros ensayos funcionales muestran que la actividad de los canales Cav2.1 en presencia de Cav β_{4a} no cambia significativamente cuando se sobre-expresan Dp140 y α 1-sintrofina. Por el contrario, la co-expresión de la variante corta Cav β_{4e} con Dp140/ α 1-sintrofina provoca un aumento sustancial de la actividad del canal. Este hallazgo apoya la idea de que la función del complejo Dp140/ α 1-sintrofina es interactuar con la subunidad Cav β_{4e} para regular los canales Cav2.1 en la membrana plasmática (Leyva-Leyva et al., 2023).

8. CONCLUSIONES

Nuestro estudio muestra, por primera vez, pruebas experimentales de la formación de un complejo molecular específico entre Dp140/ α 1-sintrofina y el complejo del canal neuronal Cav2.1. Esta interacción regula a los canales de la membrana plasmática y contribuiría a la correcta liberación de neurotransmisores en las sinapsis. Nuestros datos también resaltan la importancia de identificar las interacciones moleculares de la distrofina, el DGC y los canales Cav en el sistema nervioso para entender mejor cómo su desregulación puede contribuir a deficiencias en desórdenes neurológicos encontrados en varias enfermedades humanas incluyendo la distrofia muscular de Duchenne.

9. PERSPECTIVAS

Los resultados del presente trabajo de tesis revelan, por primera vez, la interacción funcional entre la isoforma de distrofina Dp140 y el canal de calcio Cav2.1. Será muy interesante identificar el sitio de interacción directo entre las proteínas del DGC y el complejo del canal Cav2.1. Un posible candidato sería α 1-sintrofina, ya que se ha reportado que esta proteína adaptadora se asocia a algunos canales iónicos mediante su dominio PDZ. Además, considerando que nuestros experimentos de electrofisiología mostraron que la subunidad auxiliar Cav β _{4e} es una proteína distintiva y muy específica de la interacción que estamos reportando, nos parece interesante explorar la posibilidad de que la asociación directa con el DGC sea a través de esta subunidad.

Por otra parte, consideramos importante determinar el mecanismo por el cual Dp140 y α 1-sintrofina incrementan la estabilidad de la proteína del canal Cav2.1, aumentando el número de canales en la membrana plasmática y, como consecuencia, el incremento en la densidad de la corriente observado en nuestros experimentos de electrofisiología. Podemos especular que Dp140 promueve la localización y agrupamiento de los canales Cav2.1 a sitios especializados de la membrana neuronal como las sinapsis glutamatérgicas. Es pertinente señalar que Cav2.1 tiene un papel fundamental en la transmisión sináptica y, además, un estudio reciente (Hashimoto et al., 2022) demuestra que la ausencia de Dp140 altera la transmisión glutamatérgica, lo que puede conducir a diversos desórdenes neurológicos.

Proponemos que la eliminación de Dp140 en neuronas del hipocampo y la amígdala tendrá repercusión sobre el funcionamiento de la transmisión sináptica mediada por los canales de calcio Cav2.1, sin excluir el posible papel que pueda tener el DGC sobre la regulación de otros canales de la subfamilia Cav2.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aartsma-Rus, A., et al., 2006. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve*. 34, 135-44.
- Abraham, L.S., et al., 2010. An alpha-catulin homologue controls neuromuscular function through localization of the dystrophin complex and BK channels in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet*. 6.
- Aikawa, T., et al., 2017. Alternative splicing in the C-terminal tail of Cav2.1 is essential for preventing a neurological disease in mice. *Hum Mol Genet*. 26, 3094-3104.
- Alam, M.S., 2018. Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr Protoc Immunol*. 123, e58.
- Avila, G., Sandoval, A., Felix, R., 2004. Intramembrane charge movement associated with endogenous K⁺ channel activity in HEK-293 cells. *Cell Mol Neurobiol*. 24, 317-30.
- Banihani, R., et al., 2015. Cognitive and Neurobehavioral Profile in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy. *J Child Neurol*. 30, 1472-82.
- Barnea, E., et al., 1990. Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron*. 5, 881-8.
- Battini, R., et al., 2018. Cognitive profile in Duchenne muscular dystrophy boys without intellectual disability: The role of executive functions. *Neuromuscul Disord*. 28, 122-128.
- Belle, A., et al., 2006. Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103, 13004-9.
- Bhat, H.F., et al., 2018. ABC of multifaceted dystrophin glycoprotein complex (DGC). *J Cell Physiol*. 233, 5142-5159.
- Billard, C., et al., 1998. Reading ability and processing in Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Dev Med Child Neurol*. 40, 12-20.
- Birnkrant, D.J., et al., 2018. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: respiratory, cardiac, bone health, and orthopaedic management. *Lancet Neurol*. 17, 347-361.
- Bladen, C.L., et al., 2015. The TREAT-NMD DMD Global database: Analysis of More Than 7000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Hum Mutat*.
- Blake, D.J., et al., 1992. Characterization of a 4.8kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells. *Hum Mol Genet*. 1, 103-9.
- Blake, D.J., et al., 2002. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*. 82, 291-329.
- Broderick, M.J., Winder, S.J., 2005. Spectrin, alpha-actinin, and dystrophin. *Adv Protein Chem*. 70, 203-46.
- Buraei, Z., Yang, J., 2010. The ss subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Physiol Rev*. 90, 1461-506.
- Byers, T.J., Lidov, H.G., Kunkel, L.M., 1993. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet*. 4, 77-81.
- Campbell, K.P., Kahl, S.D., 1989. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature*. 338, 259-62.
- Carre-Pierrat, M., et al., 2006. The SLO-1 BK channel of *Caenorhabditis elegans* is critical for muscle function and is involved in dystrophin-dependent muscle dystrophy. *J Mol Biol*. 358, 387-95.
- Catterall, W.A., 2011. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3, a003947.
- Cohn, R.D., Campbell, K.P., 2000. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*. 23, 1456-71.
- Colombo, P., et al., 2017. Assessing mental health in boys with Duchenne muscular dystrophy: Emotional, behavioural and neurodevelopmental profile in an Italian clinical sample. *Eur J Paediatr Neurol*. 21, 639-647.
- Comim, C.M., et al., 2019. Neurocognitive Impairment in mdx Mice. *Mol Neurobiol*.

- Connors, N.C., Kofuji, P., 2002. Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. *J Neurosci.* 22, 4321-7.
- Connors, N.C., et al., 2004. The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem.* 279, 28387-92.
- Constantin, B., 2014. Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1838, 635-42.
- Cotton, S., Voudouris, N.J., Greenwood, K.M., 2001. Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients. *Dev Med Child Neurol.* 43, 497-501.
- Cotton, S.M., Voudouris, N.J., Greenwood, K.M., 2005. Association between intellectual functioning and age in children and young adults with Duchenne muscular dystrophy: further results from a meta-analysis. *Dev Med Child Neurol.* 47, 257-65.
- Chelly, J., et al., 1990. Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. *Nature.* 344, 64-5.
- Chomczynski, P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 15, 532-4, 536-7.
- D'Souza, V.N., et al., 1995. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum Mol Genet.* 4, 837-42.
- Dalloz, C., et al., 2003. Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Hum Mol Genet.* 12, 1543-54.
- Daoud, F., et al., 2009. Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. *PLoS One.* 4, e6574.
- Davies, K.E., Nowak, K.J., 2006. Molecular mechanisms of muscular dystrophies: old and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7, 762-73.
- de Brouwer, A.P., et al., 2014. A 3-base pair deletion, c.9711_9713del, in DMD results in intellectual disability without muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet.* 22, 480-5.
- Emery, A.E., 2002. The muscular dystrophies. *Lancet.* 359, 687-95.
- Ermolyuk, Y.S., et al., 2013. Differential triggering of spontaneous glutamate release by P/Q-, N- and R-type Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci.* 16, 1754-1763.
- Ervasti, J.M., et al., 1990. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature.* 345, 315-9.
- Ervasti, J.M., Campbell, K.P., 1991. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell.* 66, 1121-31.
- Ervasti, J.M., 2007. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* 1772, 108-17.
- Etemad, S., et al., 2014. Differential neuronal targeting of a new and two known calcium channel beta4 subunit splice variants correlates with their regulation of gene expression. *J Neurosci.* 34, 1446-61.
- Feener, C.A., Koenig, M., Kunkel, L.M., 1989. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature.* 338, 509-11.
- Felix, R., 2005. Molecular regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *J Recept Signal Transduct Res.* 25, 57-71.
- Friedrich, O., et al., 2004. Mini-dystrophin restores L-type calcium currents in skeletal muscle of transgenic mdx mice. *J Physiol.* 555, 251-65.
- Friedrich, O., et al., 2008. L-type Ca²⁺ channel function is linked to dystrophin expression in mammalian muscle. *PLoS One.* 3, e1762.
- Gavillet, B., et al., 2006. Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ Res.* 99, 407-14.
- Gazzoli, I., et al., 2016. Non-sequential and multi-step splicing of the dystrophin transcript. *RNA Biol.* 13, 290-305.

- Gee, S.H., et al., 1998. Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci.* 18, 128-37.
- Gonzalez-Ramirez, R., Felix, R., 2018. Transcriptional regulation of voltage-gated Ca(2+) channels. *Acta Physiol (Oxf).* 222.
- Gorecki, D.C., et al., 1992. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet.* 1, 505-10.
- Grady, R.M., et al., 2006. Cerebellar synaptic defects and abnormal motor behavior in mice lacking alpha- and beta-dystrobrevin. *J Neurosci.* 26, 2841-51.
- Guadagno, E., Moukhles, H., 2004. Laminin-induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, and the water-permeable channel, AQP4, via a dystroglycan-containing complex in astrocytes. *Glia.* 47, 138-49.
- Hans, M., et al., 1999a. Functional consequences of mutations in the human alpha1A calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. *J Neurosci.* 19, 1610-9.
- Hans, M., et al., 1999b. Structural elements in domain IV that influence biophysical and pharmacological properties of human alpha1A-containing high-voltage-activated calcium channels. *Biophys J.* 76, 1384-400.
- Hashimoto, Y., et al., 2022. Brain Dp140 alters glutamatergic transmission and social behaviour in the mdx52 mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Prog Neurobiol.* 216, 102288.
- Helleringer, R., et al., 2018. Cerebellar synapse properties and cerebellum-dependent motor and non-motor performance in Dp71-null mice. *Dis Model Mech.* 11.
- Hendriksen, J.G., Vles, J.S., 2008. Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive-compulsive disorder. *J Child Neurol.* 23, 477-81.
- Hendriksen, R.G., et al., 2015. A possible role of dystrophin in neuronal excitability: A review of the current literature. *Neurosci Biobehav Rev.* 51, 255-262.
- Hendriksen, R.G.F., et al., 2018. Brain-related comorbidities in boys and men with Duchenne Muscular Dystrophy: A descriptive study. *Eur J Paediatr Neurol.* 22, 488-497.
- Hinton, V.J., et al., 2000. Poor verbal working memory across intellectual level in boys with Duchenne dystrophy. *Neurology.* 54, 2127-32.
- Hinton, V.J., et al., 2009. Association of autistic spectrum disorders with dystrophinopathies. *Pediatr Neurol.* 41, 339-46.
- Hirn, C., et al., 2008. Nav1.4 deregulation in dystrophic skeletal muscle leads to Na⁺ overload and enhanced cell death. *J Gen Physiol.* 132, 199-208.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr., Kunkel, L.M., 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* 51, 919-28.
- Holder, E., Maeda, M., Bies, R.D., 1996. Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. *Hum Genet.* 97, 232-9.
- Hugnot, J.P., et al., 1992. Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 7506-10.
- Iwata, Y., et al., 2003. A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. *J Cell Biol.* 161, 957-67.
- Iwata, Y., et al., 2009. Dominant-negative inhibition of Ca²⁺ influx via TRPV2 ameliorates muscular dystrophy in animal models. *Hum Mol Genet.* 18, 824-34.
- Johnson, B.D., Scheuer, T., Catterall, W.A., 2005. Convergent regulation of skeletal muscle Ca²⁺ channels by dystrophin, the actin cytoskeleton, and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 4191-6.
- Kao, S.H., et al., 2015. Analysis of Protein Stability by the Cycloheximide Chase Assay. *Bio Protoc.* 5.

- Kim, H., et al., 2009. The dystrophin complex controls bk channel localization and muscle activity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* 5, e1000780.
- Kim, H.L., et al., 1992. Rat brain expresses an alternatively spliced form of the dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel alpha 2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 3251-5.
- Knuesel, I., et al., 1999. Short communication: altered synaptic clustering of GABAA receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice). *Eur J Neurosci.* 11, 4457-62.
- Koenig, M., et al., 1989. The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet.* 45, 498-506.
- Koenig, X., et al., 2014. Enhanced currents through L-type calcium channels in cardiomyocytes disturb the electrophysiology of the dystrophic heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 306, H564-73.
- Kueh, S.L., Head, S.I., Morley, J.W., 2008. GABA(A) receptor expression and inhibitory post-synaptic currents in cerebellar Purkinje cells in dystrophin-deficient mdx mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 35, 207-10.
- Kueh, S.L., et al., 2011. Reduced postsynaptic GABAA receptor number and enhanced gaboxadol induced change in holding currents in Purkinje cells of the dystrophin-deficient mdx mouse. *Neurobiol Dis.* 43, 558-64.
- Lacinova, L., 2005. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys.* 24 Suppl 1, 1-78.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-5.
- Lederfein, D., et al., 1992. A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 5346-50.
- Lee, A.J., et al., 2018. Descriptive Phenotype of Obsessive Compulsive Symptoms in Males With Duchenne Muscular Dystrophy. *J Child Neurol.* 33, 572-579.
- Lee, B.J., et al., 2022. Voltage-gated calcium channels contribute to spontaneous glutamate release directly via nanodomain coupling or indirectly via calmodulin. *Prog Neurobiol.* 208, 102182.
- Leyva-Leyva, M., et al., 2018. Biochemical and Functional Interplay Between Ion Channels and the Components of the Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex. *J Membr Biol.* 251, 535-550.
- Leyva-Leyva, M., et al., 2023. Identification of Dp140 and α 1-syntrophin as novel molecular interactors of the neuronal Cav2.1 channel. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology.* 475, 595-606.
- Lidov, H.G., Selig, S., Kunkel, L.M., 1995. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet.* 4, 329-35.
- Liu, G., et al., 2020. Mechanism of adrenergic CaV1.2 stimulation revealed by proximity proteomics. *Nature.* 577, 695-700.
- Mah, J.K., et al., 2014. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 24, 482-91.
- Manning, J., et al., 2014. Amitriptyline is efficacious in ameliorating muscle inflammation and depressive symptoms in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Exp Physiol.* 99, 1370-86.
- McNally, E.M., Pytel, P., 2007. Muscle diseases: the muscular dystrophies. *Annu Rev Pathol.* 2, 87-109.
- Millay, D.P., et al., 2009. Calcium influx is sufficient to induce muscular dystrophy through a TRPC-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106, 19023-8.
- Miranda, R., et al., 2011. Altered presynaptic ultrastructure in excitatory hippocampal synapses of mice lacking dystrophins Dp427 or Dp71. *Neurobiol Dis.* 43, 134-41.
- Monaco, A.P., et al., 1988. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics.* 2, 90-5.
- Muller, C.S., et al., 2010. Quantitative proteomics of the Cav2 channel nano-environments in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 14950-7.
- Nagelhus, E.A., Mathiisen, T.M., Ottersen, O.P., 2004. Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience.* 129, 905-13.
- Nanou, E., Catterall, W.A., 2018. Calcium Channels, Synaptic Plasticity, and Neuropsychiatric Disease. *Neuron.* 98, 466-481.

- Neely, J.D., et al., 2001. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 14108-13.
- Nicolas, A., et al., 2014. The spectrin family of proteins: a unique coiled-coil fold for various molecular surface properties. *J Struct Biol.* 186, 392-401.
- Noel, G., et al., 2005. Dystroglycan and Kir4.1 coclustering in retinal Muller glia is regulated by laminin-1 and requires the PDZ-ligand domain of Kir4.1. *J Neurochem.* 94, 691-702.
- Pane, M., et al., 2012. Attention deficit hyperactivity disorder and cognitive function in Duchenne muscular dystrophy: phenotype-genotype correlation. *J Pediatr.* 161, 705-9 e1.
- Pane, M., et al., 2013. Duchenne muscular dystrophy and epilepsy. *Neuromuscul Disord.* 23, 313-5.
- Petitprez, S., et al., 2011. SAP97 and dystrophin macromolecular complexes determine two pools of cardiac sodium channels Nav1.5 in cardiomyocytes. *Circ Res.* 108, 294-304.
- Pietrobon, D., 2010. CaV2.1 channelopathies. *Pflugers Arch.* 460, 375-93.
- Quignard, J.F., et al., 2001. Transient down-regulation of L-type Ca(2+) channel and dystrophin expression after balloon injury in rat aortic cells. *Cardiovasc Res.* 49, 177-88.
- Reissner, C., et al., 2014. Dystroglycan binding to alpha-neurexin competes with neurexophilin-1 and neuroligin in the brain. *J Biol Chem.* 289, 27585-603.
- Rommelink, E., et al., 2016. Cognitive flexibility deficits in a mouse model for the absence of full-length dystrophin. *Genes Brain Behav.* 15, 558-67.
- Ricotti, V., et al., 2016. Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations. *Dev Med Child Neurol.* 58, 77-84.
- Rurak, J., et al., 2007. Distribution of potassium ion and water permeable channels at perivascular glia in brain and retina of the Large(myd) mouse. *J Neurochem.* 103, 1940-53.
- Sabourin, J., et al., 2009. Regulation of TRPC1 and TRPC4 cation channels requires an alpha1-syntrophin-dependent complex in skeletal mouse myotubes. *J Biol Chem.* 284, 36248-61.
- Sadeghi, A., Doyle, A.D., Johnson, B.D., 2002. Regulation of the cardiac L-type Ca²⁺ channel by the actin-binding proteins alpha-actinin and dystrophin. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282, C1502-11.
- Sandoval, A., et al., 2004. Glycosylation of asparagines 136 and 184 is necessary for the alpha2delta subunit-mediated regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *FEBS Lett.* 576, 21-6.
- Sandoval, A., et al., 2007a. Inhibition of recombinant N-type Ca(V) channels by the gamma 2 subunit involves unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent mechanisms. *J Neurosci.* 27, 3317-27.
- Sandoval, A., et al., 2007b. gamma1-dependent down-regulation of recombinant voltage-gated Ca²⁺ channels. *Cell Mol Neurobiol.* 27, 901-8.
- Sara, Y., et al., 2005. An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. *Neuron.* 45, 563-73.
- Satz, J.S., et al., 2009. Visual impairment in the absence of dystroglycan. *J Neurosci.* 29, 13136-46.
- Schlick, B., Flucher, B.E., Obermair, G.J., 2010. Voltage-activated calcium channel expression profiles in mouse brain and cultured hippocampal neurons. *Neuroscience.* 167, 786-98.
- Sekiguchi, M., 2005. The role of dystrophin in the central nervous system: a mini review. *Acta Myol.* 24, 93-7.
- Sekiguchi, M., et al., 2009. A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice. *Brain.* 132, 124-35.
- Shy, D., et al., 2014. PDZ domain-binding motif regulates cardiomyocyte compartment-specific NaV1.5 channel expression and function. *Circulation.* 130, 147-60.
- Sicinski, P., et al., 1989. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science.* 244, 1578-80.
- Simms, B.A., Zamponi, G.W., 2014. Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron.* 82, 24-45.
- Smith, P.K., et al., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150, 76-85.

- Srour, M., et al., 2008. An instructive case of an 8-year-old boy with intellectual disability. *Semin Pediatr Neurol.* 15, 154-5; discussion 155-6.
- Sugita, S., et al., 2001. A stoichiometric complex of neurexins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol.* 154, 435-45.
- Tuffery-Giraud, S., et al., 2009. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat.* 30, 934-45.
- Tuffery-Giraud, S., et al., 2017. Normal and altered pre-mRNA processing in the DMD gene. *Hum Genet.* 136, 1155-1172.
- Turk, R., et al., 2005. Muscle regeneration in dystrophin-deficient mdx mice studied by gene expression profiling. *BMC Genomics.* 6, 98.
- Vaillend, C., Billard, J.M., Laroche, S., 2004. Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin-deficient *Dmd*(mdx) mouse. *Neurobiol Dis.* 17, 10-20.
- Vaillend, C., Chaussonnet, R., 2017. Relationships linking emotional, motor, cognitive and GABAergic dysfunctions in dystrophin-deficient mdx mice. *Hum Mol Genet.* 26, 1041-1055.
- Vandebrouck, A., et al., 2007. Regulation of capacitative calcium entries by alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin. *Faseb j.* 21, 608-17.
- Vieitez, I., et al., 2017. Mutational spectrum of Duchenne muscular dystrophy in Spain: Study of 284 cases. *Neurologia.* 32, 377-385.
- Westenbroek, R.E., et al., 1995. Immunochemical identification and subcellular distribution of the alpha 1A subunits of brain calcium channels. *J Neurosci.* 15, 6403-18.
- Wicksell, R.K., et al., 2004. Specific cognitive deficits are common in children with Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol.* 46, 154-9.
- Woolf, P.J., et al., 2006. Alterations in dihydropyridine receptors in dystrophin-deficient cardiac muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290, H2439-45.
- Yoshida, M., Ozawa, E., 1990. Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem.* 108, 748-52.
- Zamponi, G.W., et al., 2015. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. *Pharmacol Rev.* 67, 821-70.

11. Anexo

Pflügers Archiv - European Journal of Physiology (2023) 475:595–606
https://doi.org/10.1007/s00424-023-02803-1

ION CHANNELS, RECEPTORS AND TRANSPORTERS



Identification of Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin as novel molecular interactors of the neuronal $\text{Ca}_v2.1$ channel

Margarita Leyva-Leyva^{1,2} · Alejandro Sandoval³ · Sara Luz Morales-Lázaro⁴ · Alejandra Corzo-López⁵ · Ricardo Felix⁵ · Ricardo González-Ramírez¹

Received: 28 November 2022 / Revised: 21 February 2023 / Accepted: 6 March 2023 / Published online: 25 March 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

The primary function of dystrophin is to form a link between the cytoskeleton and the extracellular matrix. In addition to this crucial structural function, dystrophin also plays an essential role in clustering and organizing several signaling proteins, including ion channels. Proteomic analysis of the whole rodent brain has stressed the role of some components of the dystrophin-associated glycoprotein complex (DGC) as potential interacting proteins of the voltage-gated Ca^{2+} channels of the Ca_v2 subfamily. The interaction of Ca_v2 with signaling and scaffolding proteins, such as the DGC components, may influence their function, stability, and location in neurons. This work aims to study the interaction between dystrophin and $\text{Ca}_v2.1$. Our immunoprecipitation data showed the presence of a complex formed by $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$, $\text{Ca}_v\beta_{4e}$, Dp140, and $\alpha 1$ -syntrophin in the brain. Furthermore, proximity ligation assays (PLA) showed that $\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ interact with dystrophin in the hippocampus and cerebellum. Notably, Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin increase $\text{Ca}_v2.1$ protein stability, half-life, permanence in the plasma membrane, and current density through recombinant $\text{Ca}_v2.1$ channels. Therefore, we have identified the Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin as novel interaction partners of $\text{Ca}_v2.1$ channels in the mammalian brain. Consistent with previous findings, our work provides evidence of the role of DGC in anchoring and clustering Ca_v channels in a macromolecular complex.

Keywords Ca^{2+} channels · DGC · Dp140 · Dystrophin · Syntrophin · $\text{Ca}_v\beta_{4e}$

Introduction

Voltage-gated Ca^{2+} (Ca_v) channels are transmembrane protein complexes of 3–4 subunits, among which $\text{Ca}_v\alpha_1$ includes the ion-conducting pore and the voltage-sensing machinery. Ca_v channels are classified into high- and low-threshold channels (HVA and LVA, respectively) depending on the depolarization required for their activation. Ten genes encoding for the $\text{Ca}_v\alpha_1$ subunits have been identified and are grouped into three subfamilies. The Ca_v1 subfamily comprises four different L-type channels ($\text{Ca}_v1.1$ – $\text{Ca}_v1.4$), while the Ca_v2 subfamily consists of three members ($\text{Ca}_v2.1$ – $\text{Ca}_v2.3$) corresponding to P/Q-, N-, and R-type channels. Both subfamilies are part of the HVA channels, whose distinctive molecular characteristic is to form oligomeric complexes that, in addition to the pore-forming subunit, also include auxiliary subunits called β and $\alpha_2\delta$. Finally, the Ca_v3 subfamily, also known as T-type, groups the three members of the LVA channels ($\text{Ca}_v3.1$ – $\text{Ca}_v3.3$), which are characterized by being

✉ Ricardo Felix
rfelix@cinvestav.mx

✉ Ricardo González-Ramírez
ricardo.gonzalezr@salud.gob.mx

¹ Department of Molecular Biology and Histocompatibility, “Dr. Manuel Gea González” General Hospital, Mexico City, Mexico

² Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad de México, México

³ School of Medicine FES Iztacala, National Autonomous University of México (UNAM), Tlalnepantla, Mexico

⁴ Departamento de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

⁵ Department of Cell Biology, Centre for Research and Advanced Studies (Cinvestav), Mexico City, Mexico

functional monomers of the $\text{Ca}_v\alpha_1$ subunit. Ca_v channels are key transducers of membrane potential changes into intracellular Ca^{2+} transient signals that initiate many physiological processes, including neurotransmission [7, 37].

On the other hand, in research on cellular and molecular alterations in Duchenne muscular dystrophy, numerous studies have identified several cytoskeleton and plasma membrane components that are crucial for normal cell function. Furthermore, the characterization of the muscular dystrophy gene led to the identification of dystrophin as the central element in the pathophysiology of the disease. Dystrophin is the product of the *DMD* gene and is a large protein of 427 kDa consisting of four regions, dominated by a large rod-shaped domain composed of 24 spectrin-like repeats. Dystrophin is currently recognized as a structural protein responsible for providing stability and helping to preserve the integrity of the cell membrane during skeletal muscle contraction [11].

Subsequently, when dystrophin was solubilized from the sarcolemma fraction, it was found to be associated with a large oligomeric complex of proteins and glycoproteins called the dystrophin-associated glycoprotein complex (DGC), which consists of peripheral and integral membrane proteins/glycoproteins. The DGC comprises different subcomplexes, the dystrophin/utrophin membrane component, the sarcoglycan/sarcospan transmembrane component, the intracellular/extracellular associated proteins, and the dystrobrevin/syntrophin intracellular component [5, 8].

Dystrophin and the DGC are expressed in skeletal muscle and other tissues, including the central nervous system (CNS), where the loss of this protein and, subsequently, the DGC may be associated with critical functional alterations. Likewise, several dystrophin isoforms (mainly Dp71 and Dp140) produced by splicing or alternative promoters and components of DGC have been reported in the brain [24]. As in myocytes, dystrophin and DGC in neurons provide membrane stability, but it is also likely that they play a signaling function. Indeed, the DGC allows the assembly and interaction of various signaling proteins, including neurotransmitter receptors such as glutamate NMDA or GABA_A receptors, and ion channels such as TRPs, and voltage-gated Na^+ , Ca^{2+} , and K^+ channels [9, 24], suggesting a role in the organization and regulation of the synapses. Interestingly, in the case of Ca_v channels, a functional interaction between L-type channels and dystrophin has been reported in murine cardiac myocytes, suggesting that channel activity could be regulated by elements that stabilize the cytoskeleton [13, 28, 29]. On the other hand, in the present report, we show evidence of a novel molecular interaction between Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin with $\text{Ca}_v2.1$ channels in the mammalian brain, which could confer greater versatility to neuronal channels function.

Materials and methods

Animals

All experimental procedures were performed following ethical guidelines and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the "Dr. Manuel Gea González" General Hospital (Mexico City, Mexico). Male 8- to 10-week-old C57BL/6 mice were housed in an environment with a controlled 12 h:12 h light/dark cycle and free access to food and water.

Immunoprecipitation (IP)

Mouse whole brain, hippocampus, and cerebellum tissues were lysed in ice-cooled IP buffer [50 mM Tris–HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.5 mM PMSF, 10 mM NaF, 1 mM Na_2VO_4 , 2X Complete EDTA-free protease inhibitor mix (Roche Applied Science)] to isolate total protein. Aliquots of 1 mg of total protein were mixed with 30 μL of Recombinant Protein G Agarose beads (rPGA, Invitrogen) previously equilibrated with IP buffer containing 1% BSA and incubated 2 h at 4 °C in 500 μL final volume with gentle shaking. The rPGA was removed by centrifugation at $12,470 \times g$ for 5 min; the pre-clared protein extracts were mixed with 20 μL of new pre-equilibrated rPGA and 5 μg of specific antibody or an irrelevant IgG_0 as a negative control (supplemental table 1) and incubated overnight at 4 °C with shaking. The immunocomplexes were recovered by centrifugation at $12,470 \times g$ for 5 min and washed three times with 1 mL of wash buffer [50 mM Tris–HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5 mM PMSF] and twice with 500 μL of PBS by shaking for 10 min at 4 °C. After centrifugation at $12,470 \times g$ for 5 min, pellets were suspended with 2X Laemmli sample buffer (125 mM Tris–HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue).

Western blot

Total protein extracts and co-immunoprecipitated proteins were separated by SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). After electrophoresis, proteins were transferred to PVDF membranes (Amersham Pharmacia GE Healthcare), blocked with 1% Hammerstein grade casein (MP Biomedicals) in TBS-T (10 mM Tris–HCl pH 7.6, 15 mM NaCl, 0.05% Tween 20) and incubated overnight with the appropriate antibody in TBS-T (supplemental table 1). After washing three times with TBS-T, membranes were incubated with the corresponding HRP-conjugated secondary antibody in

TBS-T containing 5% non-fat milk for 1 h. Except otherwise noted, samples were run in parallel, and actin was detected in the same membrane. According to the manufacturer's instructions, immunoblots were developed using the ECL Western blotting detection kit (Amersham Pharmacia GE Healthcare).

Proximity ligation assays (PLA) and imaging

Mice were anesthetized with an intramuscular injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and transcardially perfused with cold PBS (pH 7.4) followed by 4% paraformaldehyde in PBS (4% PFA). Brains were fixed in 4% PFA for 24 h at 4 °C, then submerged in 10%, 20%, and 30% sucrose in PBS for 24 h each. Next, brains were embedded in Tissue-Tek O.C.T. and coronally sliced in 20 µm sections on a cryostat. Brain sections were subjected to antigen retrieval with 1% SDS in PBS for 5 min at room temperature, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 10 min and incubated in blocking solution for 30 min at 37 °C in a humidity chamber. Sections were then incubated overnight with primary antibodies at 4 °C in a pre-cooled humidity chamber. The interactions in the brain were detected by PLA [2] using the Duolink in situ red starter kit (Sigma-Aldrich) carried out according to the manufacturer's instructions. Control experiments were performed in the absence of primary antibodies. Neuron structures were contrasted by incubation 2 h at room temperature with a neuronal marker. Images were acquired on a Zeiss LSM 710 Duo confocal microscope using a 63X oil-immersion lens.

Amplification of Dp140, α 1-syntrophin, and $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ cDNAs

Total RNA was isolated from whole mouse brains by TRIzol™ Reagent (Invitrogen), and reverse transcription was performed with 1 µg of total RNA using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). Following the cDNA synthesis, PCR was conducted to amplify the coding region of Dp140, α 1-syntrophin, and $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ with Hercul polymerase (Agilent Technologies). Since the mouse Dp140 sequence has not been reported, we aligned the human Dp140 sequence (NM_004013) with the mouse full-length dystrophin sequence (NM_007868) to locate the region that corresponds to the isoform Dp140. Once the start codon was located, the primers flanking the entire region corresponding to Dp140 were designed, forward primer (F): 5'-ATGCCATCTTCC TTGATG-3' and reverse primer (R): 5'-CCATTGTGTCCT CTCTCAT-3'. The PCR was performed under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 5 min, 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 52 °C for 10 s, and extension at 68 °C for 4 min; final elongation step of 68 °C for 10 min. α 1-syntrophin (NM_009228) was

amplified using the following primers F: 5'-ATGGCGTCA GGCAGGCGC-3' and R: 5'-CGGCCAAGAGCCCCAAGC G-3'. The PCR was performed under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 5 min; 30 cycles of denaturation at 94 °C for 20 s, annealing at 55 °C for 20 s, and extension at 68 °C for 2 min, and a final extension step of 68 °C for 10 min. $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ (NM_001285428) was amplified using the following primers F: 5'-GGATCCATGGTA TCAGGAACATTCCG-3' and R: 5'-GTCGACTCAAAG CCTATGTCGGGAGT-3'. The PCR was performed under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 5 min; 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 58 °C for 10 s, and extension at 68 °C for 1 min, and final extension step of 68 °C for 10 min. PCR products were then subjected to 1% agarose gel electrophoresis, and amplified bands were visualized by ethidium bromide staining and purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen).

Cloning of Dp140, α 1-syntrophin, and $\text{Ca}_v\beta_{4e}$

Dp140 and α 1-syntrophin were cloned into pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO vector (Invitrogen) to express these proteins with a green fluorescent protein (GFP) fused to the C-terminus following the manufacturer's specifications. In addition, $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ was cloned into the BamHI and SalI sites of the pCMV-Tag2B (Agilent Technologies) vector to express this protein with an N-terminal FLAG epitope tagging. The clones were characterized by restriction analysis and sequenced on an automated sequencer ABI PRISM 310 (Applied Biosystems), for the final identity verification.

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney (HEK)-293 cells (ATCC, CRL-11268) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium–high glucose (DMEM, GIBCO) supplemented with 5% fetal bovine serum, 1% L-glutamine, 110 mg/L sodium pyruvate, and antibiotics, at 37 °C under a humidified atmosphere containing 5% CO_2 , 95% air. For the control condition: HEK-293 cells were transiently transfected with 1.0 µg of each of the plasmids containing the cDNA of human $\text{Ca}_v2.1$ (AF004883) [17, 18], $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ (M86621) [22], and $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ (this paper) using TurboFect Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.) according to the manufacturer's instructions. For the problem condition: pcDNA3.1-Dp140-GFP (this paper) and pcDNA3.1- α 1-syntrophin-GFP (this paper) were added to the control condition combination of plasmids.

Cycloheximide (CHX) assays

The $\text{Ca}_v2.1$ protein half-life was determined by performing a protein synthesis inhibition assay using CHX

(Sigma-Aldrich, Inc.) [21]. Briefly, HEK-293 cells were transiently transfected in the control and the problem condition. After 24 h of transfection, cells were subjected to treatment with CHX (50 µg/ml in DMEM). The cells were harvested at 0, 8, 24, 32, and 48 h after treatment and lysed to obtain total protein extracts. The extracts were quantified and analyzed by Western blotting using an anti-Ca_v2.1 antibody and anti-actin antibody as a loading control. After chemiluminescent detection, the relative intensity of the band corresponding to the Ca_v2.1 protein and actin was quantified with the Fiji 2.5.0 software [32]. The averages of the Ca_v2.1 densities from three independent trials were normalized against the averages of the actin densities at each time point. Subsequently, the data were normalized against time 0, and the data's natural logarithm (ln) was obtained. The ln was plotted, and the curve fitted to a first-order exponential function using linear regression by the least-squares method to determine the decay rate constant (k, the slope), which was used to calculate the half-life value of the Ca_v2.1 protein [4].

Cell surface protein biotinylation

A protein biotinylation assay was performed using a biotin labeling kit (Thermo Scientific). Briefly, HEK-293 cells were transiently transfected in the control and problem condition. After 48 h of transfection, cells were washed with cold PBS and labeled with sulfo-NHS-SS-Biotin (0.25 mg/ml) for 30 min at 4 °C. Quench solution was added to stop the reaction, and the cells were then scraped off and washed with PBS to remove unbound biotin, resuspended in mild detergent lysis buffer, and sonicated. After 30 min incubation on ice, the lysates were clarified, and the biotinylated proteins were affinity purified by incubation with NeutrAvidin agarose resin. Bound proteins were analyzed by Western blot using anti-Ca_v2.1 and anti-Na⁺/K⁺-ATPase antibodies. The effect of dystrophin Dp140 and α1-syntrophin on the surface expression of the Ca_v2.1 channel was assessed by quantifying the density of the bands obtained from three independent experiments. The purity of membrane proteins was verified with an anti-calnexin antibody.

Electrophysiology

Ba²⁺ currents through recombinant Ca_v2.1 channels were recorded 48 h after transfection of HEK-293 cells with the control and problem conditions, using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique at room temperature (22 °C). The extracellular solution contained (in mM): 5 BaCl₂, 125 TEA-Cl, 10 HEPES, and 15 glucose (pH 7.3). The intracellular solution contained (in mM): 110 CsCl, 5 MgCl₂, 10 EGTA, 10 HEPES, 4 Na-ATP, and 0.1 Na-GTP (pH 7.3). Transfected cells were identified by observing

GFP fluorescence with a Nikon TE300 inverted microscope. Recordings were performed using an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices). Currents were digitized at a sampling rate of 5.71 kHz and filtered at 2 kHz (four-pole Bessel filter). Data acquisition and analysis were performed using a Digidata 1320A interface (Molecular Devices) with pClamp10 software (Molecular Devices) and SigmaPlot version 11.0 (Systat Software, Inc.) as described elsewhere [30]. Linear leak and residual capacitance components were subtracted online using a P/4 protocol. Membrane capacitance (C_m) was determined as previously described and used to normalize currents [3].

Statistical analysis

All graphs were generated using Sigma Plot v12.0 (Systat Software, Inc.). Statistical significance was determined by Student's t-test (Sigma Plot). Values of *P* < 0.05 were considered significant. Data values are presented as means ± standard error of the mean (SEM). For statistical analysis of the cycloheximide assays data were fitted to linear functions and the mean of their slopes were compared using Student's t-test.

Results

Dp140 interacts with Ca_v2.1 channels in the mouse brain.

The study of the Ca_v2 proteome revealed the interaction of the channels with some of the components of the DGC complex [26]. Hence, to distinguish the DGC proteins that could be interacting with the Ca_v2.1 channels, we performed a series of immunoprecipitation assays using mouse brain lysates. We first asked whether dystrophin may interact with the Ca_v2.1 channel. To this end, we used a pan-specific anti-dystrophin antibody to immunoprecipitate all dystrophin isoforms from the brain, and the recovered complexes were then analyzed by western blotting. Figure 1A shows that we detected a band of approximately 190 kDa when using an antibody that recognizes Ca_v2.1 (IP lane). This is consistent with the reports showing that Ca_v2.1 in the mouse brain comprises a major isoform with an apparent molecular weight of ~190 kDa [1]. This result also shows an interaction between dystrophin and the channel protein.

Likewise, another protein that forms part of the channel complex is the Ca_vα₂δ-1 auxiliary subunit; therefore, we decided to explore whether this subunit might interact with dystrophin. Figure 1B shows a band of about 140 kDa, consistent with the molecular size of the Ca_vα₂δ-1 subunit (IP lane) [16]. Last, given that the expression of the *DMD* gene produces several isoforms of dystrophin selectively distributed in the mouse brain, we then sought to determine which isoform interacts with the channel complex, using an

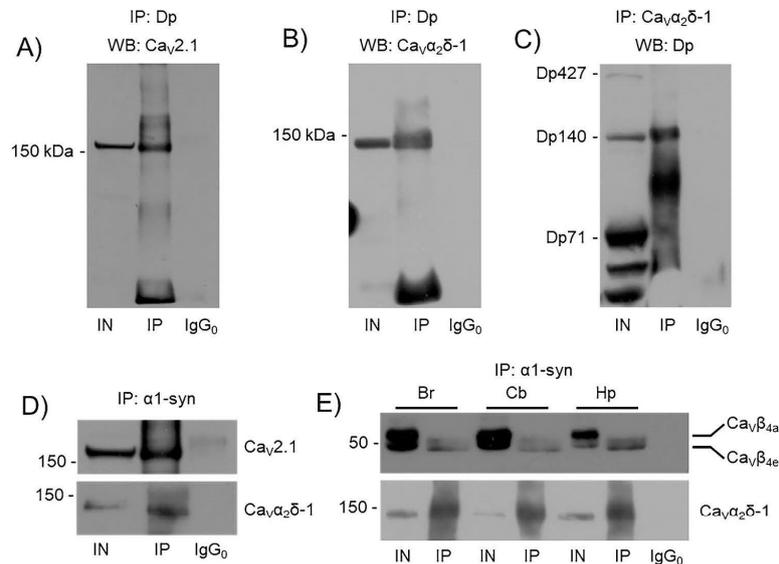


Fig. 1 Dystrophin (Dp) and α 1-syntrophin (α 1-syn) interacts with the $\text{Ca}_v2.1$ channel complex in the mouse brain. Western blot analysis using anti- $\text{Ca}_v2.1$ and anti- $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ specific antibodies after immunoprecipitation of dystrophin. (A) Input (IN) lane shows the presence of a ~190 kDa $\text{Ca}_v2.1$ band and co-immunoprecipitated with H4 antibody (IP). (B) IN lane shows a ~140 kDa $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ band and co-immunoprecipitated with H4 antibody (IP). (C) Western blot analysis after immunoprecipitation with anti- $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ specific antibody. IN lane shows the presence of bands corresponding to Dp427, Dp140, Dp71 and short Dp71 isoforms detected with the pan-dystrophin antibody IP lane shows Dp140 co-immunoprecipitated with $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$. An irrelevant antibody was used as negative control (IgG₀ lane). IP, antibody used for immunoprecipitation; WB, antibody used for immunoblotting. The examples shown are representative of three

separate experiments (obtained from tissue of three different animals). (D) IN (top) lane shows a ~190 kDa $\text{Ca}_v2.1$ band co-immunoprecipitated with anti- α 1-syn antibody (IP). IN (bottom) lane shows a ~140 kDa $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ band co-immunoprecipitated with anti- α 1-syn antibody (IP). (E) The upper panel shows a ~58 kDa $\text{Ca}_v\beta_4$ band and a lower MW isoform (mainly expressed in cerebellum and poorly expressed in hippocampus) co-immunoprecipitated with the anti- α 1-syn antibody (IP). The lower panel shows a ~140 kDa $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ band co-immunoprecipitated with the anti- α 1-syn antibody (IP). An irrelevant antibody was used as negative control (IgG₀ lane). Br, whole brain; Cb, cerebellum; Hp, hippocampus; IP, antibody used for immunoprecipitation; WB, antibody used for immunoblotting. The examples shown are representative of three separate experiments (obtained from tissue of three different animals).

antibody that recognizes $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ for immunoprecipitation, and a pan-specific anti-dystrophin antibody to perform the western blot analysis. Figure 1C shows that the antibody recognized all dystrophin isoforms in the brain (Dp427, Dp140, Dp71), including some minor variants of Dp71 (IN lane). Interestingly, we detected a band of about 140 kDa corresponding to the Dp140 isoform in the immunoprecipitate (IP lane) which was the, only dystrophin isoform that co-immunoprecipitated with $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$, even though Dp71 is the most abundant isoform in the brain. In all experiments, the immunoprecipitation specificity was evaluated using an unrelated antibody, which did not bring down any of the proteins of interest (IgG₀ lane).

It should be noted that in these immunoprecipitation experiments of the $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ subunit, the second lane shows a prominent band in the middle. Although the origin of this band or its identity is unclear, it could result from some non-specific interaction that occurs during immunoprecipitation.

This is because the band is not evident in the western blot of the lysates before immunoprecipitation, and its molecular size is not compatible with that of the different dystrophin isoforms reported to date. α 1-syntrophin is a crucial component of the DGC, and it is an adaptor protein that binds various signaling proteins. Previous studies showed that α 1-syntrophin interacts with several ion channels; for example, in cardiomyocytes, it interacts with voltage-gated Na^+ channels of the $\text{Na}_v1.5$ class through its PDZ domain [15, 25, 34]. To investigate whether α 1-syntrophin interacts with the $\text{Ca}_v2.1$ channel, we next performed immunoprecipitation experiments in brain lysates using an antibody directed against α 1-syntrophin. Figure 1D shows a ~190 kDa band when the antibody that recognizes $\text{Ca}_v2.1$ was used (IP lane), suggesting that α 1-syntrophin interacts with the channel. Likewise, to investigate whether the Ca_v channel auxiliary subunits were part of this interaction, we conducted western blot analyses using anti- $\text{Ca}_v\beta_4$ antibody

(Fig. 1E). The results indicated the presence of two bands of ~57 and ~40 kDa corresponding to the $\text{Ca}_v\beta_{4a}$ and $\text{Ca}_v\beta_{4c}$ isoforms [12], respectively (IN lane in the brain). Unexpectedly, $\text{Ca}_v\beta_{4c}$ co-immunoprecipitated with $\alpha 1$ -syntrophin (Fig. 1E; IP lane in brain; and IN lanes in cerebellum and hippocampus). As can also be seen in Fig. 1E, in the two latter regions, the $\text{Ca}_v\beta_{4c}$ subunit co-immunoprecipitated with $\alpha 1$ -syntrophin (IP lanes). Last, we explored the potential interaction of the $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -1 subunit with $\alpha 1$ -syntrophin in the brain, cerebellum, and hippocampal lysates. Figure 1D shows the presence of a ~140 kDa band corresponding to $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -1, supporting the idea that the auxiliary subunit interacts with $\alpha 1$ -syntrophin. Collectively, these data suggest that $\text{Ca}_v2.1$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -1, $\text{Ca}_v\beta_{4e}$, Dp140, and $\alpha 1$ -syntrophin form part of a stable multiprotein complex in the brain.

Dp140 colocalizes with $\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -1 in the hippocampus and cerebellum.

To elucidate whether Dp140 and $\text{Ca}_v2.1$ are in close proximity (within ≤ 40 nm) in the mouse brain, we used a proximity ligation assay (PLA). Coronal brain sections were incubated with the anti-dystrophin and anti- $\text{Ca}_v2.1$ antibodies. We detected numerous fluorescent red dots in these assays, indicating that Dp140 and $\text{Ca}_v2.1$ are expressed and interact in the hippocampus (Fig. 2A) and the cerebellum (Fig. 2B). Likewise, upon incubation with anti-dystrophin and anti- $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -1 antibodies, we identified the interaction

of Dp140 with the auxiliary subunit also in the hippocampus and the cerebellum (Fig. 3A and B). In both combinations of antibodies, the punctate was located in the axons (these structures were contrasted with a neuronal marker for clarity), and we observed a dots line following the axon trajectory (zoom panel). Negative controls, where the primary antibodies were omitted, resulted in no observable fluorescent signal (control panel), confirming that the pairs of secondary probes used do not bind close to each other in a non-specific manner.

Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin increase the $\text{Ca}_v2.1$ protein stability.

Dystrophin and $\alpha 1$ -syntrophin can bind to various ion channels regulating their clustering, stability, and biophysical properties [24]. To directly determine whether these two proteins affect the stability of $\text{Ca}_v2.1$, HEK-293 cells transiently transfected with the channel complex (plasmids encoding $\text{Ca}_v2.1\alpha_1$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -1, and $\text{Ca}_v\beta_{4e}$) with and without Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin were treated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide for various times (8, 24, 32 and 48 h). With de novo protein synthesis blocked, the stability of $\text{Ca}_v2.1$ was determined by western blot analysis. Total $\text{Ca}_v2.1$ levels were most stable when Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin were present (Fig. 4A). Indeed, our data indicate that Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin significantly increased the half-life of $\text{Ca}_v2.1$ (Fig. 4B). Here, it is worth noting

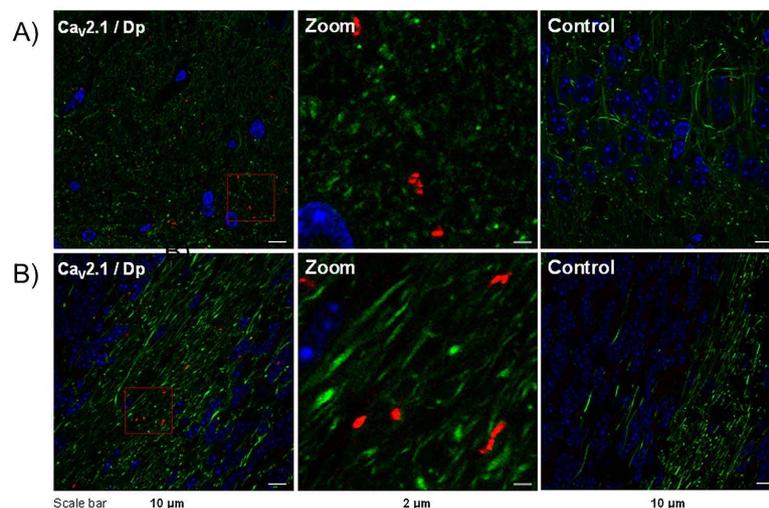


Fig. 2 Dystrophin interacts with $\text{Ca}_v2.1$ channels in the hippocampus and the cerebellum. Confocal images of 20 μm coronal sections of mouse brain (A) and cerebellum (B) after proximity ligation assay (PLA-Duolink) using dystrophin and $\text{Ca}_v2.1$ antibodies. PLA signals (red dots) represent dual recognition against dystrophin and $\text{Ca}_v2.1$. DAPI (blue) was used for nuclear staining, and cell structures were

visualized using a neuronal marker conjugated to Alexa Fluor 488 (green) for counterstaining. Control experiments were performed in the absence of primary antibodies. Sections were examined using a Zeiss LSM 710 Duo confocal microscope. Images are representative results of three independent replicates (obtained from tissue of three different animals)

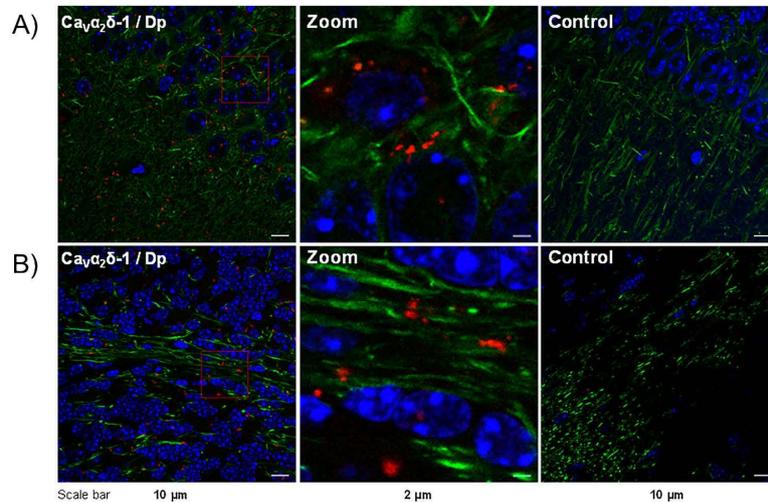


Fig. 3 Dystrophin interacts with $\text{Ca}_v2.1$ in the hippocampus and the cerebellum. Confocal images of 20 μm coronal sections of mouse brain (A) and cerebellum (B) after proximity ligation assay (PLA-Duolink) using dystrophin and $\text{Ca}_v2.1$ antibodies. PLA signals (red dots) represent dual recognition against dystrophin and the $\text{Ca}_v2.1$ subunit. DAPI (blue) was used for nuclear staining, and cell struc-

tures were visualized with a neuronal marker conjugated to Alexa Fluor 488 (green) for counterstaining. Control experiments were performed in the absence of primary antibodies. The sections were examined using a Zeiss LSM 710 Duo confocal microscope. Images are representative results of three independent replicates (obtained from tissue of three different animals)

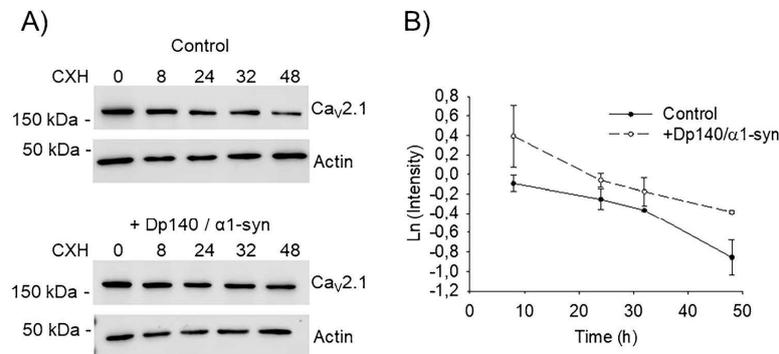


Fig. 4 Dystrophin Dp140 and α 1-syntrophin increase the $\text{Ca}_v2.1$ half-life. (A) Representative immunoblots comparing the effect of Dp140/ α 1-syn co-expression on protein stability of human $\text{Ca}_v2.1$ subunit. The $\text{Ca}_v2.1$ protein turnover kinetics in HEK-293 cells was analyzed by applying cycloheximide (CHX) with the indicated treatment durations (h). The upper panel shows a representative blot of lysates from cells expressing $\text{Ca}_v2.1/\text{Ca}_v2.1/\text{Ca}_v\beta_4$ used as controls ($n=3$). The lower panel corresponds to cell extracts from HEK-293 cells expressing $\text{Ca}_v2.1/\text{Ca}_v2.1/\text{Ca}_v\beta_4$ channels in the pres-

ence of Dp140/ α 1-syn as indicated. (B) Quantification of $\text{Ca}_v2.1$ protein half-life in the absence or presence of Dp140/ α 1-syntrophin normalized to actin (filled and empty symbols, respectively). The quantification was performed by normalizing the total protein over that of actin. Data points were fit to linear functions, and their slopes were compared. The last point does not have an apparent scatter bar since the standard error of the mean was small and masked by the symbol's size. However, the data corresponds also to the quantification of several separate experiments ($P < 0.02$; $n=4$)

that the statistical analysis was not performed point by point on each time interval. Instead, experimental data were fit to linear functions, and their slopes were compared. The average slope for the control was -24.3 ± 5.2 , while for the condition in the presence of Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin it was -62.4 ± 10.9 ($P < 0.02$).

Here, it should also be noted that when multiple transfections are performed, as in this case where up to five different plasmids were used simultaneously, the question arises as to whether all the proteins encoded by the plasmids are being expressed in the system. Lack of expression of one or more of them could cause artifactual responses or lack of phenotype. However, the estimation of the efficiency of the transfection frequently constitutes a challenge for this type of experiments. Therefore, we next performed a series of western blot control experiments to detect the expression of all the proteins of interest after simultaneous transfection with the five plasmids used in the present study (pcDNA3.1-Dp140-GFP, pcDNA3.1- $\alpha 1$ -syntrophin-GFP, pCMV-Tag2B- $\text{Ca}_v\beta_{4e}$, pCDNA3- $\text{Ca}_v2.1$, and pCDNA3- $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$). This analysis showed that all proteins were expressed in our system after transfection (Suppl. Fig. 1).

Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin contribute to determine the levels of $\text{Ca}_v2.1$ channels in the cell membrane.

The change in the half-life of $\text{Ca}_v2.1$ may increase the levels of the channel in the plasma membrane. To determine whether there is an increase in the channel number in the membrane, we performed a biotinylation assay of cell-surface proteins. HEK-293 cells transfected with the channel complex in the absence and presence of Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin. After 48 h of transfection, membrane proteins were labeled with biotin and isolated. Subsequently, we measured the levels of $\text{Ca}_v2.1$ in the plasma membrane and total protein extracts by Western blotting. This analysis showed that though co-expression of Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin causes an apparent increase in the amount of $\text{Ca}_v2.1$ channels in both the plasma membrane and total extracts, the differences observed were not statistically significant (Suppl. Fig. 2).

Next, we sought to determine the possible functional impact of the described molecular interactions. To that end, electrophysiological recordings were carried out using the whole cell mode of the patch-clamp technique as described elsewhere [14], using HEK-293 cells heterologous expressing $\text{Ca}_v2.1$ channel subunits ($\text{Ca}_v2.1\alpha_1$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$, and $\text{Ca}_v\beta_{4e}$), in the absence or presence of Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin. Forty-eight h after transfection, the cells were subjected to electrophysiological recording, and the currents using barium as a charge carrier were compared in the two experimental conditions. Figure 5A shows typical superimposed current traces in response to 10 mV test pulses from a holding potential of -80 mV, showing that the presence of Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin induces a significant

increase in the amplitude of the current. On average, the increase in maximum current density (I_m/C_m) was about 40% ($P < 0.05$; Fig. 5B). This increase is also significant at various voltages evaluated, as shown by the comparison of the current–voltage curves in Fig. 5C.

In contrast, the presence of Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin did not modify the position of the conductance and steady-state inactivation curves on the voltage axis (Fig. 5D and E, respectively). Similarly, neither the activation nor the inactivation kinetics during the pulse is affected by the presence of Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin (Fig. 5F). The fact that there is an increase in current density, without affecting the kinetics or the voltage dependence of the currents, suggests that the effect of Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin is on the number of channels (n) in the plasma membrane and not on its functional properties. These findings fully agree with the data obtained in the cycloheximide assays, which show an increase in the $\text{Ca}_v2.1\alpha_1$ protein stability, and with those of biotinylation, which show an increase in the channel protein in the plasma membrane.

In sharp contrast, the results of our functional assays show that the activity of the $\text{Ca}_v2.1$ channels in the presence of the full-length $\text{Ca}_v\beta_{4a}$ subunit does not change significantly when Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin are overexpressed. Figure 5G shows representative superimposed current traces in response to activating pulses, showing that the presence of Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin do not have an effect on current amplitude when the channel complex comprises the full-length variant of the $\text{Ca}_v\beta_4$ subunit. The same is true for all the voltages explored, as shown in the comparison of the current- and conductance-voltage curves (Fig. 5H and I). Taken together, these results suggest that the effect Dp140 and $\alpha 1$ -syntrophin on channel activity depends on $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ and is independent of $\text{Ca}_v\beta_{4a}$ subunit.

Discussion

Ca_v2 channels consist of a pore-forming $\text{Ca}_v\alpha_1$ subunit and at least two distinct auxiliary subunits called $\text{Ca}_v\beta$ and $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ [37]. Occasionally, a third auxiliary subunit called $\text{Ca}_v\gamma$ may be associated with the channel complex [20]. Likewise, proteome studies have revealed that the Ca_v2 channel is part of a microenvironment of about 200 proteins in addition to the aforementioned auxiliary subunits. Thus, several classes of proteins form this macro-complex, and interestingly, some of these proteins belong to the dystrophin-associated glycoprotein complex [26]. The present work shows evidence that the $\text{Ca}_v2.1$ channel interacts with dystrophin and the DGC. Our co-immunoprecipitation assays show the molecular identity of a protein complex formed by the $\text{Ca}_v2.1$ channel and its auxiliary subunits $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ and $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$, together with Dp140 and

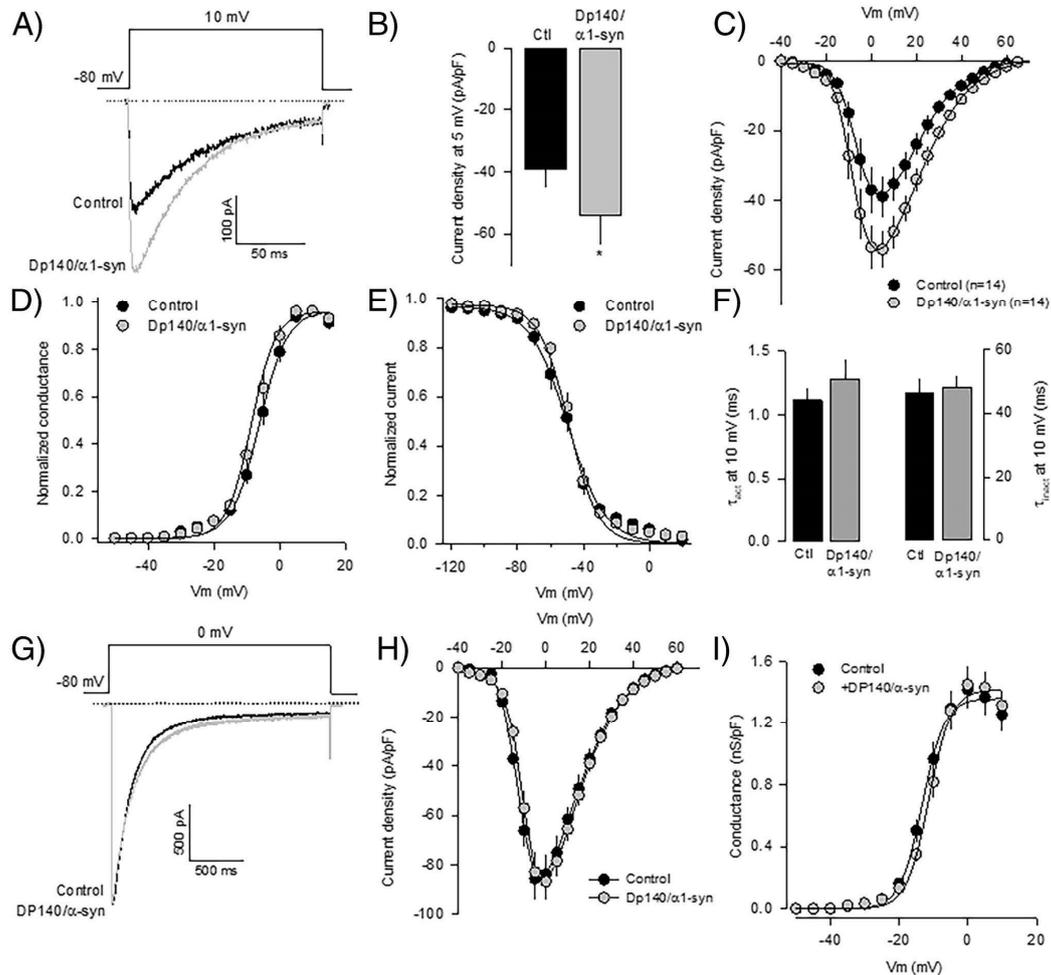


Fig. 5 Dp140/ $\alpha 1$ -syntrophin augments the number of $Ca_v2.1$ channels in the membrane. (A) Representative superimposed current traces through neuronal $Ca_v2.1$ channels obtained in HEK-293 cells in the control condition (transfected with the cDNA encoding the channel complex), and co-transfected with the cDNA that code for Dp140/ $\alpha 1$ -syn. It is worth recalling that, in this case, the transfected auxiliary subunit was the short version $Ca_v\beta_{4c}$. (B) Bar graph comparing the average peak current density (pA/pF) through the heterologously expressed channels as in (A). Data are presented as the mean \pm standard error, and the asterisk indicates statistical significance ($p < 0.05$ Student's t -test). (C) I - V curves for $Ca_v2.1$ channels recorded in HEK-293 cells transfected as in (A). The number of recorded cells is indicated in parentheses. (D) Comparison of the curves of normalized maximum conductance as a function of volt-

age in the absence and presence of Dp140/ $\alpha 1$ -syn. (E) Comparison of steady-state inactivation curves in the absence and presence of Dp140/ $\alpha 1$ -syn as indicated. (F) Bar graph comparing the time constant (τ) of activation (left) and inactivation during the pulse (right) in control and co-transfected cells with Dp140/ $\alpha 1$ -syn. (G) Representative superimposed current traces through neuronal $Ca_v2.1$ channels obtained in HEK-293 cells in the control condition (transfected with the cDNA encoding the channel complex) and co-transfected with the cDNA that code for Dp140/ $\alpha 1$ -syn. In this case, the channel complex included the full-length $Ca_v\beta_{4a}$ auxiliary subunit. (H) Comparison of the I - V curves for $Ca_v2.1$ channels recorded in HEK-293 cells transfected as in (A). (I) Comparison of the curves of maximum conductance as a function of voltage in the absence and presence of Dp140/ $\alpha 1$ -syn

α 1-syntrophin in the mouse brain. Likewise, using PLA assays, we confirmed the interaction of $\text{Ca}_v2.1$ with dystrophin. Interestingly, in some brain regions, the distribution of these molecular complexes is a succession of points all along the axon. Furthermore, we show that the association of the channel with Dp140 and α 1-syntrophin changes the stability of the $\text{Ca}_v2.1$ protein, increasing its half-life. We speculate that this change may have a functional consequence since it helps stabilize the channel at the plasma membrane, increasing its number and augmenting current density.

Recent studies have shown that the absence of Dp140 impairs glutamatergic transmission in basolateral neurons of the amygdala in *mdx52* mice [19]. In particular, it has been reported that there is a decrease in the excitatory/inhibitory postsynaptic current ratio and the frequency of miniature excitatory postsynaptic currents. These data suggest that the plasticity of synapses is different in mice lacking Dp140. Furthermore, the absence of Dp140 also decreases the expression of VGLUT1 and, consequently, the number of presynaptic vesicles [19]. Interestingly, $\text{Ca}_v2.1$ channels located in presynaptic terminals, soma membranes, and dendrites have a prominent role in the action potential-triggered neurotransmitter release and spontaneous neurotransmitter release in the resting state [27, 31]. Furthermore, the spontaneous glutamatergic release is triggered by an increase in Ca^{2+} produced by the stochastic opening of Ca_v channels [10]. This spontaneous release of neurotransmitters is a calmodulin-dependent process and requires presynaptic vesicles in the vicinity of the $\text{Ca}_v2.1$ channels [23].

As mentioned earlier, dystrophin forms a larger molecular complex composed of dystroglycans, sarcoglycans, sarcospan, dystrobrevins, and syntrophin [5, 8, 9]. In particular, two syntrophin binding sites are known to exist at the carboxyl terminus of dystrophin. Syntrophins are a multigene family of cell membrane-associated adapter proteins that may interact with various proteins, implicating syntrophins in numerous cell signaling pathways [9]. For example, in the brain, it has been shown that α 1-syntrophin may interact with nNOS in specific neurons and that it can also bind to the C-terminus of voltage-gated sodium channels in skeletal and cardiac muscle [9, 14]. The idea that the dystrophin/syntrophin complex interacts with ion channels and regulates their function has also been proposed for TRPC channels [9, 36]. These studies highlight the central role of α 1-syntrophin in maintaining a signaling complex anchored to the dystrophin scaffold necessary for proper ion channel expression and function.

Another essential component in the organization of the presynaptic membrane is the auxiliary subunit $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -1. Indeed, it is well known that the release of neurotransmitters mediated by $\text{Ca}_v2.1$ channels depends on the interaction of $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -1 with α -neurexin. The latter protein is a positive regulator of $\text{Ca}_v2.1$ channels and is known to

interact with α -dystroglycan, a member of the DGC [6, 35]. This reveals that glutamatergic transmission is a process in which $\text{Ca}_v2.1$ and $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -1 are involved. In this context, our results suggest that Dp140 and α 1-syntrophin cluster the $\text{Ca}_v2.1$ channel complex into a nanodomain where calmodulin and the neurotransmitter-containing vesicles are in close proximity. The PLA assay results support this speculation since the interaction between Dp140 and the $\text{Ca}_v2.1/\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -1 complex has a somatodendritic localization in the hippocampus and cerebellum. In addition, our electrophysiological analyses showed that this interaction, which increases the half-life of the protein, also influences the activity of the channels, which could determine the adequate release of neurotransmitters.

A distinctive feature of this novel molecular interaction between Dp140/ α 1-syntrophin and the $\text{Ca}_v2.1$ channel complex is the involvement of the $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ subunit. This protein is a short variant of the full-length $\text{Ca}_v\beta_4$ auxiliary subunit highly expressed in the hippocampus, cortex, and cerebellum [33]. At the cellular level, the $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ isoform is abundant in the distal axon and, unlike the full-length $\text{Ca}_v\beta_4$ subunit, does not display any nuclear targeting properties. In addition, this variant fulfills functions dependent on its association with the Ca_v channels in the presynapsis [12]. Notably, the results of our functional assays show that the activity of the $\text{Ca}_v2.1$ channels in the presence of the full-length $\text{Ca}_v\beta_4$ subunit does not change significantly when Dp140 and α 1-syntrophin are overexpressed. In contrast, co-expression of the short variant $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ with Dp140/ α 1-syntrophin causes a substantial increase in channel activity. This finding supports the notion that the function of the Dp140/ α 1-syntrophin complex is to interact with the $\text{Ca}_v\beta_{4e}$ subunit to regulate the $\text{Ca}_v2.1$ channels in the plasma membrane.

In summary, our studies show, for the first time, experimental evidence for the formation of a specific molecular complex between Dp140/ α 1-syntrophin and the neuronal $\text{Ca}_v2.1$ channel. Furthermore, this interaction regulates the channels in the plasma membrane that would contribute to the correct release of neurotransmitters in the synapsis. On the other hand, our data also stress the importance of revealing the molecular interactions of dystrophin, the DGC, and the Ca_v channels in the nervous system to understand better how their dysregulation may contribute to deficiencies in neurological disorders found in various human disease including Duchenne muscular dystrophy.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00424-023-02803-1>.

Acknowledgments The authors are grateful to the support and assistance provided by the team of the Unit for Advanced Applications in Microscopy of the National Institute of Cancerology (INCan), and the Research Support Network of the National Autonomous University of Mexico (RAL, UNAM). This paper is part of the requirements for

obtaining a doctoral degree at the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM (MLL).

Authors' contributions MLL, AS, SLML, and ACL performed experiments and analyzed the data. RF and RGR conceived the project, secured the resources, supervised the work, and contributed to data analysis. RGR wrote the manuscript. All authors edited the manuscript.

Funding ACL was the recipient of a doctoral scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), Mexico. The Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN225623 partially supported this work (SLML).

Availability of data and materials All relevant data are within the manuscript and its supporting information files.

Declarations

Ethical approval This study was conducted in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Mexican Official Norm NOM-062-ZOO-1999. The protocol number 12-94-2014 was approved by the Research Ethics Committee of the “Dr. Manuel Gea Gonzalez” General Hospital (Ministry of Health).

Competing interests The authors declare that they do not have competing interests.

References

- Aikawa T, Watanabe T, Miyazaki T, Mikuni T, Wakamori M, Sakurai M, Aizawa H, Ishizu N, Watanabe M, Kano M, Mizusawa H, Watase K (2017) Alternative splicing in the C-terminal tail of Cav2.1 is essential for preventing a neurological disease in mice. *Hum Mol Genet* 26:3094–3104. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx193>
- Alam MS (2018) Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr Protoc Immunol* 123:e58. <https://doi.org/10.1002/cpim.58>
- Avila G, Sandoval A, Felix R (2004) Intramembrane charge movement associated with endogenous K⁺ channel activity in HEK-293 cells. *Cell Mol Neurobiol* 24:317–330. <https://doi.org/10.1023/b:cemn.0000022765.52109.26>
- Belle A, Tanay A, Bitincka L, Shamir R, O’Shea EK (2006) Quantification of protein half-lives in the budding yeast proteome. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:13004–13009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605420103>
- Bhat HF, Mir SS, Dar KB, Bhat ZF, Shah RA, Ganai NA (2018) ABC of multifaceted dystrophin glycoprotein complex (DGC). *J Cell Physiol* 233:5142–5159. <https://doi.org/10.1002/jcp.25982>
- Brockhaus J, Schreitmüller M, Repetto D, Klatt O, Reissner C, Elmslie K, Heine M, Missler M (2018) α -Neurexins together with α 2 δ -1 auxiliary subunits regulate Ca²⁺ influx through Ca_v2.1 Channels. *J Neurosci* 38:8277–8294. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0511-18.2018>
- Catterall WA (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003947. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003947>
- Cohn RD, Campbell KP (2000) Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 23:1456–1471. [https://doi.org/10.1002/1097-4598\(200010\)23:10%3c1456::aid-mus2%3e3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/1097-4598(200010)23:10%3c1456::aid-mus2%3e3.0.co;2-t)
- Constantin B (2014) Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochim Biophys Acta* 1838:635–642. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2013.08.023>
- Ermolyuk YS, Alder FG, Surges R, Pavlov IY, Timofeeva Y, Kullmann DM, Volynski KE (2013) Differential triggering of spontaneous glutamate release by P/Q-, N- and R-type Ca²⁺ channels. *Nat Neurosci* 16:1754–1763. <https://doi.org/10.1038/nn.3563>
- Ervasti JM, Campbell KP (1993) Dystrophin and the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol* 5:82–87. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(05\)80012-2](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(05)80012-2)
- Etemad S, Obermair GJ, Bindreither D, Benedetti A, Stanika R, Di Biase V, Burtscher V, Koschak A, Kofler R, Geley S, Wille A, Lusser A, Flockerzi V, Flucher BE (2014) Differential neuronal targeting of a new and two known calcium channel β 4 subunit splice variants correlates with their regulation of gene expression. *J Neurosci* 34:1446–1461. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3935-13.2014>
- Gandini MA, Felix R (2015) Molecular and functional interplay of voltage-gated Ca²⁺ channels with the cytoskeleton. *Curr Mol Pharmacol* 8:69–80. <https://doi.org/10.2174/1874467208666150507094252>
- Gandini MA, Sandoval A, Felix R (2014) Whole-cell patch-clamp recording of recombinant voltage-sensitive Ca²⁺ channels heterologously expressed in HEK-293 cells. *Cold Spring Harb Protoc* 2014:396–401. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot073213>
- Gavillet B, Rougier JS, Domenighetti AA, Behar R, Boixel C, Ruchat P, Lehr HA, Pedrazzini T, Abriel H (2006) Cardiac sodium channel Nav1.5 is regulated by a multiprotein complex composed of syntrophins and dystrophin. *Circ Res* 99:407–414. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000237466>
- Gumett CA, Felix R, Campbell KP (1997) Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca²⁺ channel α ₁ δ and α 1 subunits. *J Biol Chem* 272:18508–18512. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.29.18508>
- Hans M, Luvisetto S, Williams ME, Spagnolo M, Urrutia A, Tottene A, Brust PF, Johnson EC, Harpold MM, Stauderman KA, Pietrobon D (1999) Functional consequences of mutations in the human α 1A calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. *J Neurosci* 19:1610–1619. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-05-01610.1999>
- Hans M, Urrutia A, Deal C, Brust PF, Stauderman K, Ellis SB, Harpold MM, Johnson EC, Williams ME (1999) Structural elements in domain IV that influence biophysical and pharmacological properties of human α 1A-containing high-voltage-activated calcium channels. *Biophys J* 76:1384–1400. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(99\)77300-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(99)77300-5)
- Hashimoto Y, Kuniishi H, Sakai K, Fukushima Y, Du X, Yamashiro K, Hori K, Imamura M, Hoshino M, Yamada M, Araki T, Sakagami H, Takeda S, Itaka K, Ichinohe N, Muntioni F, Sekiguchi M, Aoki Y (2022) Brain Dp140 alters glutamatergic transmission and social behaviour in the mdx52 mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Prog Neurobiol* 216:102288. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2022.102288>
- Kang MG, Chen CC, Felix R, Letts VA, Frankel WN, Mori Y, Campbell KP (2001) Biochemical and biophysical evidence for γ 2 subunit association with neuronal voltage-activated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 276:32917–32924. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100787200>
- Kao SH, Wang WL, Chen CY, Chang YL, Wu YY, Wang YT, Wang SP, Nesvizhskii AI, Chen YJ, Hong TM, Yang PC (2015) Analysis of protein stability by the cycloheximide chase assay. *Bio Protoc* 5. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.1374>
- Kim HL, Kim H, Lee P, King RG, Chin H (1992) Rat brain expresses an alternatively spliced form of the

- dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel α_2 subunit. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3251–3255. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.8.3251>
23. Lee BJ, Yang CH, Lee SY, Lee SH, Kim Y, Ho WK (2022) Voltage-gated calcium channels contribute to spontaneous glutamate release directly via nanodomain coupling or indirectly via calmodulin. *Prog Neurobiol* 208:102182. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2021.102182>
 24. Leyva-Leyva M, Sandoval A, Felix R, González-Ramírez R (2018) Biochemical and functional interplay between ion channels and the components of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *J Membr Biol* 251:535–550. <https://doi.org/10.1007/s00232-018-0036-9>
 25. Matamoros M, Pérez-Hernández M, Guerrero-Serna G, Amorós I, Barana A, Núñez M, Ponce-Balbuena D, Sacristán S, Gómez R, Tamargo J, Caballero R, Jalife J, Delpón E (2016) Nav1.5 N-terminal domain binding to $\alpha 1$ -syntrophin increases membrane density of human Kir2.1, Kir2.2 and Nav1.5 channels. *Cardiovasc Res* 110:279–290. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw009>
 26. Müller CS, Haupt A, Bildl W, Schindler J, Knaus HG, Meissner M, Rammner B, Striessnig J, Flockerzi V, Fakler B, Schulte U (2010) Quantitative proteomics of the Cav2 channel nano-environments in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14950–14957. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005940107>
 27. Pietrobon D (2010) $Ca_v2.1$ channelopathies. *Pflügers Arch* 460:375–393. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0802-8>
 28. Quignard JF, Haricane MC, Ménard C, Lory P, Nargeot J, Capron L, Mornet D, Richard S (2001) Transient down-regulation of L-type Ca^{2+} channel and dystrophin expression after balloon injury in rat aortic cells. *Cardiovasc Res* 49:177–188. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(00\)00210-8](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(00)00210-8)
 29. Sadeghi A, Doyle AD, Johnson BD (2002) Regulation of the cardiac L-type Ca^{2+} channel by the actin-binding proteins α -actinin and dystrophin. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C1502–1511. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00435.2001>
 30. Sandoval A, Andrade A, Beedle AM, Campbell KP, Felix R (2007) Inhibition of recombinant N-type Ca_v channels by the $\gamma 2$ subunit involves unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent mechanisms. *J Neurosci* 27:3317–3327. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4566-06.2007>
 31. Sara Y, Virmani T, Deák F, Liu X, Kavalali ET (2005) An isolated pool of vesicles recycles at rest and drives spontaneous neurotransmission. *Neuron* 45:563–573. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.12.056>
 32. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
 33. Schlick B, Flucher BE, Obermair GJ (2010) Voltage-activated calcium channel expression profiles in mouse brain and cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167:786–798. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.037>
 34. Schultz J, Hoffmüller U, Krause G, Ashurst J, Macias MJ, Schmieder P, Schneider-Mergener J, Oschkinat H (1998) Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated sodium channels. *Nat Struct Biol* 5:19–24. <https://doi.org/10.1038/nsb0198-19>
 35. Sugita S, Saito F, Tang J, Satz J, Campbell K, Südhof TC (2001) A stoichiometric complex of neuexins and dystroglycan in brain. *J Cell Biol* 154:435–445. <https://doi.org/10.1083/jcb.200105003>
 36. Vandebrouck A, Sabourin J, Rivet J, Balghi H, Sebille S, Kitzis A, Raymond G, Cognard C, Bourmeyster N, Constantin B (2007) Regulation of capacitance calcium entries by $\alpha 1$ -syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of $\alpha 1$ -syntrophin. *FASEB J* 21:608–617. <https://doi.org/10.1096/fj.06-6683com>
 37. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC (2015) The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 67:821–870. <https://doi.org/10.1124/pr.114.009654>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.