



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**CONTRIBUCIÓN DE LAS GLICINAS DE LOS SEGMENTOS
TRANSMEMBRANALES IS6 Y IIS6 AL MECANISMO DE ACTIVACIÓN
DE LOS CANALES Cav3.1**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

GLORIA SARAHÍ ÁVILA LARA

TUTOR:

DR. JUAN CARLOS GÓMORA MARTÍNEZ

ASESOR INTERNO:

DRA. JUANA MONROY MORENO



MÉXICO, D.F.

ENERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

El presente proyecto de Tesis se llevó a cabo en el Departamento de Neuropatología del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Gómora Martínez.

La supervisión interna estuvo a cargo de Juana Monroy Moreno de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza (UMIEZ) en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Reconocimiento especial a los sinodales:

Dra. María Elena Ayala Escobar

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

Biól. Reynalda Roldán Pérez

Se reconoce también a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, de la UNAM por el servicio de secuenciación y síntesis de oligonucleótidos.

Durante el desarrollo del presente trabajo la tesista recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto 167790), del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA-UNAM, Proyecto IN208611), y de la Fundación Miguel Alemán A.C.

Agradecimientos

El presente trabajo de Tesis es el reflejo de un arduo esfuerzo y dedicación que sin el apoyo de ciertas personas no hubiera sido posible concluir; es por eso que he tomado este espacio para dedicarlo a todas aquellas personas que de alguna u otra forma me han brindado su apoyo para concluir esta etapa de mi vida.

Especial agradecimiento al Dr. Juan Carlos Gómora Martínez, quien es director de este proyecto, por brindarme su orientación y supervisión en este trabajo, así como también por brindarme los espacios necesarios para la realización del mismo.

A la Dra. Zazil Herrera Carrillo por su apoyo técnico en el laboratorio desde el inicio del proyecto y cuya contribución fue de gran importancia para la culminación del presente trabajo.

De igual forma un agradecimiento a la Dra. Juana Monroy Moreno, asesora interna de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por su apoyo y consejos académicos.

A mis compañeros de laboratorio quienes también me brindaron su apoyo y no dudaron en ofrecerme su ayuda; en especial a Rogelio Arteaga que también colaboró técnicamente para cumplir con los objetivos de este proyecto.

A mis padres y hermanas que siempre estuvieron ahí para brindarme su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos y por ayudarme a llegar hasta este punto y seguir adelante.

A Hector Zepeda López quien me apoyó en los momentos más críticos y no dudó en darme su mano para que yo pudiera salir adelante.

A mis amigos por ofrecerme consejos y ayuda psicológica cuando más lo necesitaba.

INDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	3
A. Excitabilidad celular y canales iónicos.....	3
B. Canales de calcio activados por voltaje	6
C. Clasificación de los canales Ca_v	7
D. Composición y propiedades moleculares de los canales Ca_v	9
E. Mecanismo básico del funcionamiento de los canales Ca_v	12
2. ANTECEDENTES	14
A. Propiedades estructurales de los canales de K^+ y Na^+	14
B. Estudios estructura-función acerca de la participación de las glicinas “bisagra” en canales bacterianos y de mamíferos.....	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS.....	24
A. Objetivo general.....	24
B. Objetivos particulares.....	24
6. MÉTODOS.....	25
A. Construcción de canales mutantes	25
B. Cultivo de células HEK-293.....	29
C. Transfección de células HEK-293 con los canales $Ca_v3.1$	29
D. Experimentos electrofisiológicos	30
D.1. Análisis de datos electrofisiológicos	33

7. RESULTADOS	35
A. Construcción de los canales mutantes de $Ca_{v3.1}$	35
A.1. Generación de fragmentos mutantes con oligonucleótidos degenerados.....	36
A.1.1. Construcción de canales mutantes del segmento IS6	36
A.1.2. Construcción de canales mutantes del segmento IIS6	37
A.1.3 Construcción de canales mutantes del segmento IIIS6.....	37
B. Estudio de las propiedades biofísicas de los canales $Ca_{v3.1}$ silvestre y mutantes.....	41
B.1. Evaluación de la relación corriente-voltaje	41
B.1.1 Densidad de corriente y curvas I-V normalizadas	43
B.2. Inactivación en el estado estacionario	47
B.3. Aspectos cinéticos de las corrientes generadas por los canales $Ca_{v3.1}$.....	49
B.3.1. Curso temporal de la activación e inactivación.....	49
B.3.2. Recuperación de la inactivación	53
B.4. Efectos de las mutaciones de los segmentos S6 en el cierre del canal $Ca_{v3.1}$.....	56
8. DISCUSIÓN	59
A. Las mutaciones en los segmentos IS6, IIS6 y IIIS6 disminuyen drásticamente la corriente generada por los canales $Ca_{v3.1}$.....	60
B. Efecto de las mutantes en la inactivación del canal.....	63
C. Efecto de las mutaciones de los segmentos IS6, IIS6 y IIIS6 en el cierre del canal $Ca_{v3.1}$.....	65
9. CONCLUSIONES	67
10. REFERENCIAS	68

RESUMEN

Los canales de calcio tipo T o Ca_v3 son proteínas de membrana que participan en procesos celulares como la excitabilidad celular, contracción muscular, secreción hormonal, fertilización y nocicepción. Estas proteínas son codificadas por un solo gen que se traduce en una subunidad α_1 con cuatro dominios (I-IV), cada uno con seis segmentos transmembranales (S1 a S6). Los segmentos S5 y S6 forman la pared interna del poro del canal que se le conoce como dominio del poro (DP), mientras que los segmentos S1 a S4 forman el sensor de voltaje o dominio del sensor de voltaje (DSV). Estudios realizados en el canal bacteriano de potasio Mthk han propuesto que la apertura y cierre del canal es mediada por residuos de glicina presentes en cada uno de los cuatro segmentos M2 que forman la pared del poro de este canal. Las propiedades únicas de la glicina de inducir torsiones en la estructura de α -hélice provocan que el segmento transmembranal sufra un cambio conformacional que permita el flujo de iones a través del poro del canal. Por esta función de servir como la bisagra de una puerta que permite la apertura y cierre de la misma, tales residuos reciben el nombre de glicinas “bisagra”. En los canales Ca_v3 dicho aminoácido se encuentra localizado en el segmento S6 y únicamente en los primeros dos dominios de la subunidad α_1 , es decir, en los segmentos IS6 y IIS6. En los dominios restantes (III y IV) la posición equivalente la ocupa una valina (IIIS6) y una glutamina (IVS6), respectivamente. El objetivo del presente estudio fue investigar la contribución de los residuos “bisagra” en el mecanismo de activación de los canales $\text{Ca}_v3.1$. Para ello se realizó un estudio de mutagénesis dirigida al sitio de los aminoácidos “bisagra” de los segmentos IS6, IIS6 y IIIS6. Los canales mutantes, así como el canal $\text{Ca}_v3.1$ silvestre, fueron expresados en células HEK-293 e investigados con la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (*patch clamp*). Los resultados obtenidos muestran que todas las mutaciones redujeron considerablemente la densidad de la corriente en comparación con el canal silvestre. El caso extremo fueron las mutantes de prolina que no fueron funcionales. La dependencia al voltaje de la activación del canal $\text{Ca}_v3.1$ no fue modificada por las mutaciones, excepto por la mutación de glicina por treonina del segmento IS6 (G382T), la cual desplazó tanto la activación como la inactivación en el estado estacionario del canal silvestre a voltajes más positivos. Las mutantes del segmento IIS6 promovieron que los canales $\text{Ca}_v3.1$ se inactiven a voltajes más negativos (~ -10 mV) que el canal silvestre. Todas

las mutaciones evaluadas aceleraron el curso temporal con el que se cierra el canal $Ca_v3.1$, sugiriendo que las glicinas del segmento IS6 y IIS6, así como la valina del IIIS6, forman parte de los elementos estructurales involucrados en el mecanismo de apertura y cierre del canal $Ca_v3.1$. No obstante, los resultados sugieren la posibilidad de que el mecanismo involucrado en el movimiento de la compuerta de activación de los canales $Ca_v3.1$ requiera de elementos estructurales adicionales a las glicinas “bisagra” descritas para otros canales activados por voltaje.

1. INTRODUCCIÓN

A. Excitabilidad celular y canales iónicos

La excitabilidad celular es la capacidad que tienen algunos tipos celulares para generar y propagar señales eléctricas que les permitan comunicarse con otras células contiguas o incluso con otras que se encuentran a considerables distancias (hasta 1 metro). Tal capacidad reside en la presencia de una serie de proteínas localizadas en la membrana plasmática, las cuales reciben el nombre de canales iónicos debido a que se encargan de transportar pasivamente iones inorgánicos (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , principalmente) hacia fuera o hacia adentro de la célula. Debido a que los iones transportados poseen una carga eléctrica, el flujo de estos a través de los canales genera corrientes iónicas entrantes o salientes. En consecuencia, los flujos iónicos modifican en turno el potencial de membrana (V_m) de la célula, mantenido a su vez por la diferencia de cargas negativas entre el exterior y el interior de la célula, y generando así señales eléctricas (potenciales de acción) que sirve como un lenguaje para comunicarse con otras células (Nicholls *et al.*, 1992). Además de su papel en la generación de señales eléctricas, los canales iónicos participan en muchas otras funciones celulares como la liberación de neurotransmisores y hormonas, contracción muscular, regulación génica, proliferación, migración e invasividad (Hille, 2001; Prevarskaya *et al.*, 2010). En años recientes se han descubierto varias enfermedades asociadas a mutaciones en los genes que codifican para algunos canales iónicos, por lo que tales patologías reciben el nombre de canalopatías (Wilde, 2008). Los canales iónicos son activados por una amplia variedad de estímulos y su clasificación se basa en tal característica. La Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica (IUPHAR, por sus siglas en inglés; <http://www.guidetopharmacology.org/>) ha propuesto una clasificación de canales iónicos en dos grandes grupos, los activados por voltaje que incluyen la mayoría de los canales Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y algunos de Cl^- , pero también en este grupo ubica a los canales que son relativamente insensibles al voltaje y que son activados por segundos mensajeros y otros mediadores intracelulares y extracelulares (aquí se incluyen algunos canales de K^+ y de Cl^- , los canales TRP, los CNG y HCN). El otro grupo está conformado por los canales activados por ligando e incluyen los receptores a glutamato, acetilcolina, GABA, serotonina, y los P2X (Figura 1).

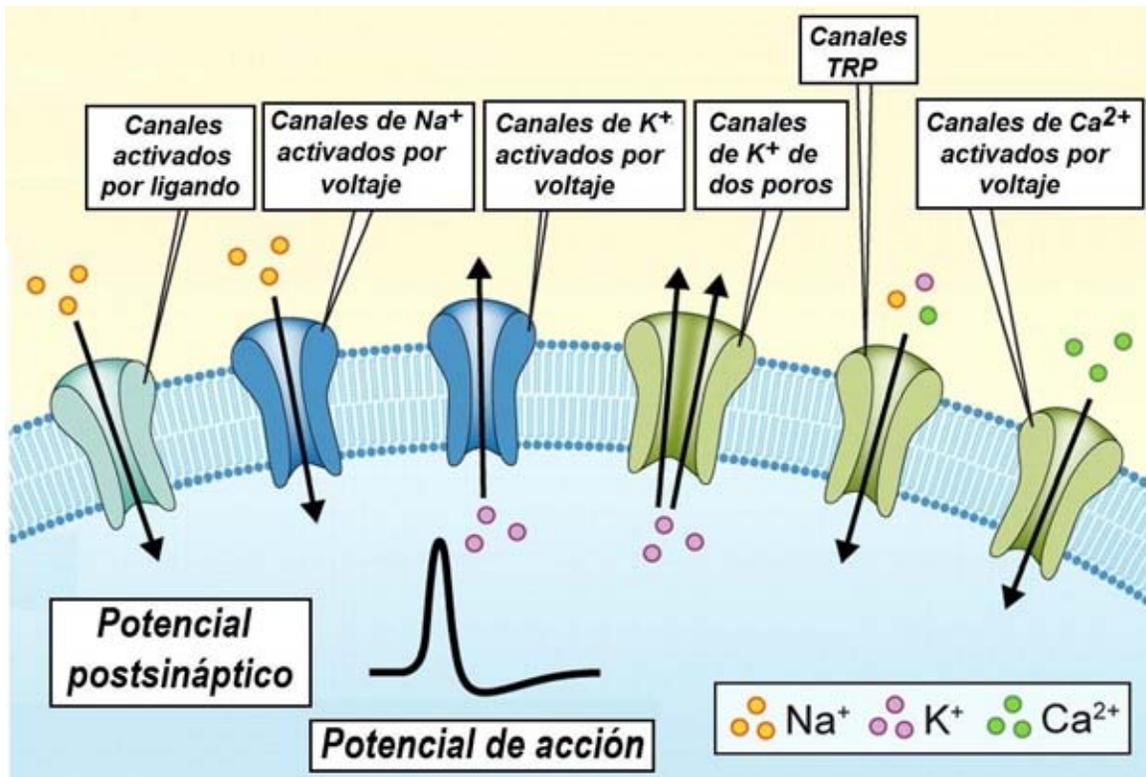


Figura 1. Canales iónicos y excitabilidad celular. Clases de canales iónicos involucrados en la traducción, generación y propagación de las señales eléctricas en las células excitables. La unión de un neurotransmisor (acetilcolina o glutamato, por ejemplo) activa a los canales activados por ligando generando corrientes iónicas que despolarizan el V_m de la célula postsináptica (neurona, célula muscular o célula secretora, por ejemplo). El cambio en el voltaje provocado por el potencial postsináptico puede activar entonces canales de Na⁺ de Ca²⁺ y de K⁺ activados por voltaje, los cuales generan y propagan el potencial de acción a la siguiente célula. Otros canales como los TRP y los de K⁺ de dos poros contribuyen en el establecimiento y modulación de la excitabilidad membranaral (Modificada de Lumpkin *et al.*, 2010).

Estructuralmente los canales iónicos presentan un arreglo tridimensional que promueve la formación de un poro por donde fluyen los iones; la estructura proteica y el diámetro del poro determina la selectividad a un ión y por lo tanto se le considera el filtro de selectividad del canal (Doyle *et al.*, 1998). El arreglo estructural que presenta un canal iónico es variable por ejemplo, los canales de K⁺ y los canales activados por temperatura (TRP) son tetrámeros, mientras que los canales activados por ligandos como el receptor de acetilcolina, glicina y otros neurotransmisores son pentámeros; por otro lado los canales iónicos de uniones comunicantes (*gap junctions*) poseen estructura de hexámeros. En el caso de los canales de Na⁺ y Ca²⁺ el arreglo que presentan es como un tetrámero sin llegar a ser un verdadero tetrámero, ya que la proteína completa es codificada por un solo gen (Hille, 2001).

El campo de estudio de los canales iónicos se originó a partir de 1952 con los trabajos realizados por Alan Lloyd Hodgkin y Andrew Huxley en el axón gigante de calamar. Mediante el empleo de una técnica electrofisiológica que ellos desarrollaron y llamaron “fijación de voltaje”, realizaron un análisis sistemático y riguroso de las corrientes que fluyen a través de la membrana del axón gigante de calamar. Sus resultados les permitió proponer un modelo que explica la generación y propagación de señales eléctricas (potenciales de acción) a través de la membrana plasmática del axón; dicha propuesta consiste en que los potenciales de acción del axón gigante de calamar se originan por dos corriente iónicas: la entrada de iones Na^+ que produce la despolarización de la membrana, y la salida de iones K^+ que repolariza la membrana de la célula. Adicionalmente, expusieron que las corrientes de Na^+ y K^+ se generaban en sitios particulares de la membrana a los cuales llamaron “parches activos”. (Hodgkin *et al.*, 1952; Hodgkin & Huxley, 1952a; Hodgkin & Huxley, 1952b; Hodgkin & Huxley, 1952c). Actualmente se sabe que estos parches activos se caracterizan por una alta densidad de canales de Na^+ y de K^+ activados por voltaje. No obstante, Hodgkin y Huxley nunca emplearon la palabra “canal” en esta serie de trabajos, sin embargo éstos representan las bases de la excitabilidad celular y los sustratos moleculares responsables de la misma: los canales iónicos. Tales reportes les valió el Premio Nobel de fisiología-medicina en el año de 1963.

A partir de entonces, el conocimiento acerca de los canales iónicos a nivel molecular se ha incrementado considerablemente. En la década de los 80s, se conoció la naturaleza proteica de los canales iónicos, a partir de estudios con el receptor de acetilcolina (Raftery *et al.*, 1980; Noda *et al.*, 1982), y después con los canales de sodio (Noda *et al.*, 1984) y calcio (Tanabe *et al.*, 1987). Un avance trascendental en materia de canales iónicos se presentó en 1976, cuando Erwin y Neher Sakmann desarrollaron la técnica de fijación de voltaje llamada *patch clamp*, que consiste en la formación de sellos de alta resistencia entre la membrana de una célula y la punta de un microelectrodo de vidrio de tal suerte que se obtiene un pequeño “parche” de membrana aislado eléctricamente. El voltaje a través de este parche se mantiene constante con la ayuda de un amplificador de retroalimentación y de esta manera pudieron medir las corrientes que fluían a través de los canales presentes en el parche de membrana (Neher &

Sakmann, 1976). De igual forma estos investigadores ganaron el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1991.

En 1998 se logró otro avance medular en el estudio de los canales iónicos que también le valió el premio Nobel a su autor. El grupo de Roderick MacKinnon logró cristalizar por primera vez un canal iónico y estudiarlo con difracción de rayos X obteniendo imágenes con una resolución de 3.2 Å (Doyle *et al.*, 1998). En los últimos 15 años se han cristalizado varios canales iónicos lo que ha mejorado el conocimiento acerca de ellos y también ha confirmado gran parte de la información que se obtuvo durante casi 50 años mediante el empleo de técnicas electrofisiológicas, bioquímicas, y de biología molecular, entre otras. No obstante, la mayoría de los canales hasta ahora cristalizados son en su mayoría de células procariontes; y los de células eucariotas han sido de canales de potasio, por lo que a la fecha no se tiene la información respectiva de canales de calcio o de sodio activados por voltaje en células eucariotas. En consecuencia, el funcionamiento molecular de un canal de calcio activado por voltaje no ha sido suficientemente estudiado, en particular los elementos estructurales involucrados en el mecanismo de apertura y cierre de los mismos. Por lo tanto, este proyecto de tesis se enfocó en obtener información que permita entender mejor el mecanismo por el cual los canales de calcio se abren y cierran en respuesta a su estímulo fisiológico que es el voltaje, y en particular nos enfocamos en estudiar la relación entre la estructura y la función de los canales de calcio tipo T, una subfamilia de los canales de calcio (véase más adelante). A continuación, se revisarán algunos aspectos del estado del arte en que se encuentran los canales de calcio activados por voltaje.

B. Canales de calcio activados por voltaje

Los canales de calcio activados por voltaje (Ca_v) forman parte de la superfamilia de canales iónicos activados por voltaje, de la cual forman parte también los canales de sodio (Na_v), los de potasio (K_v) y algunos de cloruro (Hille, 2001). Los canales Ca_v son una de las principales vías responsables de la entrada pasiva de calcio a las células, es decir, el influjo de calcio a través de los canales Ca_v utiliza únicamente la fuerza impulsora generada por el gradiente del

ion Ca^{2+} entre el citoplasma y el medio extracelular. Transportando iones de Ca^{2+} a una velocidad de hasta 10^6 iones s^{-1} (Sather & McCleskey, 2003), los canales Ca_v pueden incrementar la concentración intracelular de Ca^{2+} a valores cercanos a 1 o 2 μM en microdominios cercanos a la membrana celular e inducir exocitosis (Thomas *et al.*, 1990). Además, el ión Ca^{2+} es un mensajero intracelular crucial en la modulación de una amplia gama de funciones celulares como la exocitosis de hormonas y neurotransmisores, la contracción muscular, el metabolismo, la expresión de genes, la diferenciación y proliferación celular, la fertilización, etc. (Berridge, 2012). El primer indicio de la existencia de los canales de calcio se obtuvo indirectamente estudiando fibras musculares de crustáceos a mediados del siglo pasado por Fatt y Katz (Fatt & KATZ, 1953), quienes observaron potenciales de acción (en ausencia de iones sodio) débiles pero capaces de propagarse a lo largo de la fibra muscular. Hoy se sabe que los responsables de generar dichos potenciales de acción en prácticamente todas las fibras musculares de invertebrados son los canales Ca_v .

C. Clasificación de los canales Ca_v

La primera clasificación de los canales Ca_v consideró el intervalo de voltaje necesario para su activación; así se dividieron en dos grandes clases, los canales de calcio de alto umbral de activación (HVA, por sus siglas en inglés) y los de bajo umbral de activación (LVA). Posteriormente, con base en propiedades biofísicas y farmacológicas de las diferentes corrientes estudiadas se subdividieron en cinco tipos diferentes de canales HVA denominados L, N, P, Q y R; mientras que los LVA solo incluían un tipo de canal los tipo T (Nilius *et al.*, 1985; Armstrong & Matteson, 1985; Nowycky *et al.*, 1985; Bean, 1989; Ahljianian *et al.*, 1991; Catterall, 2000).

Los canales HVA se activan a potenciales entre -30 y -20 mV; generan corrientes de larga duración, exhiben conductancias grandes de unos 24 pS, y se cierran rápidamente al repolarizar la membrana. Los canales HVA tipo L son quizás los canales Ca_v más estudiados, representan la principal vía de entrada de iones Ca^{2+} en las células de los músculos cardíaco, esquelético y liso; además, contribuyen al control la secreción de neurotransmisores y al

mecanismo de acoplamiento excitación-contracción. Estos canales son bloqueados selectivamente por las dihidropiridinas, fármacos utilizados en la clínica para tratar problemas de hipertensión (Catterall, 2011). Los canales tipo N deben su nombre a que al momento de describirse por primera vez presentaban características que los hacía distintos a los L y los T, es decir, no eran ni T ni L, por lo que recibieron el nombre de tipo N. Esta corriente es selectivamente bloqueada y de manera irreversible por la ω -conotoxina GVIA (Nowycky *et al.*, 1985; McCleskey *et al.*, 1987). Los canales de tipo P se describieron por primera vez en las células de Purkinje del cerebelo, aunque posteriormente se ha descrito su existencia en varios tipos de neuronas, así como en la retina, hipófisis, células cromafines, etc. Son bloqueados selectivamente por la toxina de araña ω -agatoxina IVA (Llinas *et al.*, 1992). Los canales tipo Q se encuentran abundantemente expresados en las neuronas granulosas del cerebelo y otras preparaciones donde también se expresan los canales tipo P, pero son bloqueados específicamente por toxinas como la ω -conotoxina MVIIC (Randall & Tsien, 1995). Por su parte los canales tipo R se encuentran en muchos tipos neuronales en diferentes proporciones y son bloqueados por la toxina SNX-482 (Newcomb *et al.*, 1998).

Por su parte, los canales de calcio LVA o tipo T, se activan a potenciales más negativos (alrededor del V_m de muchas células, entre -60 y -50 mV), presentan conductancias pequeñas (de unos 8 pS), se cierran lentamente con la repolarización de la membrana, y generan corrientes con un curso temporal transitorio (de ahí su nombre tipo T) (Carbone & Lux, 1984; Matteson & Armstrong, 1986). El descubrimiento de los canales tipo T se remonta a principios de la década de los 80's del siglo pasado en la entonces Unión Soviética, donde investigadores del grupo del Dr. Platon Kostyuk en el Instituto Bogomoletz en Kiev, describieron por primera vez la existencia de dos tipos de canales de calcio activados por voltaje en neuronas del ganglio dorsal de la rata (Veselovskii & Fedulova, 1983). Un año más tarde, se publicó un trabajo en la revista *Nature* cuyos autores el Dr. Carbone y el Dr. Lux del Instituto Max Planck en Alemania reportaron también la existencia de dos canales Cav en el ganglio dorsal de pollo y rata (Carbone & Lux, 1984). En la actualidad es bien sabido que los canales de calcio tipo T se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y periférico, en células endócrinas y musculares, e incluso en células no excitables como los espermatozoides donde

regulan varios procesos como la movilidad, la capacitación de los espermatozoides y la reacción acrosomal, principalmente (Talley *et al.*, 1999; Darszon *et al.*, 2011; Darszon & Hernandez-Cruz, 2014). Una diferencia sustancial con los canales HVA es que los canales tipo T no requieren de subunidades accesorias para generar corrientes tal y como se observan en las neuronas y otros tipos celulares donde se han registrado las corrientes tipo T (Perez-Reyes, 2003). No obstante, la posibilidad de que las corrientes tipo T sean reguladas por las subunidades accesorias de los canales HVA no se puede descartar y, de hecho, existen evidencias de nuestro grupo de investigación y de otros más que tal interacción se presenta en ciertas condiciones experimentales (Arteaga, 2007; Bae *et al.*, 2010).

La clasificación más actual de los canales Cav toma en cuenta la identidad molecular de los genes que codifican para cada una de las subunidades α_1 que generan corrientes de calcio activadas por voltaje. De esta manera existen 10 tipos diferentes de canales Cav agrupados en tres subfamilias: Cav1, Cav2 y Cav3 (Figura 2). La nomenclatura de los canales se designó para seguir los mismos criterios de los canales Nav y Kv, primeramente el nombre se debe al ión que transportan (en este caso calcio, Ca^{2+}), seguido de la inicial del estímulo que los activa (V de voltaje) indicado como subíndice; después el nombre de la familia al que pertenecen (1, 2 y 3), y finalmente separado por un punto el numero de miembro de la subfamilia. Con base en la similitud de las secuencias de la subunidad α_1 se tiene que la subfamilia Cav1 está formada por los canales tipo L (Cav1.1 a Cav1.4), la subfamilia Cav2 comprende los canales tipo P/Q (Cav2.1), N (Cav2.2) y R (Cav2.3); la Cav3 incluye únicamente a los canales tipo T con tres diferentes subunidades α_1 : G (Cav3.1), H (Cav3.2) e I (Cav3.3) (Ertel *et al.*, 2000).

D. Composición y propiedades moleculares de los canales Cav

La composición molecular de los canales Cav es diferente entre los canales HVA y los LVA. Por un lado, los primeros son complejos de proteínas transmembranales que consisten de una subunidad principal α_1 , y tres subunidades accesorias que reciben el nombre de β , $\alpha_2\delta$ y γ (Figura 3) (Arikkath & Campbell, 2003). Sin embargo, los canales LVA consisten únicamente de la subunidad principal α_1 , ya que al momento no se han clonado subunidades accesorias

propias de estos canales. La subunidad principal α_1 de ambos canales contiene el poro de conducción iónica y el sensor de voltaje, es decir, por sí sola puede generar corrientes iónicas.

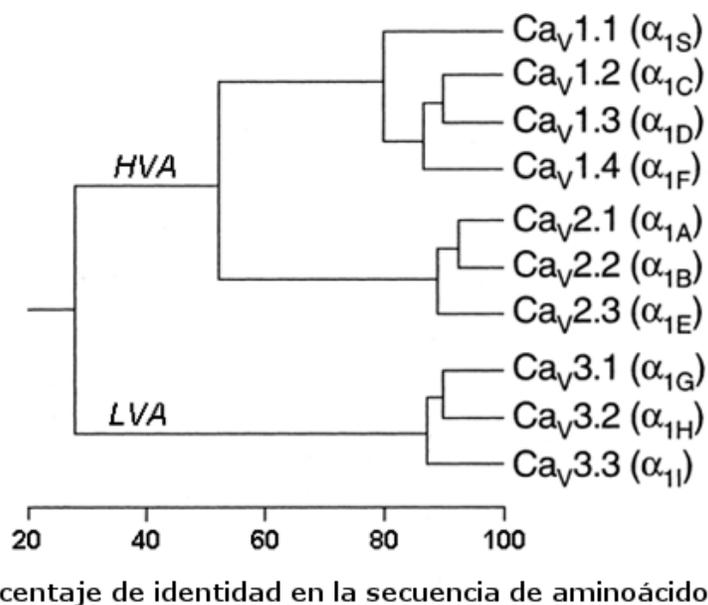


Figura 2. Árbol filogenético de los canales Cav. Se muestra el porcentaje de identidad en las secuencias de aminoácidos de la subunidad α_1 de los canales Cav. La secuencia completa de cada subunidad α_1 fue reducida exclusivamente a las regiones que atraviesan la membrana y las asas del poro, lo cual generó un archivo de ~350 aminoácidos. Posteriormente, dichos archivos fueron alineados utilizando el programa DNAsis tomando como base el algoritmo de CLUSTAL. El alineamiento múltiple de secuencias define tres subfamilias: Cav1, Cav2 y Cav3, con alrededor de 80% de identidad entre ellas (Modificada de Perez-Reyes, 1999).

La subunidad α_1 es una proteína de aproximadamente 200 kDa y está constituida por cuatro dominios homólogos (I a IV), los que a su vez están formados por seis segmentos transmembranales (S1 a S6) con estructura de α -hélice y unidos entre sí por asas intra y extracelulares. Los segmentos S1-S4 forman el dominio sensor del voltaje de la subunidad α_1 . El segmento S4 se caracteriza por presentar varios aminoácidos con carga neta positiva como arginina y lisina, que se repiten cada tres residuos, y que tienen la función de actuar como sensor de voltaje. Cuando ocurre un cambio en el V_m el segmento S4 se mueve en la bicapa lipídica, promoviendo así los cambios conformacionales que la proteína adopta durante la activación del canal (Sands *et al.*, 2005; Tombola *et al.*, 2006). Con base en estudios de cristalografía de rayos X de canales de K_v y Na_v cuyas subunidad α comparten varias similitudes con los canales Cav, se ha propuesto que los segmentos S5 y S6 forman la pared

interna del poro de conducción y están unidos por un asa que se invagina en la membrana, y que es conocida como el asa del poro muy cercana el extremo extracelular (Jiang *et al.*, 2003a; Jiang *et al.*, 2003b; Payandeh *et al.*, 2011; Payandeh *et al.*, 2012). Las cuatro asas del poro, forman el vestíbulo externo del canal y el filtro de selectividad, por lo que la secuencia de aminoácidos en estas estructuras determinan la selectividad, conductancia y afinidad del canal (Catterall, 2011).

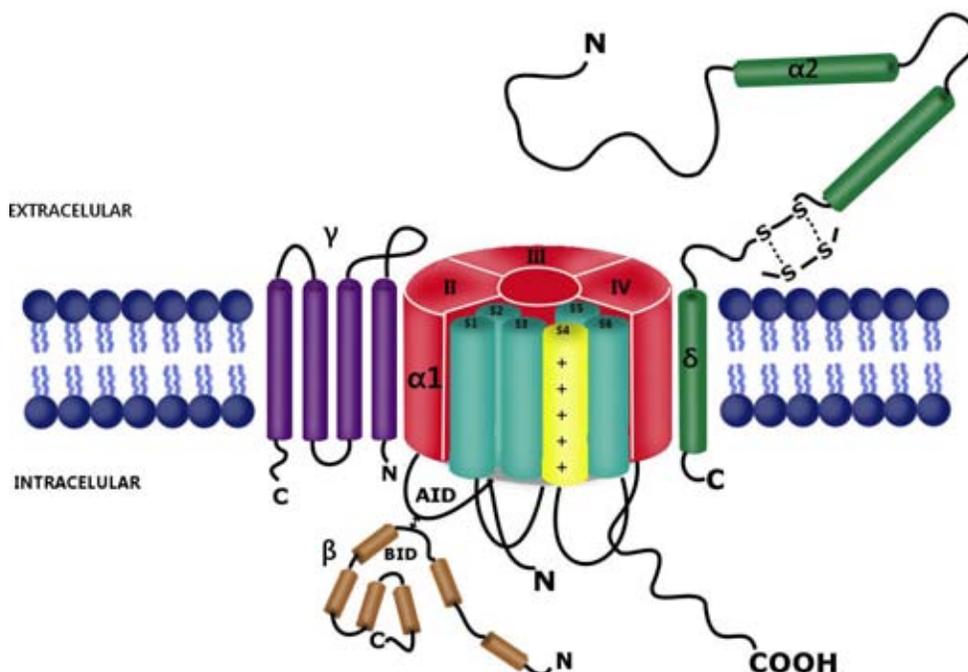


Figura 3. Estructura topológica de los canales Cav. Los canales de calcio activados por voltaje son complejos multiproteicos formados por la subunidad principal α_1 , con 4 dominios homólogos (I, II, III, IV), cada uno con seis segmentos transmembranales (S1-S6); la subunidad β es completamente intracelular e interactúa en su sitio BID (Beta Interaction Domain) con el sitio AID (Alpha Interaction Domain) de la subunidad α_1 ; la subunidad $\alpha_2\delta$ consiste de una región transmembranal y otra extracelular, mientras que la subunidad γ es una proteína transmembranal (Modificada de Randall & Benham, 1999).

Por su parte, la subunidad β es completamente intracelular y se asocia a la subunidad α de manera no covalente a través de la interacción de su región BID (Beta Interaction Domain) y la región AID (Alpha Interaction Domain) de la subunidad α_1 . En cambio, la subunidad γ es completamente transmembranal, mientras que la $\alpha_2\delta$ presenta una región transmembranal y otra extracelular. Estas subunidades auxiliares regulan la actividad y el número de las

subunidades α_1 en la membrana (Arikkath, *et al.*, 2003). Sin embargo, no todos los canales de calcio poseen todas las estructuras mencionadas, ya que los canales de calcio que se activan a umbrales más negativos (LVA o Ca_v3), solo poseen la subunidad α_1 y carecen de subunidades accesorias.

E. Mecanismo básico del funcionamiento de los canales Ca_v

Como ya se ha mencionado, los canales activados por voltaje responden a variaciones en el V_m , lo cual se manifiesta con cambios en la conformación de la proteína del canal. Los canales Ca_v se encuentran en la conformación cerrada o en reposo a valores de voltaje cercanos al potencial de reposo de la mayoría de las células excitables (es decir, alrededor de -80, -70 mV), en respuesta a una despolarización del V_m la mayoría de los canales transitan al estado abierto o activado (proceso llamado *gating*) lo que permite el flujo de los iones Ca^{2+} (siempre a favor del gradiente electroquímico) (Figura 4). El flujo de iones estará en función del número de canales abiertos, así como de la fuerza impulsora la cual resulta de la diferencia entre el potencial de membrana y el potencial de equilibrio del ion. Sin embargo, el flujo de iones no es permanente y decrece en función del tiempo (corriente transitoria), lo cual es debido a que el canal abierto transita a otro estado conocido como estado inactivado. La inactivación es otro estado en donde el canal sigue abierto, pero debido a un cambio conformacional de la proteína se interrumpe el flujo de iones. Este fenómeno, conocido como inactivación del canal, regula el flujo excesivo de calcio a las células y es ocasionado por estructuras ajenas a la compuerta de activación; de hecho el elemento estructural responsable de la inactivación sigue siendo aún motivo de estudio y debate en los canales Ca_v3 (Marksteiner *et al.*, 2001; Staes *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2004). Es importante mencionar que los canales Ca_v3 , presentan una marcada tendencia a transitar al estado inactivado directamente del estado cerrado, es decir, una fracción de canales se inactiva sin que previamente sean abiertos (Serrano *et al.*, 1999).

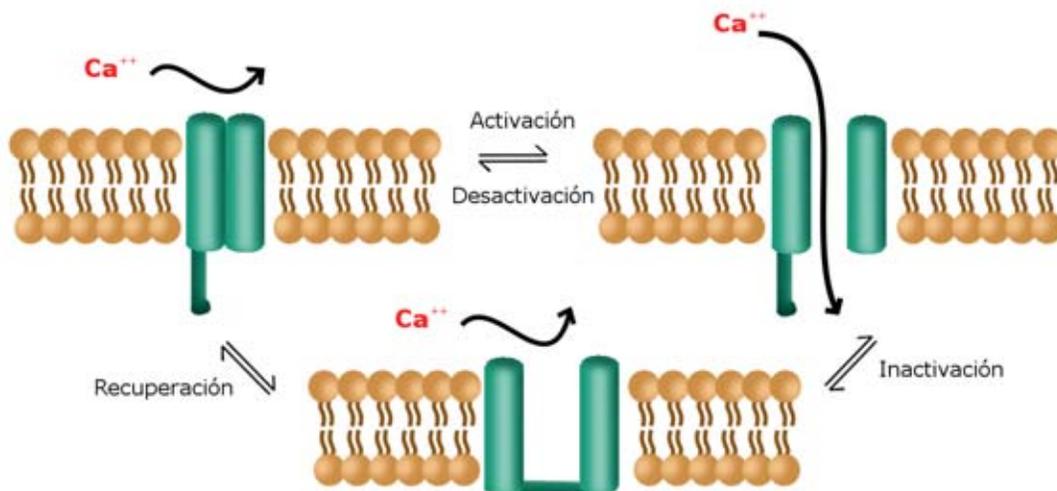


Figura 4. Esquematación de los cambios conformacionales asociados al funcionamiento de los canales Cav3. La transición del estado cerrado o en reposo al estado abierto conductor de iones se denomina Activación. La transición del estado abierto a uno no conductor de iones, aún cuando la compuerta está abierta, se denomina Inactivación. Finalmente, la transición del estado abierto al cerrado es conocida como Desactivación (George, 2005)

Para que el canal regrese al estado cerrado a partir del inactivado, la membrana debe ser repolarizada (es decir, que regrese al valor de V_m en reposo) y después de transcurrido cierto tiempo (el cual se le denomina recuperación de la inactivación), el canal puede volver a ser activado. Durante la repolarización de la membrana al valor de V_m inicial, los canales que no se inactivaron durante el pulso, se desactivan, esto es, transitan directamente del estado abierto al cerrado sin pasar por el inactivado (Figura 4). Cabe mencionar que en realidad el canal transita por más estados de los descritos aquí (Serrano *et al.*, 1999), pero para los fines de la presente disertación, estos son suficientes para entender el mecanismo básico de los canales Cav3.

2. ANTECEDENTES

No obstante que el avance en el conocimiento de los canales iónicos ha sido muy significativo en los 60 años posteriores a los trabajos de Hodgkin y Huxley de 1952, el aspecto de la relación entre la estructura y la función ha sido menos fructífero. Aspectos básicos del funcionamiento de los canales Cav y en particular de los Cav3 no han sido aclarados suficientemente. Sin embargo, en los últimos 15 años se han logrado avances cruciales en cuanto a la estructura tridimensional de las proteínas de algunos canales iónicos, principalmente utilizando cristalografía de rayos X; lo cual ha proporcionado información con la que se han podido plantear ciertas hipótesis sobre los mecanismos y elementos estructurales que podrían estar involucrados en los procesos de activación, inactivación y desactivación, entre otros aspectos biofísicos básicos de estas fascinantes proteínas.

A. Propiedades estructurales de los canales de K⁺ y Na⁺

El primer avance fundamental en este tópico, fue el realizado en 1998 por el grupo de Roderick MacKinnon, quienes publicaron por primera vez una fotografía del arreglo molecular de la proteína de un canal. En este caso fue el canal de potasio KcsA obtenido de una bacteria (*Streptomyces lividans*). El canal KcsA es un homotetrámero y no obstante que es menos complejo que un canal de mamífero, aportó una gran cantidad de información sobre la estructura molecular tridimensional de estos canales. La estructura cristalográfica fue obtenida en la conformación cerrada del canal (Figura 5A), la cual muestra que las α -hélices del segmento transmembranal M2 (análogo a los segmentos S6 en los canales Nav y Cav de mamíferos) delinean una porción intracelular del poro, obstruyendo el poro y por consiguiente impidiendo el flujo de iones; además indican que la región extracelular es la encargada de la selectividad del ión (Doyle *et al.*, 1998). Años más tarde, el mismo grupo de investigación reportó la estructura atómica del canal de potasio Mthk obtenido de otra bacteria (*Methanobacterium thermoautotrophicum*), a diferencia del anterior esta estructura fue cristalizada en la conformación abierta o activada (Figura 5B). En este caso se observa que los segmentos M2 están rotados 30° a partir de una glicina localizada por debajo del filtro de selectividad, dicha torsión de las α -hélices de los cuatro segmentos M2 generan la

configuración abierta del canal (Jiang *et al.*, 2002a; Jiang *et al.*, 2002b). A partir de estas estructuras cristalográficas se propuso un mecanismo de activación para los canales de potasio donde los residuos de glicina del segmento M2 cumplen la función de una bisagra que permite la apertura y cierre del poro del canal de potasio, de ahí que dichos residuos reciban el nombre de glicinas “bisagra” (Figura 5B).

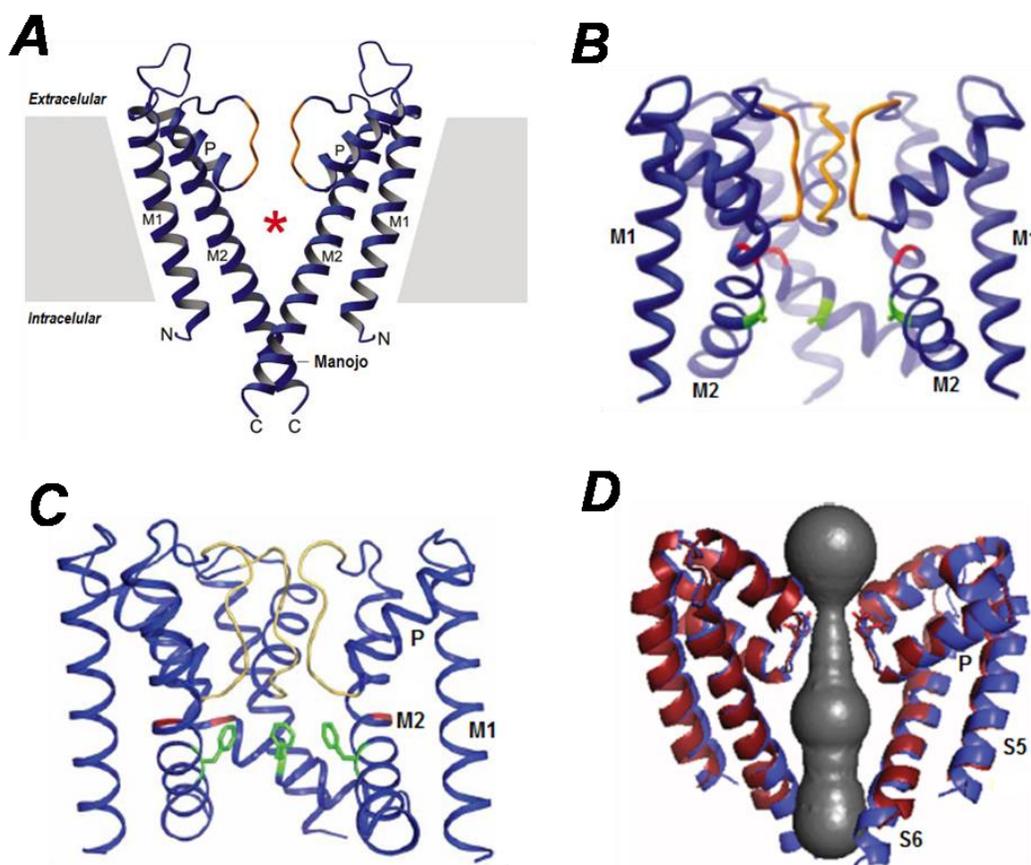


Figura 5. Estructura tridimensional de los canales de potasio en los estados cerrado y abierto. A) Elementos estructurales del poro del canal de K^+ KcsA en su conformación cerrada. Para mayor claridad se muestran solo dos de las cuatro subunidades α que forman el tetrámero. El filtro de selectividad se colorea en amarillo, el segmento exterior (M1) y el segmento interior (M2, que forman la pared del poro) y el poro (P) del canal (Adaptada de Doyle *et al.*, 1998). **B)** Tres subunidades α del canal MthK en su conformación abierta. Se ilustra el filtro de selectividad del canal en amarillo, las glicinas “bisagra” en rojo, y una alanina altamente conservada en los canales K^+ (verde). Esta última denota la importancia de un aminoácido con una cadena lateral corta ya que no obstruye el poro y no interfiere con la conductancia iónica (Modificada de Jiang *et al.*, 2002b). **C)** Estructura cristalográfica del canal de potasio NaK en el estado abierto. Nuevamente el filtro de selectividad en amarillo, glicina bisagra en rojo y un aminoácido con cadena lateral larga (fenilalanina) que constituye la compuerta de activación en verde (Editada de Alam & Jiang, 2009a). **D)** Empalme de las estructuras de los canales NavMs (rojo) y NavAb (azul). Este último denota la configuración cerrada, mientras que el primero el estado abierto del canal. La superficie interna accesible del modelo del poro del canal NavM se muestra en gris, la cual es una vía continua desde el extremo extracelular a la superficie interna de la membrana. Note que la diferencia entre la conformación cerrada y abierta del canal radica en el extremo intracelular de las α -hélices del segmento S6 (equivalente al M2 de los canales de bacterias) (Modificada de McCusker *et al.*, 2012).

La glicina es única en su capacidad de adoptar un amplio rango de ángulos diedros con respecto a la cadena polipeptídica principal debido en gran medida a la falta de una cadena lateral característica de todos los demás aminoácidos (Petsko & Ringe, 2004). Posteriormente, se obtuvo la estructura cristalográfica de un canal catiónico no selectivo (conduce sodio y potasio) llamado NaK en el estado abierto (Alam & Jiang, 2009a). En esta estructura se encontraron nuevamente los residuos de glicina bisagra (Figura 5C), por lo que se sugiere que este canal puede tener un mecanismo de apertura muy similar al del canal MthK. La aportación adicional de este último trabajo fue la identificación de la compuerta de activación que permite el flujo de iones a través del poro del canal, cuyo sustrato molecular lo constituye un anillo de cuatro fenilalaninas (Phe) que se ubican cinco posiciones distantes de la glicina bisagra hacia el extremo intracelular de la α -hélice. En la mayoría de los canales de potasio esa posición es ocupada por una alanina y en pocos casos por una glicina (Alam & Jiang, 2009b).

En lo que respecta a los canales de sodio, en el 2011 se logró obtener la primera estructura cristalográfica de este clase de canales iónicos y nuevamente se obtuvo de una célula procariota, la arqueobacteria *Arcobacter butzleri* (NavAb), cuya estructura coincide con la conformación cerrada de los canales de potasio previamente descritos (Payandeh *et al.*, 2011). Un año después se reportó la estructura de un canal Nav de otra bacteria (*Magnetococcus* sp.) en la conformación abierta (McCusker *et al.*, 2012). A diferencia de los canales de potasio el mecanismo propuesto para la activación del canal no implica la participación de residuos de glicinas bisagra; los autores sugieren por el contrario una rotación del ángulo de la cadena principal de un residuo de treonina (Thr) en el medio de α -hélice del segmento S6, lo cual orienta ésta hélice hacia fuera del poro central del canal, abriendo la mitad inferior (intracelular) de la estructura, originando así una vía transmembranal sin restricciones para el flujo de iones (Figura 5D).

No obstante que las estructuras cristalográficas de los canales de sodio hasta ahora reportados, no implican la participación de glicinas bisagra en el mecanismo de activación de los mismos, sí existen evidencias de estudios estructura-función que sugieren la contribución

de glicinas “bisagra” en canales Nav de bacterias y de mamíferos, así como en canales Cav de mamíferos. A continuación se describen brevemente tales hallazgos.

B. Estudios estructura-función acerca de la participación de las glicinas “bisagra” en canales bacterianos y de mamíferos.

Estos trabajos han sido realizados, entre otros, por el grupo de William Catterall utilizando estrategias de mutagénesis dirigida teniendo como blanco molecular los residuos de glicina en los segmentos S6 del canal Nav bacteriano llamado NaChBac, y, de manera menos sistemática, el canal Nav1.2 de rata (Yarov-Yarovoy *et al.*, 2001; Yarov-Yarovoy *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2004). La mutación de la glicina de la posición 219 del canal NaChBac que corresponde a las glicinas del canal MthK, por una prolina introdujo cambios drásticos en el funcionamiento del canal (Figura 6). La activación dependiente de voltaje se recorrió 50 mV hacía voltajes más negativos (hiperpolarizados; Figura 6A), la corriente se inactivó con una cinética 1200 veces más lenta que el canal silvestre y la dependencia al voltaje de la inactivación (inactivación en el estado estacionario) prácticamente desapareció en el canal mutante (Figura 6B). De manera sobresaliente, la mutación por prolina se reflejó en un enlentecimiento del cierre del canal en más de 2000 veces con respecto al canal silvestre (Figura 6C). Los efectos fueron estrictamente debidos a la presencia de la prolina en lugar de la glicina “bisagra”, ya que sustituciones por prolina en las posiciones vecinas, así como sustituciones de otros aminoácidos por la glicina “bisagra” tuvieron efectos mucho más discretos (Zhao *et al.*, 2004). La prolina también tiene la capacidad de inducir una torsión de la α -hélice, pero contrario a la glicina, mantiene fijos dichos ángulos a valores cercanos a una conformación extendida del polipéptido, como la de una β -plegada, es decir la prolina funciona como un desestabilizador de α -hélices (Petsko & Ringe, 2004). Con base en esta información, los resultados de Zhao y colaboradores sugieren que la participación de la glicina bisagra del canal NaChBac es crucial para la activación y desactivación rápida del canal, ya que al sustituirla por una prolina que reduce significativamente la flexibilidad de la α -hélice de los segmentos S6, el canal adopta una conformación abierta más estable, caracterizada por una mayor sensibilidad al voltaje de activación y una transición al estado inactivado y cerrado sumamente lenta.

Trabajos similares de estructura-función también han sido realizados en canales de potasio para explorar la hipótesis de las glicinas como residuos bisagra obteniendo resultados contrastantes. Por ejemplo, en el canal *Shaker* se reportó que la mutante G466A (glicina “bisagra” por alanina) del segmento S6 (equivalente al M2 del canal MthK) no produce canales funcionales, sugiriendo que la glicina en esta posición es crucial para la activación del canal al conferirle a la α -hélice la flexibilidad necesaria para la apertura del canal (Ding *et al.*, 2005). Sin embargo, en canales de potasio del tipo ERG se reportó que las glicinas “bisagra” no contribuyen al mecanismo de activación de estos canales y se propone la participación de aminoácidos más hidrofóbicos cercanos al extremo intracelular del segmento S6 (Hardman *et al.*, 2005; Hardman *et al.*, 2007).

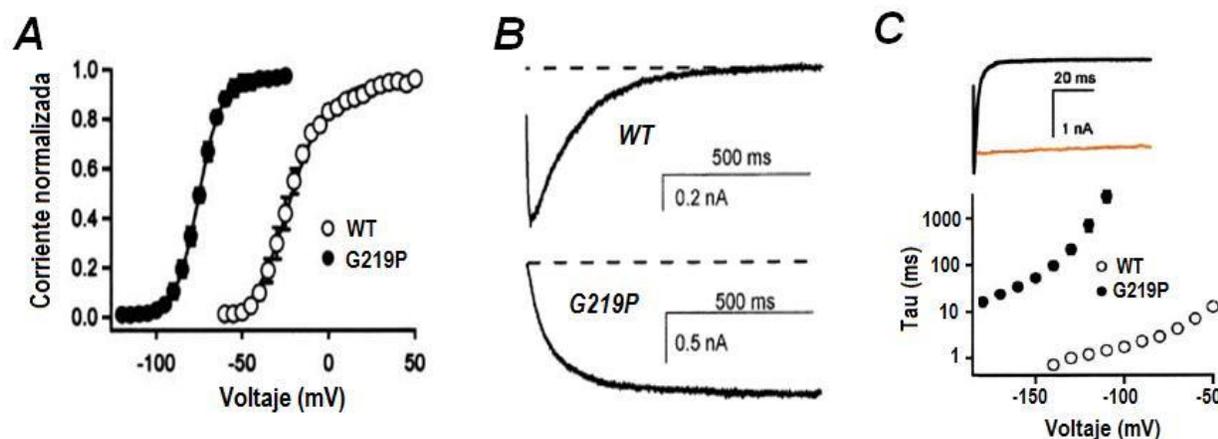


Figura 6. Modificaciones en la activación del canal NaChBac al sustituir la glicina “bisagra” por una prolina en el segmento S6. **A)** La mutante de prolina (G219P) produjo un desplazamiento en la curva de activación de ~ 50 mV hacia voltajes más hiperpolarizados, respecto al canal silvestre (WT). **B)** La cinética de inactivación de la mutante G219P se enlenteció más de 1200 veces. Corrientes de sodio registradas a -10 mV (WT) o a -60 mV (G219P) a partir de un potencial de mantenimiento de -120 mV. **C)** El cierre del canal (desactivación) mutante ocurrió con una cinética 2000 veces más lenta que el silvestre. Los registros de arriba son colas de corriente registradas a -120 mV del canal silvestre (trazo negro) y del mutante G219P (trazo amarillo). Constantes de tiempo de las colas de corriente en función del voltaje para los dos canales (Adaptada de Zhao *et al.*, 2004).

En consecuencia, la pregunta que surge es saber si dicho mecanismo caracterizado por las glicinas bisagra se conserva también en los canales Cav, dado que comparten ciertas similitudes estructurales con los canales de potasio y de sodio. Empero una diferencia sustancial, es el número de glicinas “bisagra” que contiene cada clase de canales, mientras que los de potasio tienen cuatro, los de sodio presentan tres y los de calcio únicamente dos

(en los segmentos IS6 y IIS6). Por ello, es probable que el mecanismo de activación sea diferente en estos últimos. A continuación se describen los pocos trabajos que existen al respecto.

En 2005 se reportó que los canales $Ca_v1.2$ (HVA), en el que se mutó la glicina “bisagra” del segmento IIS6 por una prolina (mutante G770P). Los resultados indicaron que la G770 no funciona como aminoácido bisagra; pero sugieren que los aminoácidos próximos a ésta (I781, L779, A780 y A782) están relacionados con la activación del canal (Figura 7A). Particularmente, las mutaciones I781P y I781T enlentecieron drásticamente el cierre del canal (Figura 7B). Por ello, los autores sugieren que debe haber un punto de flexión de la α -hélice dentro de los cuatro aminoácidos mencionados, de tal forma que dicho cambio estabiliza la conformación abierta del canal $Ca_v1.2$ (Hohaus *et al.*, 2005).

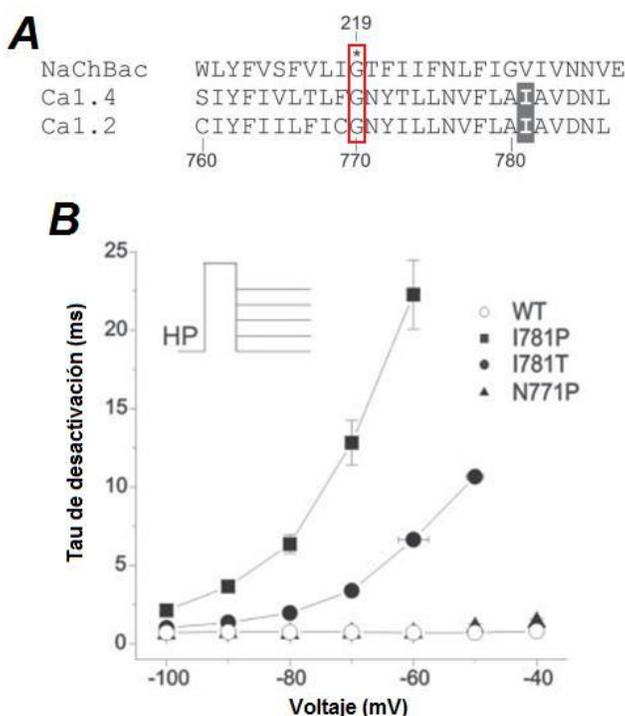


Figura 7. Alineamiento y mutaciones puntuales del residuo I781 en el segmento IIS6 del canal $Ca_v1.2$. **A)** Alineamiento de la secuencia del canal $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.4$ con el canal NaChBac para encontrar las glicinas bisagra (recuadro rojo); también se observa el residuo I781 que se presume participa en la activación del canal $Ca_v1.2$. **B)** Constantes de tiempo de cierre de los canales $Ca_v1.2$ silvestre (WT) y mutantes en función del voltaje. Las mutantes I781P e I781T indujeron un drástico enlentecimiento del cierre del canal $Ca_v1.2$ (Modificada de Hohaus *et al.*, 2005).

Posteriormente, en 2006 Raybaud y colaboradores reportaron otro estudio funcional en canales Cav HVA en el que realizaron mutaciones en las glicinas “bisagra” presentes en los segmentos I y II de los canales $Cav_{1.2}$ y $Cav_{2.3}$, así como en otras glicinas más distales de dichos segmentos (Raybaud *et al.*, 2006). La introducción de prolinas en cualquiera de las glicinas del segmento IS6 del canal $Cav_{1.2}$ generaron mutantes no funcionales; mientras que la sustitución por alanina enlenteció la cinética de inactivación y afectó ligeramente la activación del canal. Sin embargo, la sustitución de la glicina bisagra del segmento IIS6 generó corrientes muy similares a las del canal silvestre con un ligero efecto sobre la dependencia al voltaje de activación. Los autores concluyeron que la contribución de las glicinas “bisagra” del canal $Cav_{1.2}$ al mecanismo de activación es muy discreto, mientras que es más significativo el de las glicinas distales que se encuentran cerca del extremo intracelular del segmento IS6 en dicho canal, no obstante, tales glicinas no tienen el mismo papel en el canal $Cav_{2.3}$. Por consiguiente aún no queda claro cuáles son los sustratos moleculares involucrados en el mecanismo de apertura y cierre de los canales Cav y cuál es el papel que desempeñan en dicho fenómeno las glicinas “bisagra” de los segmentos S6 de los Cav , y en particular en los canales tipo T, en los que la información existente es mínima.

Nuestro laboratorio ha sido pionero en la investigación del papel de las glicinas “bisagra” de la activación de los canales tipo T. Mediante el alineamiento de las secuencias de las subunidades α entre los canales Cav_3 , canales de sodio ($Nav_{1.2}$ y $NaChBac$), así como la de los canales de potasio $KcsA$ y $MthK$ (Figura 8), fue posible identificar que los canales Cav_3 solo presentan dos glicinas “bisagra”, una en el segmento IS6 y otra en el IIS6; también se identificaron los residuos de los segmentos IIIS6 y IVS6 que pudieran fungir como aminoácidos “bisagra” en los canales Cav_3 . Así se encontró que en los tres miembros de la subfamilia Cav_3 hay una valina (V) y una glutamina (Q) en los segmentos IIIS6 y IVS6 que podrían tener la función de residuos “bisagra” en estos canales. Interesantemente, los canales $Nav_{1.2}$ poseen una tercera glicina en el dominio III, por lo que es posible que la valina del dominio III funcione como aminoácido “bisagra” en el canal Cav_3 .

KcsA	R	C	V	A	V	V	M	V	A	G	I	T	S	F	G	L	V	T	A	A	L	A	T	W	F	
MthK	M	Y	F	T	V	T	L	I	V	L	G	I	G	T	F	A	V	A	V	E	R	L	L	E	F	L
NaChBac	W	L	Y	F	V	S	F	V	L	I	G	T	F	I	I	F	N	L	F	I	G	V	I	V	N	N
Nav1.2-IS6	M	I	F	F	V	L	V	I	F	L	G	S	F	Y	L	I	N	L	I	L	A	V	V	A	M	A
Nav1.2-IIS6	L	T	V	F	M	M	V	M	V	I	G	N	L	V	V	L	N	L	F	L	A	L	L	L	S	S
Nav1.2-IIIS6	Y	L	Y	F	V	I	F	I	I	F	G	S	F	F	T	L	N	L	F	I	G	V	I	I	D	N
Nav1.2-IVS6	I	F	F	F	V	S	Y	I	I	I	S	F	L	V	V	N	M	Y	I	A	V	I	E	N	N	
Ca _v 3-IS6	F	I	Y	F	I	L	L	I	I	V	G	S	F	F	M	I	N	L	C	L	V	V	I	A	T	Q
Ca _v 3-IIS6	A	L	Y	F	V	A	L	M	T	F	G	N	Y	V	L	F	N	L	L	V	A	I	L	V	E	G
Ca _v 3-IIIS6	L	L	Y	F	I	S	F	L	L	I	V	S	F	F	V	L	N	M	F	V	G	V	V	V	E	N
Ca _v 3-IVS6	I	Y	F	V	S	F	V	L	T	A	Q	F	V	L	V	N	V	V	I	A	V	L	M	K	H	L

Figura 8. Alineamiento de las α -hélices internas que forman el poro de canales iónicos. La glicina conservada en las hélices de los segmentos S6 o M2 (según el tipo de canal) está resaltada en azul cielo en el alineamiento de las secuencias de los canales bacterianos de potasio KcsA y MthK, y de sodio NaChBac; con las de los canales de mamífero de sodio (Nav1.2) y de calcio tipo T (Ca_v3). En éste último casos se presentan las secuencias consenso de los tres canales Ca_v3, y las posiciones con variaciones están resaltadas en amarillo.

Con base en el alineamiento de la Figura 8 en nuestro laboratorio se llevó a cabo un estudio donde se realizaron mutaciones puntuales en las glicinas “bisagra” del canal de calcio activado por voltaje Ca_v3.3; obteniendo resultados contrastantes (Sepulveda-Hirose, 2012). Por un lado la mutación por prolina del residuo Gly385 (segmento IS6) aceleró significativamente la desactivación de los canales (Figura 9), y desplazó la dependencia al voltaje de la activación a potenciales más positivos. Por otro lado, la sustitución por prolina del residuo Gly814 (segmento IIS6) resultó en un cierre más lento del canal (2 veces respecto al canal silvestre) (Figura 9C), y tuvo un efecto muy discreto en la activación del canal a voltajes más negativos. Ambas mutaciones desplazaron la curva de inactivación en el estado estacionario hacia voltajes más negativos. Interessantemente, el residuo Val1383 (segmento IIIS6) también fue sustituido por varios aminoácidos y los resultados obtenidos sugieren que este aminoácido tiene un papel importante en los mecanismos de inactivación y cierre del canal Ca_v3.3. En particular, la mutación de dicha valina por glicina indujo los efectos más notables sobre la estabilización del canal en el estado abierto (Figura 9D).

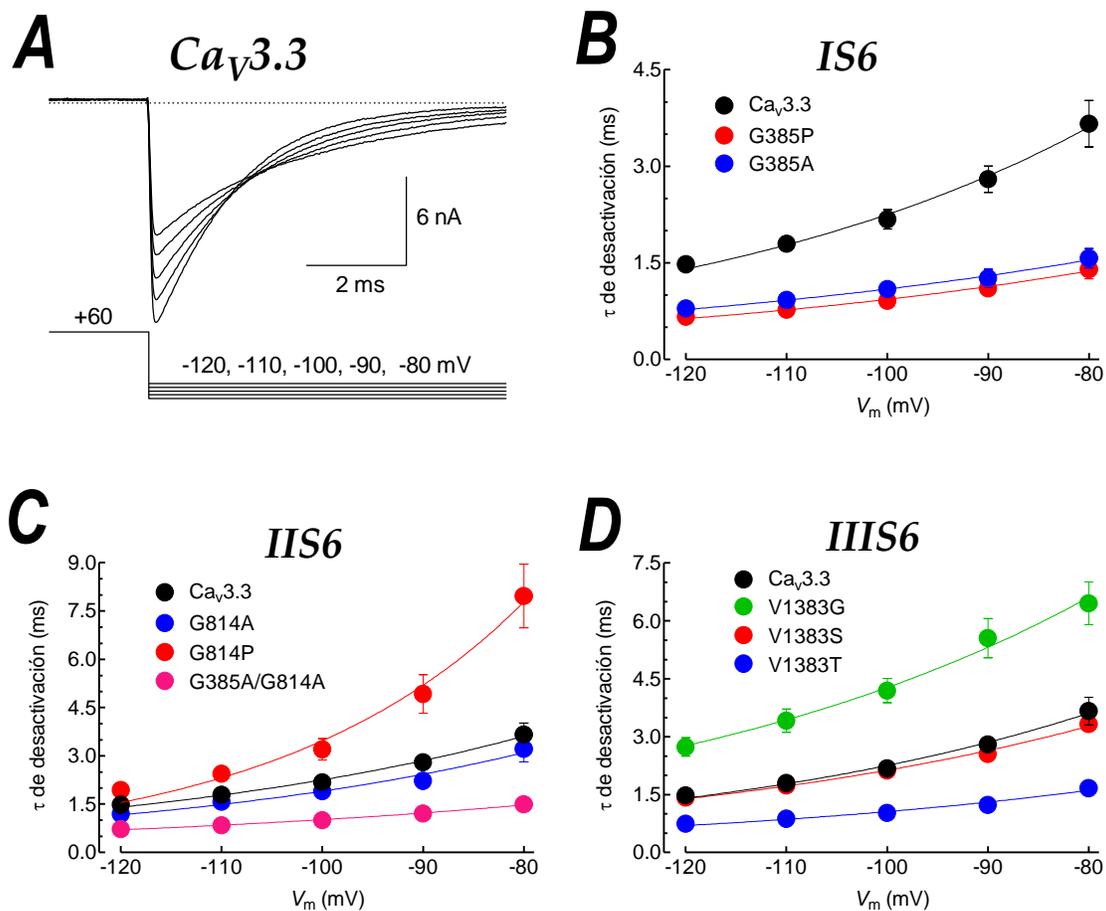


Figura 9. Efecto de las mutaciones en los segmentos IS6, IIS6 y IIIS6 en el cierre de los canales $Ca_v3.3$. **A)** Trazo representativo de las colas de corriente generadas por el canal $Ca_v3.3$. **B-D)** Cinética de cierre de las mutaciones evaluadas y del canal silvestre. Las mutaciones de los segmentos IS6 y IIS6 aceleraron el cierre del canal; mientras que de las mutaciones en el IIIS6 solo la sustitución por glicina enlenteció significativamente el cierre del canal (Modificado de Sepulveda-Hirose, 2012).

En resumen, las evidencias reportadas en la literatura sobre los elementos estructurales involucrados en el mecanismo de apertura y cierre de los canales Ca_v y en particular los Ca_v3 , es insuficiente para llegar a un consenso sobre este tema de investigación, lo que plantea la necesidad de realizar más estudios encaminados a obtener más información al respecto.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los canales de calcio activados por voltaje son una de las principales vías de entrada de calcio a la célula; sin embargo, no existe información suficiente acerca del mecanismo por el cual estos canales se abren y cierran en respuesta a los cambios en el voltaje de la membrana plasmática. Estudios previos en canales de potasio y de sodio han proporcionado algunas evidencias para explicar el fenómeno de apertura y cierre (Jiang *et al.*, 2002b; Zhao *et al.*, 2004; Magidovich & Yifrach, 2004; Ding *et al.*, 2005), en los que se proponen residuos de glicina que permiten una torción (giro) de las α -hélices, lo que ocasiona la apertura del canal.

En este contexto, la clonación de los genes que codifican para los canales de calcio Cav3 (Cribbs *et al.*, 1998; Perez-Reyes *et al.*, 1998; Gomora *et al.*, 2002), permitió un avance sustancial en el conocimiento de estos canales en materia de farmacología y de relación estructura-función. El alineamiento de las secuencias de las subunidades α_1 de los canales tipo T indica que en dos de los cuatro dominios se conserva un residuo de glicina, los que permite suponer que estos funcionan como “bisagra” en el momento de la apertura y cierre del canal. No obstante, los dominios III y IV de las subunidades α_1 de los canales Cav3 carecen de glicinas en los sitios correspondientes de los canales de potasio y sodio, por lo que es probable que el mecanismo de apertura de los canales de calcio difiera del que presentan aquellos.

El único antecedente directo sobre el mecanismo de apertura y cierre de los canales de calcio tipo T, es un trabajo previo de nuestro grupo de investigación en el que se estudió el canal Cav3.3 (Sepulveda-Hirose, 2012) y los resultados sugieren que en efecto existen diferencias con los canales de potasio y de sodio, por lo tanto el propósito del presente trabajo de tesis consistió en investigar la contribución de las glicinas bisagra y la valina del segmento IIS6 en el mecanismo de activación de los canales Cav3.1 y determinar si existen diferencias en dicho proceso dentro de los mismos canales Cav3.

4. HIPÓTESIS

Debido a que los canales Cav3.1, Nav y Kv, comparten similitudes estructurales basadas en secuencias de aminoácidos conservadas entre ellos, entonces cabría esperar que los residuos “bisagra” de los segmentos IS6, IIS6 y IIIS6 participen en el mecanismo de apertura y cierre del canal Cav3.1.

5. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Analizar la participación que tienen los aminoácidos considerados “bisagra” de los segmentos transmembranales IS6, IIS6 y IIIS6 de la subunidad α_1 del canal Cav3.1 en el mecanismo de apertura y cierre del canal.

B. Objetivos particulares

- ✓ Construir mutantes del canal Cav3.1, en donde los aminoácidos “bisagra” de los segmentos IS6, IIS6 y IIIS6 se sustituyan por prolina, alanina, serina y treonina; así como por glicina en el caso de la valina del IIIS6.
- ✓ Caracterizar y comparar las propiedades biofísicas de los canales Cav3.1 silvestres y mutantes, para determinar la participación de las glicinas y la valina en el mecanismo de activación de los canales Cav3.1.

6. MÉTODOS

La estrategia experimental general del presente proyecto consistió en utilizar técnicas de biología molecular para construir mutantes del canal Cav3.1. Las mutaciones consistieron en sustituir los aminoácidos “bisagra” de los segmentos IS6, IIS6 y IIIS6 de dicho canal, por aminoácidos que 1) preserven la estructura en α -hélice como la alanina (A); 2) interrumpen la estructura α -hélice como la prolina (P) y residuos menos hidrofóbicos como la treonina (T) y serina (S); y 3) confieran mayor movilidad (giro o torsión) a la α -hélice como lo hace la glicina (G) (Petsko & Ringe, 2004). Estas mutaciones permitieron estudiar la participación de tales aminoácidos en el mecanismo de activación de los canales Cav3.1 al inducir modificaciones en la estructura de este último. La funcionalidad de las construcciones mutantes así como del canal Cav3.1 silvestre se analizó mediante su expresión transitoria en células HEK-293 y posterior estudio con la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa para analizar toda la población de canales presentes en la membrana plasmática de dichas células. A continuación se describen con detalle las técnicas y procedimientos experimentales utilizados en el presente trabajo de tesis.

A. Construcción de canales mutantes

En el presente trabajo se utilizó el DNA complementario (cDNA) que codifica para el canal Cav3.1 de humano (No. de acceso en el *GenBank*: AF190860) (Cribbs *et al.*, 2000). Las mutaciones se llevaron a cabo mediante la técnica de extensión por empalme con la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Ho *et al.*, 1989; Sambrook & Russell, 2001). Dicha estrategia consta de tres reacciones de PCR y cuatro oligonucleótidos específicos que sirven como iniciadores o *primers*. Dos de los cuales tienen la función de introducir las mutaciones (*primers* mutagénicos) y son complementarios uno con el otro (Tabla 1); los otros dos iniciadores (*primers* candado) son complementarios con la secuencia de Cav3.1 y delimitan el tamaño del fragmento mutante que será reemplazado en el canal Cav3.1 silvestre (WT) (Figura 10). Con la finalidad de generar todas las mutaciones deseadas de un aminoácido en una única serie de tres reacciones de PCR, se diseñaron *primers* mutantes degenerados tal como se muestra en

la Tabla 1. Las mutantes generadas con tales *primers* fueron las siguientes: de la glicina 382 del dominio I, G382A, G382P, G382S, y G382T; de la glicina 951 del dominio II: G951A, G951P, G951S y G951T; y de la valina 1501 del dominio III: V1501A, V1501S, V1501T, V1501P y V1501G.

Tabla 1. Nombre, secuencia y ubicación de los *primers* utilizados para generar los fragmentos mutantes por PCR

Nombre	Secuencia (5'→3')	Dominio y ubicación en Cav3.1 (nt)
G382x	F: CCTCATCATCGTG V SC TCCTTCTTCATG R: CATGAAGAAGGAG S BCACGATGATGAGG	I (1347-1374)
G382c	F: GAGGACATCGCCTGTGACTCC R: CACCAGGTACTTGAGCAGCTCC	I (529-549) I (1518-1539)
G951x	F: CCTCATGACCTTC V SCAACTACGTGCTC R: GAGCACGTAGTT S BGAAGGTCATGAGG	II (3053-3081)
G951c	F: ACCATGGACAACGTGGCCACC R: AGATGCGTTCAGCGCTGTGGG	II (2797-2817) II (4052-4072)
V1501x	F: GTTCCTGCTCATT V SCGCCTTCTTTGTCC R: GGACAAAGAAGGC S BAATGAGCAGGAAC	III (4704-4732)
V1501c	F: GTCCTCACTGAAACCCATCGG R: CCCAGATTCTGGATGAGGCTC	III (4365-4385) III (5021-5041)

Se presenta la secuencia de cada uno de los *primers* sentido (F), y antisentido (R) utilizados en las reacciones de PCR. Los *primers* mutagénicos se denotan con una x al final del nombre y los *primers* candado con una c en la misma posición. Las bases remarcadas en los *primers* mutagénicos indican el codón mutante con el que se generaron las diferentes mutaciones. Las bases degeneradas de las secuencias indican la presencia de una A, una C o una G en el caso de la V: una C o una G cuando aparece una S; y una T, una C o una G cuando la letra es una B. Los números entre paréntesis en la columna de la derecha indican la ubicación a la que se unen los *primers* en la secuencia del canal Cav3.1 utilizada en el presente estudio.

Para cada mutante se realizaron dos reacciones de PCR simultáneas: la PCR1 incluyó el *primer* candado sentido (cF) y el *primer* mutante antisentido (xR); la PCR2 incluyó el *primer* candado antisentido (cR) y el *primer* mutante sentido (xF). La cantidad de primer en cada tubo de reacción varió entre 120 y 170 ng. Por su parte la cantidad del DNA molde (cDNA del canal Cav3.1-WT) en ambos casos se mantuvo en 40 ng. En las reacciones PCR1 y PCR2 se emplearon 2 U de la enzima Deep Vent (New England BioLabs, Ipswich, MA, EUA), 5 µl de Buffer 10X, 1 µl de dNTPs (100 mM; Invitrogen, Carlsbad CA, EUA) y suficiente H₂O para alcanzar un volumen final de 50 µl en tubos Eppendorf de 0.2 ml. Las reacciones de PCR se realizaron en tres etapas

utilizando un termociclador Veriti (Applied Biosystems, Carlsbad CA, EUA): primeramente un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 30 s; seguido de 33 ciclos consecutivos cada uno de ellos incluyendo tres fases, desnaturalización (30 s a 94°C), hibridación (60 s a 61°C) y extensión (60 s a 72°C). Por último, la tercera etapa consistió de una extensión final de 5 min a 72°C. En la tercera reacción de PCR (PCR3) se utilizó como templado a los productos de la PCR1 y PCR2 en concentraciones equimolares (por lo general 5 µl de cada reacción) y los *primers* candado correspondientes. El volumen de reacción final se completo con los mismos componentes descritos para las reacciones PCR1 y PCR2, así como las condiciones de termociclado.

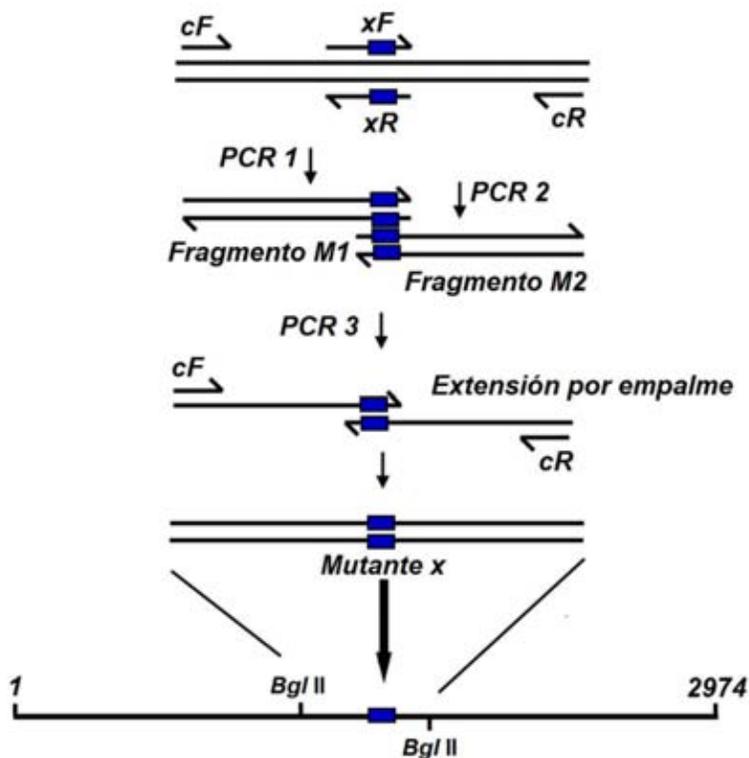


Figura 10. Representación esquemática de la técnica de extensión por empalme utilizada en la construcción de los mutantes de los canales Cav3.1. Se utilizaron tres reacciones de PCR para obtener cada mutante. En la PCR1 y PCR2 se utilizaron *primers* mutantes (indicados como xF y xR), y *primers* candado (indicados como cF y cR). En la PCR3 se utilizaron únicamente los oligonucleótidos candado, y se emplearon los fragmentos M1 y M2 amplificados anteriormente para unirlos por empalme y generar un fragmento completo mutante x. Este último se subclonó en el vector pJET1.2/Blunt, para determinar por secuenciación automática las mutantes correctas. El tamaño del fragmento mutante también puede ser verificado por digestión con la enzima *Bgl* II, cuyos sitios flanquean el fragmento ligado.

El tamaño, en pares de bases, de los productos obtenidos de la PCR₃ se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. En la mayoría de los casos la abundancia relativa del fragmento esperado en la PCR₃ permitió la subclonación directa, mientras que en otros casos fue necesario purificar primero el fragmento en cuestión. La identidad molecular de los fragmentos mutantes se obtuvo mediante secuenciación automática de los amplicones, previamente subclonados en un vector de secuenciación, como se describe a continuación.

Los productos amplificados provenientes de la PCR₃ se subclonaron en el vector pJET1.2/Blunt del kit *CloneJET PCR Cloning* (Fermentas-Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) para ser secuenciados y corroborar su identidad molecular. Las reacciones de ligación se llevaron a cabo a 22°C durante 30 min en microtubos con 2 µl de la reacción PCR₃, 10 µl de Buffer de reacción 2X, 1 µl de T4 DNA ligasa, 1 µl de vector pJET1.2/Blunt, y 6 µl de H₂O libre de nucleasas. Posteriormente, estas ligaciones se utilizaron para transformar bacterias *E. coli* DH5α, mismas que fueron sembradas en placas de agar con medio de lisogenia (LB) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Las colonias de bacterias que crecieron se eligieron (típicamente 24 colonias por cada reacción PCR₃) y se resembraron en medio LB líquido también con ampicilina con el fin de amplificar el plásmido de interés, se incubaron a 37°C en agitación constante (250 rpm) por un periodo de 16 horas y posterior a ello se procedió a la purificación del DNA plasmídico con el kit *Qiaprep Spin MiniPrep* de Qiagen (Hamburgo, Alemania). Un µl de cada plásmido purificado se digirió con la enzima *Bgl* II para liberar el fragmento de DNA ligado en el vector, y los productos de la digestión fueron visualizados en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio. Los vectores conteniendo el fragmento con el tamaño esperado en cada caso, fueron seleccionados para secuenciación de manera automática en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (IFC) y así corroborar la presencia de la mutación deseada y la ausencia de cualquier otra mutación no deseada. Finalmente, los fragmentos mutantes fueron substituidos en el canal silvestre mediante la estrategia de corte y pegado con el uso de enzimas de restricción con sitios únicos en la construcción correspondiente y la T4 DNA ligasa, (como se indica en la sección de Resultados correspondiente). Nuevamente, las construcciones finales conteniendo cada una de las

mutaciones fueron secuenciadas de manera automática para corroborar su identidad molecular.

B. Cultivo de células HEK-293

En el presente estudio se empleó una línea celular que fue asilada a partir de un tumor renal de embrión humano, y que se denominan células HEK-293. Las ventajas que ofrecen estas células como sistema de expresión heterólogo es que exhiben una alta eficiencia de transfección, crecen rápidamente y lo más importante para el presente trabajo de tesis, que no expresan corrientes de calcio endógenas, por lo que representan un excelente sistema de expresión de canales Ca_v . Las células se crecieron en monocapas a 37°C con una atmósfera húmeda con 95% de O_2 y 5% de CO_2 en cajas Petri de plástico de 100 mm de diámetro con medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (GIBCO, Carlsbad, CA, EUA). El cultivo se regeneró cuando la monocapa celular alcanzó una confluencia cercana al 90%. Al momento de regenerar el cultivo, también se sembraron cajas Petri de 35 mm de diámetro con una alícuota de $5-6 \times 10^5$ células, las cuales se utilizaron posteriormente para realizar las transfecciones como se describe a continuación.

C. Transfección de células HEK-293 con los canales $Ca_v3.1$

Las transfecciones se realizaron en cajas Petri de 35 mm con una monocapa de células HEK-293 entre 60 y 70 % de confluencia, como ya se ha descrito previamente por nuestro grupo de investigación (Sepulveda-Hirose, 2012). Las células se transfectaron con el cDNA de la subunidad α_1 del canal $Ca_v3.1$ (silvestre o mutante) contenido en el vector pCDNA3 y el cDNA de la proteína verde fluorescente (GFP) siguiendo el método de transfección con *JetPei* (PolyPlus Transfection, Illkirch, Francia). Después de 24 h (y como máximo 72 h) de la transfección, las células fluorescentes (indicativo de que expresan tanto la GFP como el canal $Ca_v3.1$) fueron seleccionadas para realizar los experimentos electrofisiológicos con la técnica de *patch clamp*.

D. Experimentos electrofisiológicos

En este trabajo se empleó la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana, en la configuración de célula completa mejor conocida como *Whole-cell patch clamp* (Hamill et al., 1981; Sakmann & Neher, 1995), para estudiar las corrientes de los canales Cav3.1 silvestres y mutantes. El sistema de registro (*set up*) consistió de un amplificador Axopatch 200B conectado a una interfase Digidata 1322 A/D (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Esta última tiene la función de convertir las señales analógicas generadas por la célula bajo estudio a señales digitales para que sean reconocidas y almacenadas en una computadora que contiene el software pClamp 9.2 (Molecular Devices), cuya subcarpeta de Clampex permitió diseñar y aplicar los protocolos de voltaje que se aplicaron a la célula en turno. Una esquematización de las conexiones del *set up* se presentan en la Figura 11.

La técnica de *patch clamp* consistió en la formación de un sello de alta resistencia (en el orden de giga ohmios, $G\Omega$) entre la punta de una pipeta de vidrio (o pipeta de registro) y la membrana de la célula en estudio. Para alcanzar tal propósito, se posiciona la pipeta encima de la membrana celular y se aplica presión negativa (succión) para aumentar la resistencia del sello, hasta alcanzar el orden de $G\Omega$. Posteriormente se aplica un voltaje estacionario a través de la pipeta de registro, que en el presente proyecto de investigación siempre fue de -100 mV, mismo que se denomina potencial de mantenimiento (HP). Inmediatamente después se procede a romper la microárea de membrana celular incluida en la punta de la pipeta de vidrio (de $\sim 1 \mu\text{M}$ de diámetro) aplicando presión negativa adicional. La maniobra anterior permite tener acceso al ambiente intracelular lo que establece dos características del experimento: 1) casi instantáneamente, la solución contenida en la pipeta de registro (solución interna) determina la composición del ambiente intracelular; y 2) permite controlar (fijar) el voltaje del interior de la célula, y medir la actividad de los canales que se encuentren en la membrana plasmática de la misma, de aquí que esta configuración sea conocida como célula completa o *whole-cell*. A partir de este momento la actividad de los canales Cav3.1 es investigada mediante la aplicación de pulsos comando de voltaje (protocolos de voltaje) diseñados con el programa Clampex.

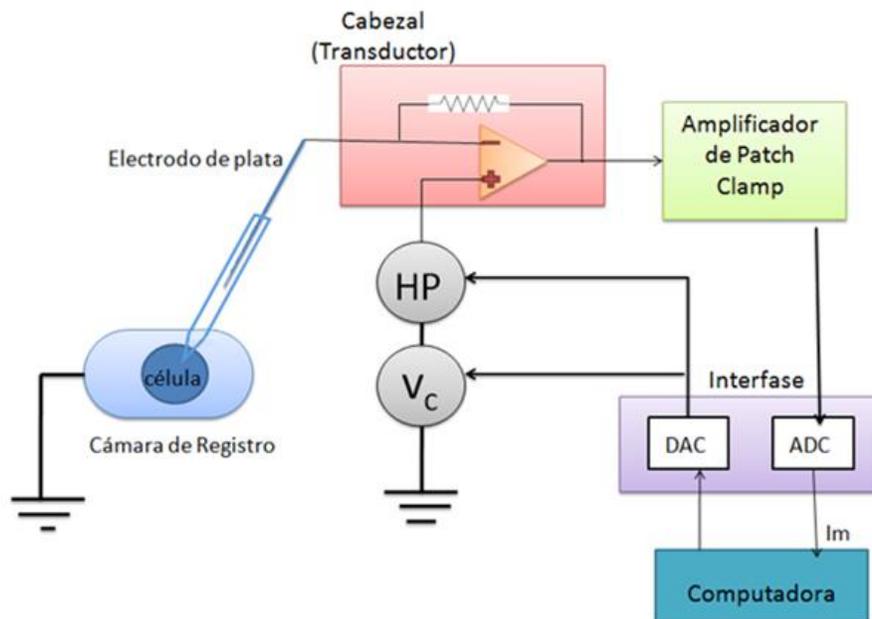


Figura 11. Esquema del sistema de registro empleado en los experimentos electrofisiológicos. Las corrientes iónicas se registraron con la técnica de *patch clamp* en la configuración de célula completa. El amplificador operacional que se encuentra en el cabezal (*headstage*) controla el voltaje impuesto por el electrodo de plata y a la vez cuantifica la corriente iónica que fluye a través de la membrana celular (I_m). El amplificador de *patch clamp* recibe la información provenientes del cabezal y permite reducir manualmente las espigas capacitivas asociadas a la instalación y corte de pulsos despolarizantes; así mismo, el amplificador genera el potencial de mantenimiento (HP) entre cada pulso. Los pulsos comando (V_c) se diseñan con el programa Clampex instalado en la computadora y se transforman con el convertidor digital-análogo (DAC) de la interfase, para ser aplicados a la célula mediante el electrodo de plata contenido en la pipeta de registro. La señal de las corrientes iónicas evocadas por la aplicación de dichos pulsos a la célula se transfiere al convertidor análogo-digital (ADC) también de la interfase, para que estas puedan ser almacenadas en la computadora. En la pantalla de ésta también se monitorea la formación del sello de alta resistencia, las espigas capacitivas asociadas a la capacitancia membranal (así como su cancelación) y las corrientes iónicas generadas por la célula.

Antes de iniciar propiamente los registros electrofisiológicos, un cubreobjetos con células HEK-293 transfectadas fue transportado de la incubadora a la cámara de registro que se encuentra en la platina de un microscopio invertido (modelos Eclipse TE300 o Eclipse TE200-U, Nikon, Japón), donde las células se visualizaron a un aumento de 200X y los registros se llevaron a cabo a una temperatura de 20 a 23 °C. El registro se inició después de cinco minutos de haber sido colocadas en la cámara de registro, y cada hora se substituyo el cubreobjetos por uno nuevo. La solución contenida en la cámara de registro (solución externa, véase más adelante), se recambió constantemente mediante un sistema de perfusión impulsado por

gravedad (con un flujo de $\sim 1\text{ml}/\text{min}$), acoplado a una válvula giratoria de seis vías. Los electrodos de registro se fabricaron a partir de capilares de borosilicato de vidrio TW150-3 (WPI Inc.; Sarasota, FL, EUA) con la ayuda de un estirador horizontal Modelo P-97 (Sutter Instrument; Novato, CA, EUA).

Para obtener los registros de la actividad de los canales $\text{Ca}_v3.1$ se utilizaron dos soluciones: una interna, la que estuvo contenida en la pipeta (electrodo) de registro, y cuya composición fue la siguiente (en mM): 130 CsCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 10 EGTA, 10 HEPES, 4 Mg ATP y 0.3 Tris GTP, ajustada a pH 7.3 con CsOH y una osmolaridad de 290 mOsm; y otra externa, que se utiliza para perfusión de la preparación, es decir, es la solución que baña las células en la cámara de registro y cuya composición fue (en mM): 160 cloruro de tetraetilamonio (TEA-Cl), 5 CaCl_2 y 10 mM de HEPES, pH de 7.4 y una osmolaridad de 305 mOsm.

Los protocolos de voltaje utilizados en el presente estudio fueron los siguientes, en todos los casos el HP fue de -100 mV:

- *SP-30150*. Aplica un pulso despolarizante a -30 mV de 150 ms de duración que se repite cada 10 s. Este protocolo permite visualizar de manera rápida, la calidad del sello y las características generales de la corriente, como amplitud y cinética.
- *IV100*. Consiste en una serie de pulsos despolarizantes de 100 ms a diferentes voltajes, desde -80 hasta +80 mV, en incrementos de 10 mV. La información que este protocolo permitió analizar fue la dependencia al voltaje de la activación de la corriente generada por los canales $\text{Ca}_v3.1$, así como el curso temporal con el que se desarrollan dichas corrientes a cada voltaje explorado.
- *IIV2ms60-2ch*. Protocolo para estudiar el proceso de desactivación o cierre de los canales $\text{Ca}_v3.1$. Consiste de un pulso despolarizante de corta duración (2 ms) a +60 mV con la finalidad de activar prácticamente todos los canales presentes en la membrana plasmática e impedir que pasen al estado inactivado. Después del pulso de 2 ms el V_m es fijado a diferentes voltajes (desde -120 hasta +80 mV, con incrementos de 10 mV) durante 40 ms con el propósito de registrar el cierre de los canales que se abrieron a

+60 mV, fenómeno que se manifiesta como un decaimiento exponencial de la corriente y que se le conoce como colas de corriente.

- *Hinf10s-100*. Éste es un protocolo clásico de dos pulsos, el primero es un prepulso de larga duración (10 segundos) despolariza el V_m a diferentes valores: -110, -100, -90, -85, -80, -75, -70, -65, -60, -55, -50, -45, -40 con la intención de promover la inactivación de los canales a cada uno de esos voltajes; mientras que el segundo pulso siempre es a -30 mV y de solo 200 ms de duración. Así, la amplitud de la corriente registrada durante el segundo pulso indica la fracción de canales que no se inactivaron durante el prepulso de larga duración. Con la información recabada con este protocolo de voltaje se construyeron las curvas de inactivación en el estado estacionario.
- *Recover-100*. Otro protocolo de dos pulsos. En este caso ambos despolarizan el V_m a -30 mV, la diferencia es que el primero debe durar lo suficiente para inactivar en su totalidad la corriente que se activa a -30 mV, en las presentes condiciones de registro tuvo una duración de 150 ms. El segundo es de menor duración (20 ms) ya que se busca únicamente registrar el pico máximo de corriente a -30 mV. Los pulsos se aplican separados entre sí por un intervalo de tiempo creciente que varió de 1 a 2000 ms. El protocolo ayuda a estimar el tiempo con el que el canal abandona el estado inactivado, es decir, proporciona el curso temporal de la recuperación de la inactivación.

D.1. Análisis de datos electrofisiológicos

El análisis de las corrientes obtenidas en respuesta a los protocolos de voltaje aplicados se llevo a cabo utilizando la subcarpeta Clampfit de pClamp 9.2 en combinación con los programas Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) y Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). La dependencia al voltaje de la activación de la corriente de Ca^{2+} generada por los canales $Ca_v3.1$ se obtuvo del protocolo *IV100* y los datos experimentales fueron ajustados con la siguiente ecuación de Boltzmann modificada:

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

donde I_{Ca} es la corriente al pico, I_{max} es la corriente máxima observada, V_m es el potencial de membrana, V_{inv} es el potencial de inversión de la corriente, $V_{1/2}$ es el voltaje al cuál se alcanza el 50% de la corriente máxima y k es la pendiente de la relación. Los datos de la inactivación en el estado estacionario de los canales $Ca_v3.1$ se ajustaron con una función de Boltzmann de la siguiente forma:

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

donde I_{Ca} es una fracción de corriente inactivada a x voltaje, I_{max} es la corriente máxima, $V_{1/2}$ es el voltaje al que se inactivan la mitad de los canales disponibles, V_m es el potencial de membrana, y k es la pendiente de la relación.

Para el análisis de la cinética de las corrientes de calcio registradas se realizó un ajuste de cada uno de los trazos del protocolo *IV100* con dos funciones exponenciales, una para la activación y otra para la fase de inactivación, obteniendo así una constante de tiempo (τ) para cada uno de dichos fenómenos. Por otra parte, el curso temporal del cierre de los canales $Ca_v3.1$ se analizó con los registros de las colas de corriente obtenidas al aplicar el protocolo *IV2ms60-2ch*. El decaimiento de la corriente al repolarizar la membrana (colas de corriente) se ajustó con una función exponencial simple (Serrano *et al.*, 1999), con lo que se obtuvo la constante de tiempo con la que el canal se cierra. De igual forma, los datos de recuperación de la inactivación se ajustaron con una función exponencial para obtener la constante de tiempo respectiva (τ_h).

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

7. RESULTADOS

A. Construcción de los canales mutantes de Cav3.1

Las construcciones moleculares de los canales Cav3.1 se generaron por mutagénesis dirigida, empleando la técnica de empalme por PCR. En la Figura 12 se observan fotografías de los geles de agarosa que muestran las bandas obtenidas tras las tres reacciones de PCR para obtener las mutaciones de los tres segmentos evaluados. Los fragmentos generados fueron subclonados en el vector pJet1.2/Blunt para verificar por análisis de restricción con endonucleasas y secuenciación automática la presencia de la mutación deseada en cada uno de los casos. Posteriormente, los fragmentos mutantes correctos fueron utilizados en la construcción final del canal Cav3.1 mutante en cuestión.

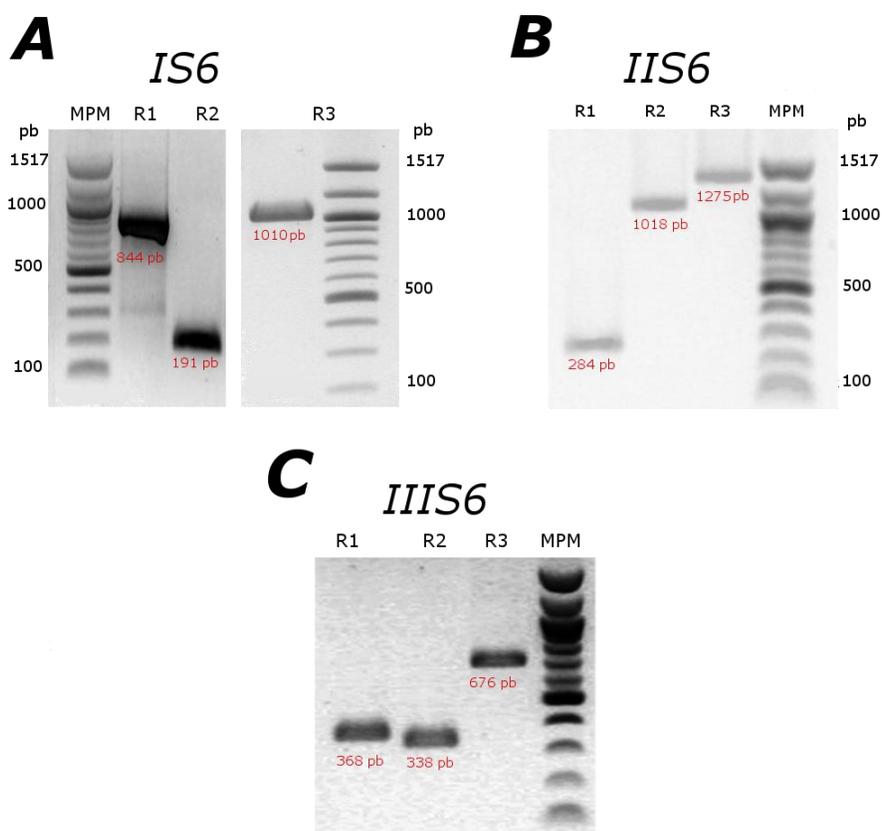


Figura 12. Fragmentos mutantes generados por la técnica de empalme por PCR. Fotografías de los geles de agarosa que muestran los fragmentos mutantes obtenidos por las tres reacciones de PCR del segmento IS6 (**A**), IIS6 (**B**) y IIIS6 (**C**). Las reacciones uno (R1) y dos (R2) se generaron utilizando como molde el DNA del canal Cav3.1 silvestre, mientras que el producto de la reacción tres (R3) se generó como resultado del empalme de los productos de R1 y R2. Este último fragmento (R3) contiene la mutación en ambas hebras de DNA y se subclonó en el vector pJet1.2/Blunt (como se ilustra en la Figura 10).

A.1. Generación de fragmentos mutantes con oligonucleótidos degenerados

Con los *primers* degenerados mostrados en la Tabla 1 se logró obtener las varias mutaciones de cada residuo estudiado en el presente trabajo de tesis en una sola ronda de reacciones de PCRs. El canal Cav_{3.1} silvestre contiene residuos de glicina en las posiciones 382G y 951G (dominio I y II, respectivamente), mientras que en el dominio III se ubica una valina en la posición correspondiente de la glicina bisagra del canal de potasio o de sodio (Figura 8), razón por lo cual se incluyó para hacer las mutaciones respectivas. Todas las mutaciones se lograron al intercambiar uno o dos nucleótidos de la secuencia de DNA que codifica para el canal Cav_{3.1}-WT. El triplete de nucleótidos que codifica para la glicina es GGC; para obtener la mutante por alanina en los tres casos, se intercambió la base purínica guanina (G) de la segunda posición por la base pirimídica citosina (C), lo que generó el triplete GCC mismo que codifica para la alanina (Ala). Para la mutante de prolina, se sustituyeron las dos guaninas del triplete de GGC por citosinas para obtener el codón CCC de prolina (Pro); en el caso de la mutación por serina se sustituyó una guanina por una adenina (A) en la primera posición para generar el codón AGC (Ser); en cuanto a la mutante de treonina, se sustituyó una G por una A en la primera posición y una G por una C en la segunda posición para generar ACC (Thr). Por último, solo en el caso del dominio III se generó una mutante adicional en donde se intercambió la valina por una glicina (V1501G). La valina está codificada por el triplete GTG, y la glicina es GGC, por lo que se intercambió una timina (T) por una guanina y una guanina por una citosina en la segunda y tercera posición, respectivamente. A continuación, se describe la estrategia utilizada para liberar los fragmentos mutantes contenidos en el vector pJet2.1/Blunt y reincorporarlos por el fragmento correspondiente en la construcción que codifica para el canal Cav_{3.1}-WT.

A.1.1. Construcción de canales mutantes del segmento IS6

Como se indica en la Figura 10, todos los fragmentos mutantes obtenidos por PCR se clonaron en el vector Jet1.2/Blunt (2974 pb). Después de corroborar su identidad molecular, éstos fueron integrados al canal Cav_{3.1}-WT con la ayuda de enzimas de restricción. En el caso del segmento IS6, se utilizaron los sitios únicos de las enzimas *Sbf* I y *Nhe* I (contenidos en el mismo fragmento mutante; Figura 13A), así que se digirió el plásmido que contiene el canal Cav_{3.1}-WT (pCDNA3.1 + Cav_{3.1}, 12804 pb; Figura 13B) con dichas enzimas, dando lugar a un

fragmento de 11887pb (fragmento A) y otro de 917pb (Figura 13C). Paralelamente con las mismas enzimas se digirieron por separado las mutantes G382A, G382P, G382S y G382T contenidos en el vector Jet1.2/Blunt, generando fragmentos de 3068 y 917 pb (fragmento B; Figura 13D). Los productos de las digestiones se separaron en geles de agarosa y se recuperaron los fragmentos de 11887 pb de α 1G (fragmento A) y el de 917 de las mutantes (fragmento B). Ambos fragmentos se ligaron con 1 μ l de ligasa en reacciones de 20 μ l de volumen final para obtener las mutantes del segmento IS6.

A.1.2. Construcción de canales mutantes del segmento IIS6

Para las mutantes del dominio II (segmento IIS6) se utilizaron los sitios de las enzimas *Xho* I y *Nsi* I (Figura 14A). Debido a que éstos no son únicos en la construcción Cav3.1-WT (Figura 14C), se recurrió a una tercera construcción que sirvió como intermediaria en la generación de mutantes de este dominio. Dicha construcción contiene el fragmento *Kpn* I de Cav3.1-WT (7128 pb) clonado en el sitio respectivo de la región múltiple de clonación (*polilinker*) del vector pUC19. Así, el fragmento *Xho* I-*Nsi* I (1022 pb) del vector Jet/Blunt se ligó al plásmido pUC19 + Cav3.1 previamente digerido con las mismas enzimas (Figura 14, paneles B y D). Finalmente, las mutantes del dominio II se lograron generando el fragmento *Kpn* I de 7128 pb de cada una de las mutantes subclonadas en el vector pUC19 + Cav3.1, el cual se ligó al fragmento de 5678 pb obtenido al digerir el canal Cav3.1-WT con la misma enzima (Figura 14, paneles C y E).

A.1.3 Construcción de canales mutantes del segmento IIIS6

Para incorporar los fragmentos mutantes de V1501A, V1501S, V1501T, V1501P y V1501G ligados en pJet1.2/Blunt se utilizaron los sitios únicos de las enzimas *BstE* II y *Age* I, presentes tanto en la construcción de Cav3.1-WT (Figura 15A) como en el pJet1.2/Blunt (Figura 15B). El DNA de ambas construcciones se digirió paralelamente con *BstE* II y *Age* I, con lo que se obtuvieron fragmentos de 12341 y 463 pb de la primera (Figura 15C) y 3187 y 463 pb de la segunda (Figura 15D). Los fragmentos purificados de 12341 y el mutante de 463 pb se ligaron con 1 μ l de ligasa en las condiciones estándar ya descritas para obtener las diferentes mutantes del segmento IIIS6.

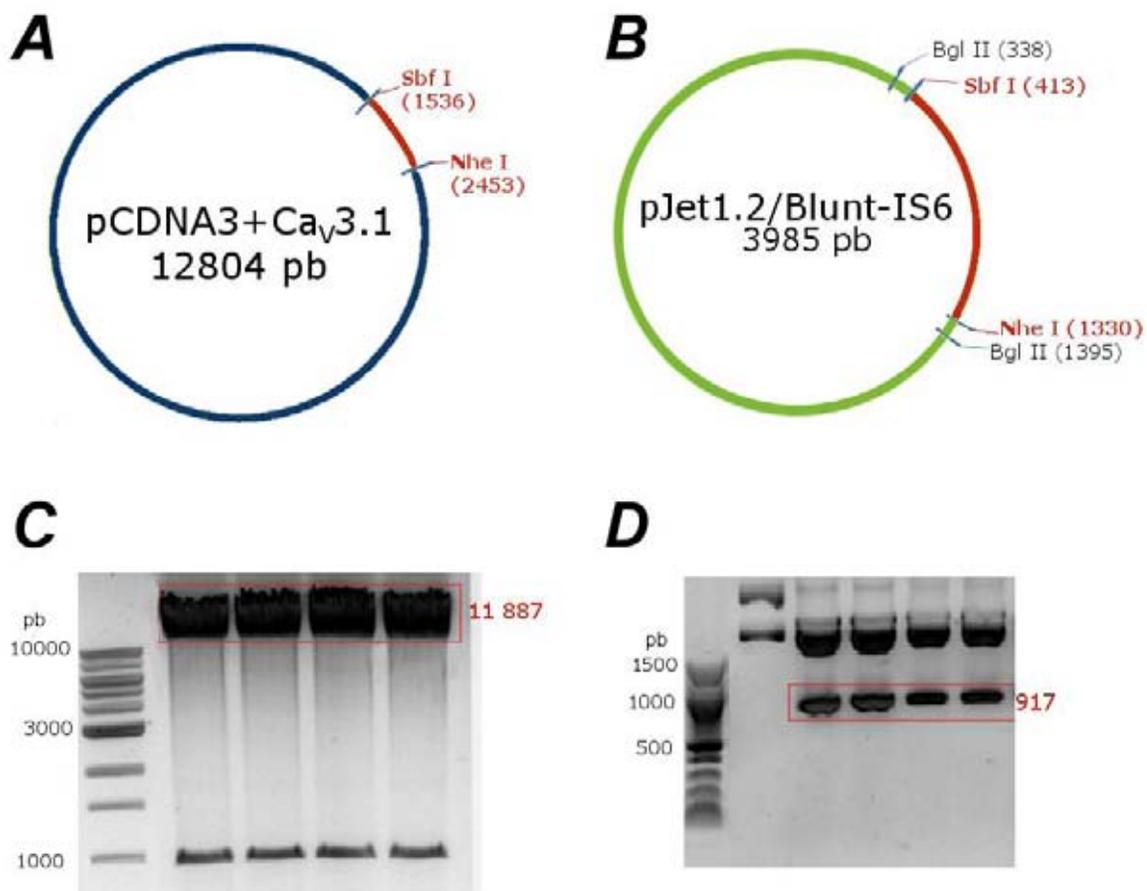


Figura 13. Estrategia para reintegrar los fragmentos mutantes del segmento IS6 al canal Cav_{3.1}-WT. **A)** El plásmido pCDNA_{3.1}+Cav_{3.1} (de 12804 pb) contiene sitios únicos de las enzimas *Sbf*I y *Nhe*I, mismos que se utilizaron para ligar el fragmento mutante. **B)** El fragmento mutante resultado de la reacción de PCR₃ se ligó en pJet1.2/Blunt en los sitios *Bgl* II; posteriormente utilizando los sitios *Sbf*I y *Nhe*I, el fragmento mutante correcto fue liberado de esta construcción para ser ligado en la construcción mostrada en **(A)** y generar así los canales Cav_{3.1} mutantes del segmento IS6. **C)** Gel de agarosa que muestra las bandas obtenidas de la digestión de pCDNA_{3.1}+Cav_{3.1} con las enzimas mencionadas; la banda recuperada fue la de 11887 pb. **D)** Gel de agarosa donde se separó y purificó la banda mutante de 917 pb. A la izquierda de ambos geles se muestran los tamaños del marcador de peso molecular en pb.

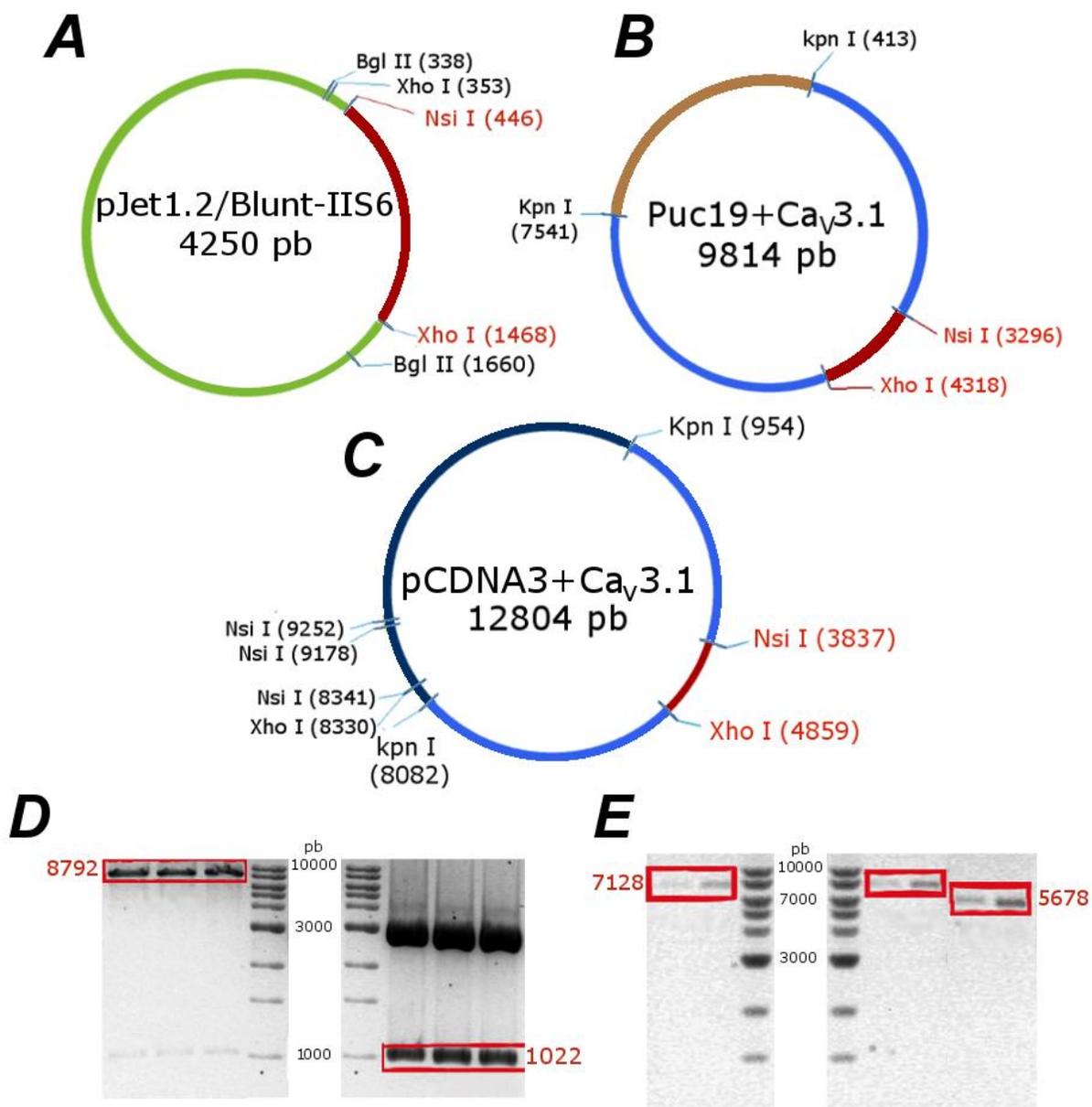


Figura 14. Estrategia para construir las mutantes del segmento IIS6 del canal Cav3.1. **A)** Las mutaciones correspondientes generadas con la PCR3 fueron ligadas en el vector de expresión pJet1.2/Blunt generando plásmidos de 4250 pb. **B)** Construcción intermedia de Cav3.1 en pUC19 (9814 pb) en la que se intercambio el fragmento Xho I - Nsi I (en rojo), del fragmento mutante de la construcción ilustrado en (A). Se muestran los sitios Kpn I que se utilizaron para ligar el DNA del canal completo (azul). **C)** La construcción final se obtuvo ligando el fragmento Kpn I-Kpn I de 7128 pb del plásmido pUC19+CaV3.1, el cual incluye ya el fragmento mutante (en rojo), con el fragmento de 5678 pb obtenido de la digestión con la misma enzima del plásmido pCDNA3+ Cav3.1. **D)** Geles de agarosa que muestran las bandas obtenidas de la primera digestión con Xho I-Nsi I de los plásmidos pUC19+CaV3.1 y pJet1.2/Blunt-IIS6. Las bandas que se recuperaron para ligarlas fueron las de 8792 y 1022 pb, respectivamente. **E)** Geles de agarosa en los que se separaron y recuperaron las bandas de 7128 pb del plásmido pUC19+CaV3.1 (mutante) y la banda de 5678 de pCDNA3.1+CaV3.1, para posteriormente ser ligados como se describe en el texto. Los tamaños del marcador de peso molecular en pb se muestran en medio de cada par de geles.

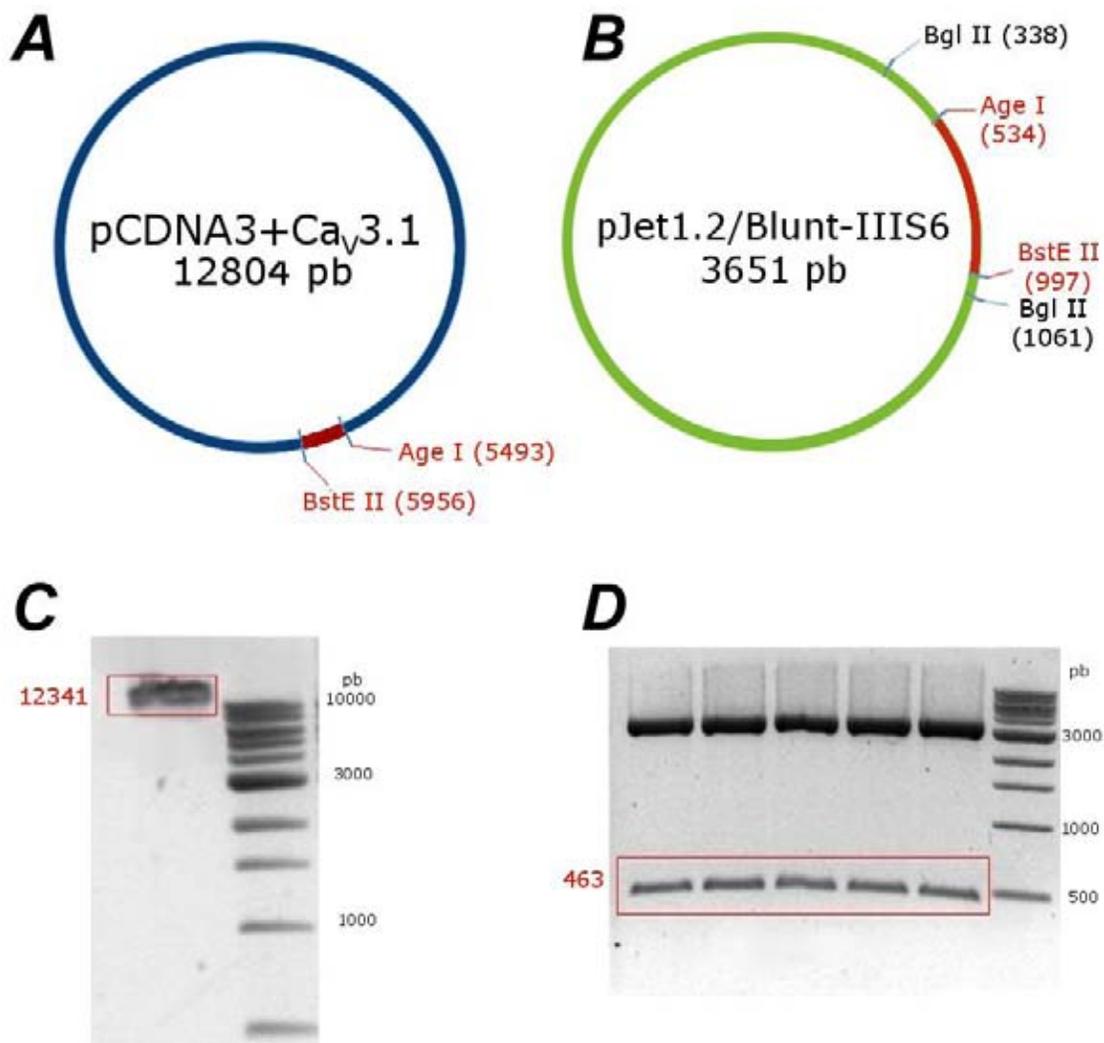


Figura 15. Estrategia para construir las mutantes del segmento IIIS6 del canal Cav3.1. **A)** Esquema de la construcción pCDNA3+Ca_v3.1 (12804 pb) mostrando los sitios únicos para las enzimas de restricción BstE II y Age I que flanquean las mutaciones a introducir en el segmento IS6. **B)** Los fragmentos mutantes (PCR3) fueron ligados en los sitios Bgl II del vector pJet1.2/Blunt. Posteriormente, el fragmento mutante correcto fue liberado de esta construcción para ser ligado en la construcción mostrada en **(A)** utilizando las enzimas de restricción que tienen sitios únicos de ambas construcciones: BstE II y Age I. **C)** Gel de agarosa donde se observa la banda de 12341 pb producto de la digestión del plásmido pCDNA3.+ Cav_{3.1} con las mencionadas enzimas. La banda remanente de 463 pb no se muestra. **D)** Gel de agarosa con los productos de las digestiones respectivas de las mutantes en pJet1.2/Blunt. La banda de 463 pb corresponde al fragmento de cada una de las mutaciones construidas en el segmento IIIS6. A la derecha de ambos gels se muestran los tamaños del marcador de peso molecular en pb.

B. Estudio de las propiedades biofísicas de los canales Cav3.1 silvestre y mutantes

La funcionalidad de las construcciones mutantes del canal Cav3.1, así como del canal silvestre fue evaluada mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana mejor conocida como *patch clamp* en la modalidad de célula completa. Para tal propósito, previamente se realizaron co-transfecciones transitorias de células HEK-293 con el cDNA de la subunidad α del canal en cuestión (mutante o silvestre) además del cDNA de la proteína verde fluorescente (GFP). La eficiencia de transfección, estimada por el porcentaje de células fluorescentes, varió entre 50 y 70% en todos los experimentos. Los registros electrofisiológicos se efectuaron después de 24 h y como máximo 72 h de haber sido iniciada la transfección.

B.1. Evaluación de la relación corriente-voltaje

Debido a que el voltaje es uno de los factores que determinan la cantidad de corriente que fluye a través de los canales, se construyeron curvas corriente-voltaje ($I-V$) de cada uno de los canales investigados. En dicha relación se representa la cantidad de corriente (pA) que fluye a determinado voltaje (mV) lo que permite obtener parámetros importantes para caracterizar al canal bajo estudio. Para realizar una cuantificación de la corriente generada por los canales se empleó el protocolo *IV-100* (ver Métodos). Este protocolo permite obtener la información de la magnitud de corriente que se activa a cada voltaje investigado, además de que proporciona información sobre la cinética de activación e inactivación de dichas corrientes. En la Figura 16 se muestran trazos de corriente de calcio representativos generados por el canal silvestre (panel A), así como los canales mutantes del segmento IS6 (panel B), IIS6 (panel C) y IIIS6 (panel D). Los registros se obtuvieron de células HEK-293 transfectadas con los canales mencionados y a las que se les aplicó el protocolo *IV-100*, aunque para fines ilustrativos solo se presentan los trazos evocados a los potenciales de -60, -50, -30, 0 y +30 mV. De manera general, todas las mutaciones estudiadas generaron corrientes más pequeñas que el canal silvestre, siendo las mutantes de prolina G882P y V1501P los casos extremos ya que estas no generaron corrientes medibles bajo las presentes condiciones experimentales ($n = 6$ y 7 células, respectivamente).

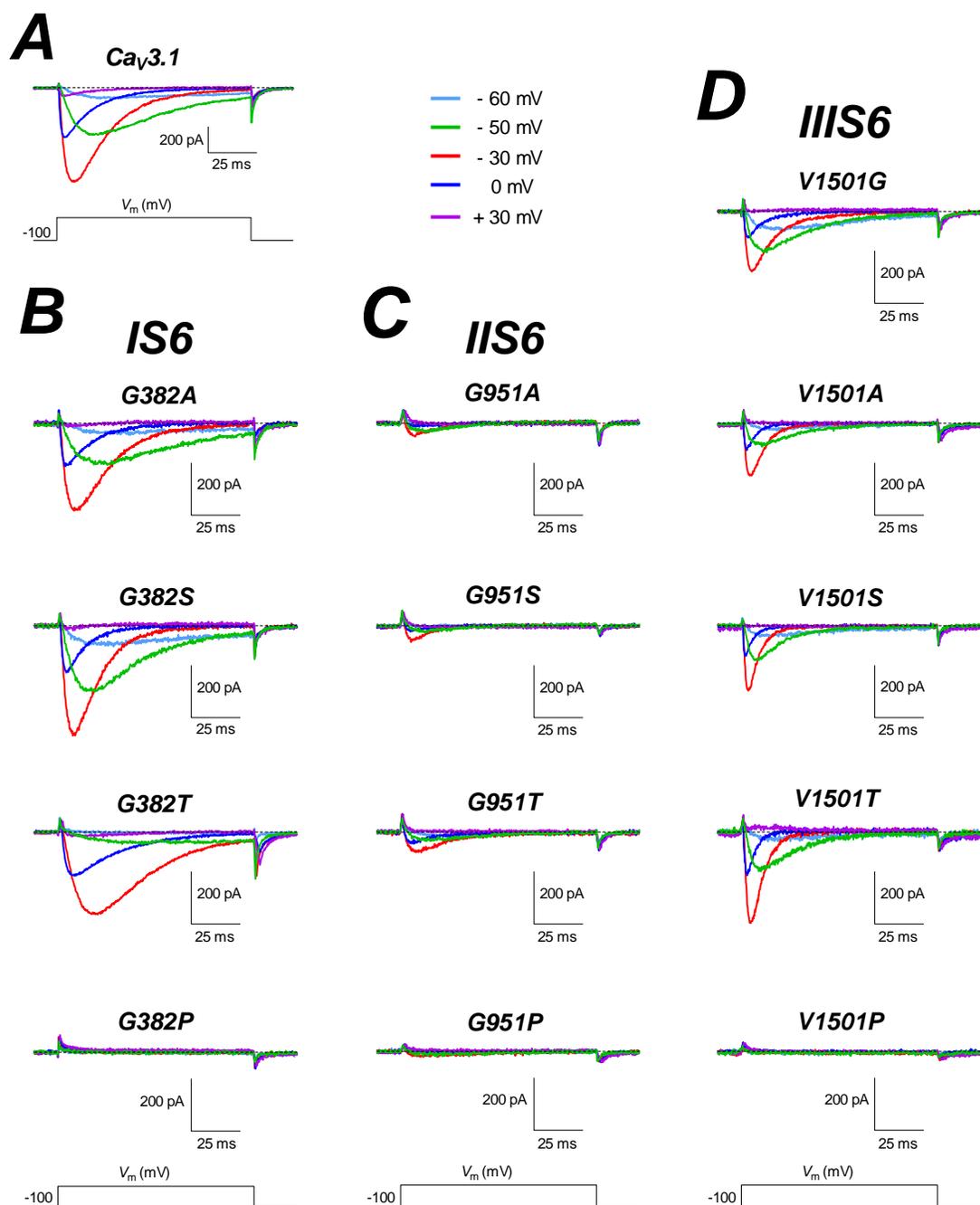


Figura 16. Ejemplos de corrientes de calcio generadas por el canal *Ca_v3.1* silvestre y mutantes. Trazos de corriente representativos obtenidos de células HEK-293 transfectadas con el canal silvestre (A), o con los canales mutantes del dominio I (B), dominio II (C) y dominio III (D). Las corrientes se obtuvieron registros en respuesta a la aplicación del protocolo IV-100, pero para fines de claridad solo se presentan aquellas evocadas a los potenciales de membrana de -60, -50, -30, 0 y +30 mV (diferenciados por los colores que se indican en la parte superior). Las mutantes G382P, G951P y V1501P no generaron corrientes detectables bajo las presentes condiciones experimentales.

Por su parte, de las 20 células investigadas con la mutante G951P, en cuatro de ellas se registraron corrientes cuya amplitud máxima fue de 20 pA (como la que se ilustra en la Figura 16C), mientras que en las 16 células restantes no se detectaron corrientes en lo absoluto. En consecuencia, los efectos de aminoácidos hidrofóbicos en sustitución de las glicinas bisagra y la valina del segmento IIS6 se estudiaron empleando las mutantes con serina y treonina, las cuales si generaron corrientes medibles en los tres segmentos estudiados.

La Figura 16 se observa también que las mutantes del dominio II (IIS6) fueron particularmente cruciales para la expresión funcional de los canales Cav3.1, ya que las corrientes generadas fueron extremadamente pequeñas, incluyendo la mutación por alanina (G951A). Este último es un resultado poco predecible, ya que las características fisicoquímicas de la alanina no modifican sustancialmente la estructura de las proteínas en α -hélice, de hecho, se espera que preserve dicha estructura (Petsko & Ringe, 2004). Esta propiedad estructural de la alanina se refleja en las corrientes generadas por las mutantes G382A y V1501A, mismas que fueron claramente de mayor amplitud que la mutación G951A.

B.1.1 Densidad de corriente y curvas I-V normalizadas

Debido a que el tamaño de la célula puede ser un factor que afecta la amplitud de la corriente, se decidió eliminar la variable del tamaño celular calculando la densidad de la corriente para cada célula estudiada. La densidad de corriente se obtuvo al dividir la amplitud de la corriente máxima a cada voltaje entre la capacitancia membranal (C_m) de la célula en cuestión. El cociente así obtenido es indicativo de la cantidad de corriente que fluye por unidad de área de la membrana (pA/pF), considerando que la capacitancia específica de la mayoría de las membranas biológicas es de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (Hille, 2001). Los valores de densidad de corriente se promediaron entre grupos de células de cada canal Cav3.1 (mutantes y WT) y se graficaron en función del voltaje para generar las curvas corriente-voltaje (I-V) que se muestran en la Figura 17. Al observar detalladamente dichas curvas se confirma que todas las mutantes disminuyeron la densidad de corriente registrada a cada voltaje en comparación con la del

canal Cav3.1-WT, siendo más evidente dicho efecto en las mutantes del segmento IIS6 (Figura 17C, Tabla 2).

Los gráficos de la Figura 17 también muestran que la corriente generada por los canales Cav3.1 se detecta a partir de -70 ó -60 mV, alcanzando un valor máximo alrededor de -30 mV y después disminuye en amplitud hasta invertir su sentido, de entrante a saliente, a un potencial cercano a los +20 mV. Para analizar con mayor detalle la dependencia al voltaje de las corrientes generadas por los canales mutantes y si ésta era diferente de la exhibida por el canal Cav3.1 silvestre, los valores de densidad de corrientes se normalizaron respecto al valor del pico de la curva $I-V$ de cada canal y los valores así obtenidos se graficaron nuevamente en función del valor de V_m respectivo para obtener las curvas $I-V$ normalizadas (Figura 17, gráficos de la derecha). Estas curvas permiten observar la dependencia al voltaje de la activación de la corriente generado por los diferentes canales sin tener en cuenta el tamaño de la corriente misma (para eso se normalizan los valores de corriente), es decir, la información relevante en este caso es la fracción de corriente que se activa a cada voltaje y a qué valor de voltaje la corriente alcanza su máxima amplitud. De esta manera se puede observar que las mutantes del dominio I (IS6) fueron las únicas que modificaron la dependencia al voltaje de la activación de la corriente, ya que el valor máximo de corriente lo alcanzaron a valores de voltaje más positivos. Dicho efecto se puede apreciar en la familia de corrientes de la Figura 17A. Ahí se aprecia que la corriente máxima observada en los registros del canal Cav3.1-WT fue evocada por el pulso de voltaje a -30 mV, mientras que a -20 mV se registro una corriente más pequeña. Por otro lado, en la mutante G382T la corriente registrada a ambos voltajes fue muy similar en amplitud, es decir, no es fácil distinguir cual de los dos voltajes evocó el pico máximo de corriente.

Para analizar de manera cuantitativa los datos de las curvas $I-V$ normalizadas, éstos fueron ajustados con funciones Boltzmann para obtener los parámetros de $V_{1/2}$, k y V_{inv} (ver Materiales y Métodos). Los valores de los parámetros obtenidos se resumen en la Tabla 2. El análisis estadístico (t de Student) de los promedios de los diferentes parámetros confirmo que las mutantes del segmento IIS6 indujeron un efecto significativo en la dependencia al

voltaje de la activación de la corriente, debido a que el $V_{1/2}$ fue de 4 a 8 mV menos negativo que el del canal silvestre (G382A, -44.7 ± 0.8 mV; G382S = -44.0 ± 0.7 mV; G382T = -40.0 ± 0.6 y Cav3.1-WT = -48.0 ± 0.4 mV).

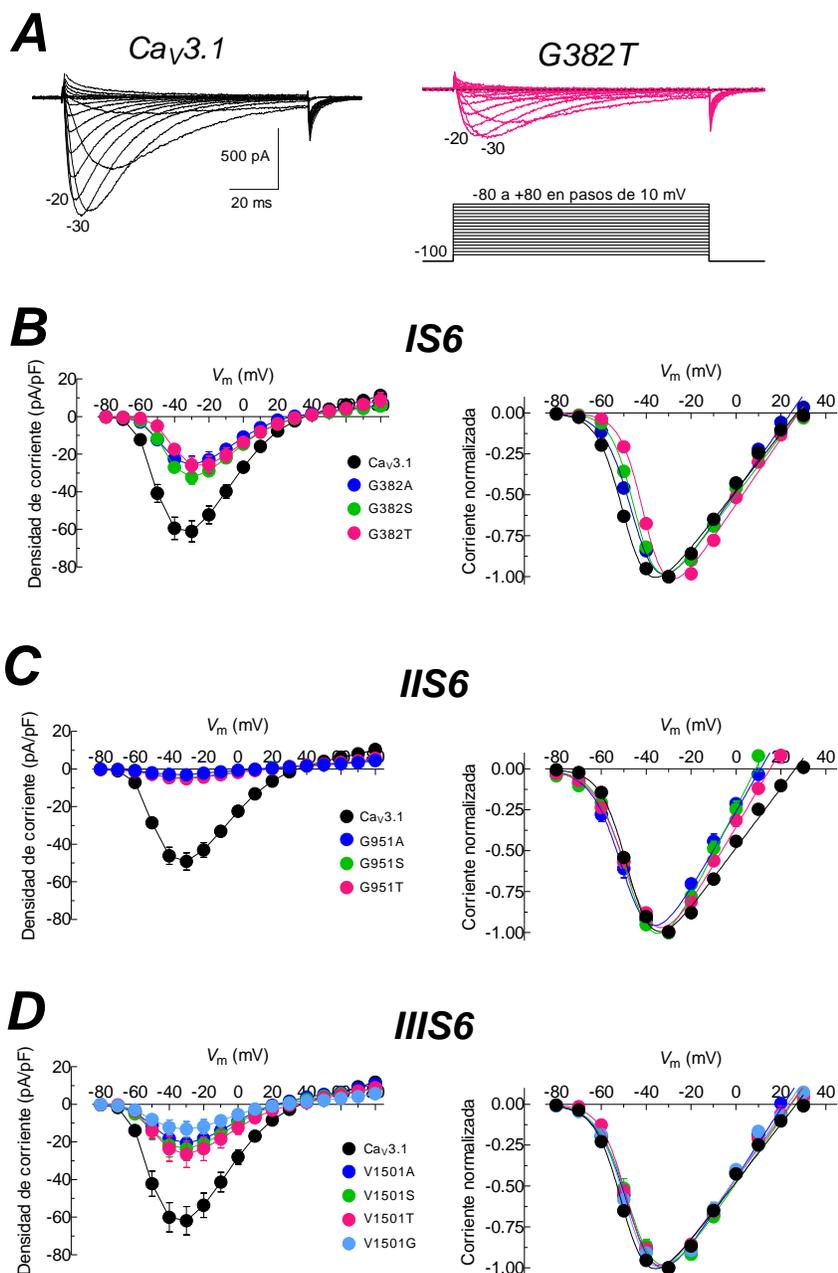


Figura 17. Curvas I-V de los canales Cav3.1. A) Familias de corrientes generadas por el canal Cav3.1 silvestre y el canal mutante G382A es respuesta al protocolo I-V100 ilustrado a la derecha. Los gráficos muestran la densidad de corriente (promedio \pm EE) en función del voltaje para los canales Cav3.1-WT y mutantes (izquierda); y sus correspondientes curvas I-V normalizadas (derecha) del segmento IS6 (B), IIS6 (C) y IIIS6 (D). Las líneas que unen los puntos experimentales en las curvas I-V normalizadas son el mejor ajuste a una función Boltzmann modificada. Los parámetros obtenidos de dichos ajustes se presentan en la Tabla 2.

Debido a que las mutantes que generaron una densidad de corriente muy pequeña (mutantes del IIS6) o más robusta (mutantes del IIS6) que el canal silvestre, no presentaron cambios significativos en los valores de $V_{1/2}$, se puede sugerir que la densidad de corriente no fue un factor que afectará la dependencia al voltaje de activación de la misma. En lo que respecta a la pendiente (k) de las curvas $I-V$ normalizadas, fueron las mutantes G951A, G951S, G951T, V1501A y V1501S las que mostraron cambios significativos con respecto al canal silvestre. En estos casos, el valor de la pendiente k fue más grande en presencia de las mutaciones mencionadas en comparación con el valor del canal Cav3.1-silvestre, lo que implica que se requirió un cambio más grande en el voltaje para activar la misma cantidad de corriente que el canal silvestre (Tabla 2).

Tabla 2. Propiedades biofísicas de la activación dependiente de voltaje y de la inactivación en el estado estacionario de los canales Cav3.1

Canal	pA/pF	Activación			Inactivación	
		$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)	V_{inv} (mV)	$V_{1/2}$ (mV)	k (mV)
Cav3.1	-57.4 ± 5.9	-48.0 ± 0.4 (106)	5.6 ± 0.1	26.9 ± 0.4	-78.3 ± 0.4 (66)	4.6 ± 0.1
G382A	-25.8 ± 4.8	-44.7 ± 0.8 (12) *	6.0 ± 0.2	24.7 ± 1.2	-78.1 ± 0.3 (12)	5.4 ± 0.2 *
G382S	-32.4 ± 3.4	-44.0 ± 0.7 (14) *	5.1 ± 0.1	27.4 ± 0.7	-77.6 ± 0.9 (9)	5.3 ± 0.3 *
G382T	-25.9 ± 4.3	-40.0 ± 0.6 (12) *	5.1 ± 0.2	27.8 ± 0.6	-75.5 ± 1.4 (8) *	5.3 ± 0.2 *
G951A	-3.0 ± 0.3	-47.4 ± 1.2 (15)	6.5 ± 0.4 *	8.8 ± 1.9 *	-86.3 ± 1.2 (15) *	8.4 ± 0.6 *
G951S	-4.7 ± 0.8	-47.1 ± 0.7 (13)	6.3 ± 0.4 *	12.2 ± 2.6 *	-89.2 ± 0.7 (9) *	7.4 ± 0.3 *
G951T	-5.1 ± 0.6	-46.4 ± 0.7 (15)	7.0 ± 0.2 *	16.4 ± 1.8 *	-87.2 ± 0.7 (9) *	8.2 ± 0.4 *
V1501A	-20.7 ± 2.7	-45.9 ± 0.7 (12)	6.8 ± 0.3 *	21.7 ± 1.2 *	-83.3 ± 1.0 (11) *	5.1 ± 0.1 *
V1501S	-23.6 ± 6.3	-45.7 ± 1.6 (11)	6.4 ± 0.2 *	24.4 ± 1.2	-83.5 ± 0.9 (9) *	5.2 ± 0.5
V1501T	-26.5 ± 7.0	-46.8 ± 0.8 (12)	5.6 ± 0.2	25.3 ± 2.4	-83.7 ± 0.8 (8) *	5.6 ± 0.3 *
V1501G	-13.2 ± 4.2	-47.3 ± 0.8 (6)	6.3 ± 0.2	23.2 ± 1.6 *	-83.6 ± 1.5 (7) *	5.3 ± 0.2 *

Se presentan los valores (media ± error estándar) de los parámetros biofísicos indicados para los canales Cav3.1 silvestre y las mutantes de éste. La densidad de corriente (en pA/pF) se obtuvo del pico de la corriente $I-V$, el cual invariablemente fue -30 mV. Los parámetros de activación, $V_{1/2}$ y k , así como el V_{inv} son el promedio de los ajustes individuales de la relación $I-V$ de cada célula con una función Boltzmann modificada (ver Materiales y Métodos). El $V_{1/2}$ y la k de la inactivación en estado estacionario provienen del ajuste de los datos experimentales obtenidos al aplicar el protocolo *Hinf105-100* en cada célula estudiada y ajustados con la ecuación de Boltzmann (ver Materiales y Métodos). Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores del control (Cav3.1) se muestran con (*), $p < 0.05$. El número de células para cada condición se muestra entre paréntesis.

El tercer parámetro obtenido a partir de los ajustes con funciones de Boltzmann fue el potencial al cual se invierte la corriente transportada por los canales $Ca_v3.1$, el V_{inv} . En las curvas $I-V$ normalizadas de la Figura 17 se nota que las tres mutantes del segmento IIS6 (G951A, G951S, G951T), así como las mutantes V1501A y V1501G del IIS6 exhibieron corrientes salientes a voltajes más negativos que el canal silvestre. El valor de V_{inv} del canal silvestre fue cercano a los +27 mV, mientras que el de las mutantes varió entre +9 mV en G951A y +23 mV en V1501G (Tabla 2).

B.2. Inactivación en el estado estacionario

Para evaluar el efecto de las mutaciones en dependencia al voltaje de la inactivación de los canales $Ca_v3.1$ se utilizó el protocolo llamado *Hinf10s-100* (véase métodos), el cual permita evaluar la fracción de canales que se inactiva conforme el potencial de membrana es despolarizado. En la Figura 18A se muestran trazos de corriente obtenidos a -30 mV después de la aplicación de prepulsos de larga duración a -110, -90, -80 y -85 mV en una célula HEK-293 transfectada con el canal silvestre y otra con la mutante G951A. Los prepulsos a los voltajes indicados son de 10 s de duración con la finalidad de promover la transición al estado inactivado de todos los canales que se tengan que inactivar a dichos voltajes, por lo que los resultados hacen referencia a la inactivación en el estado estacionario (IEE). En otras palabras, sin importar que se alargue más el prepulso, la cantidad de canales inactivados ya no cambiará a cada uno de los voltajes explorados. En los trazos se observa claramente que la amplitud de la corriente a -80 mV en el canal silvestre se ve disminuida en ~10% en comparación con el pico a -110 mV, en contraste, en la mutante G951A la corriente registrada después del mismo voltaje mostro una disminución de ~80%, nuevamente respecto al pico de -110 mV. Esto indica que los canales de la mutante G951A se inactivan a voltajes más negativos en comparación con el canal silvestre.

Los valores de corriente obtenidos durante el pulso de prueba a -30 mV se normalizaron respecto al valor máximo y se graficaron en función del valor del voltaje del prepulso respectivo. En los paneles B, C y D de la Figura 18 se presentan los gráficos obtenidos al

ajustar dichos datos con una función Boltzmann (ver Materiales y Métodos), mismas que reciben el nombre de curvas de inactivación en el estado estacionario. El efecto de la mutante G951A se manifestó como un desplazamiento de la curva de inactivación hacia voltajes más negativos (Figura 18C). El mismo comportamiento se observó con las otras dos mutantes del segmento IIS6. En promedio, el voltaje al cual se inactiva el 50% de los canales ($V_{1/2}$) fue 10 mV más negativo en tales mutantes en comparación con el canal $Ca_v3.1$ silvestre (Tabla 2).

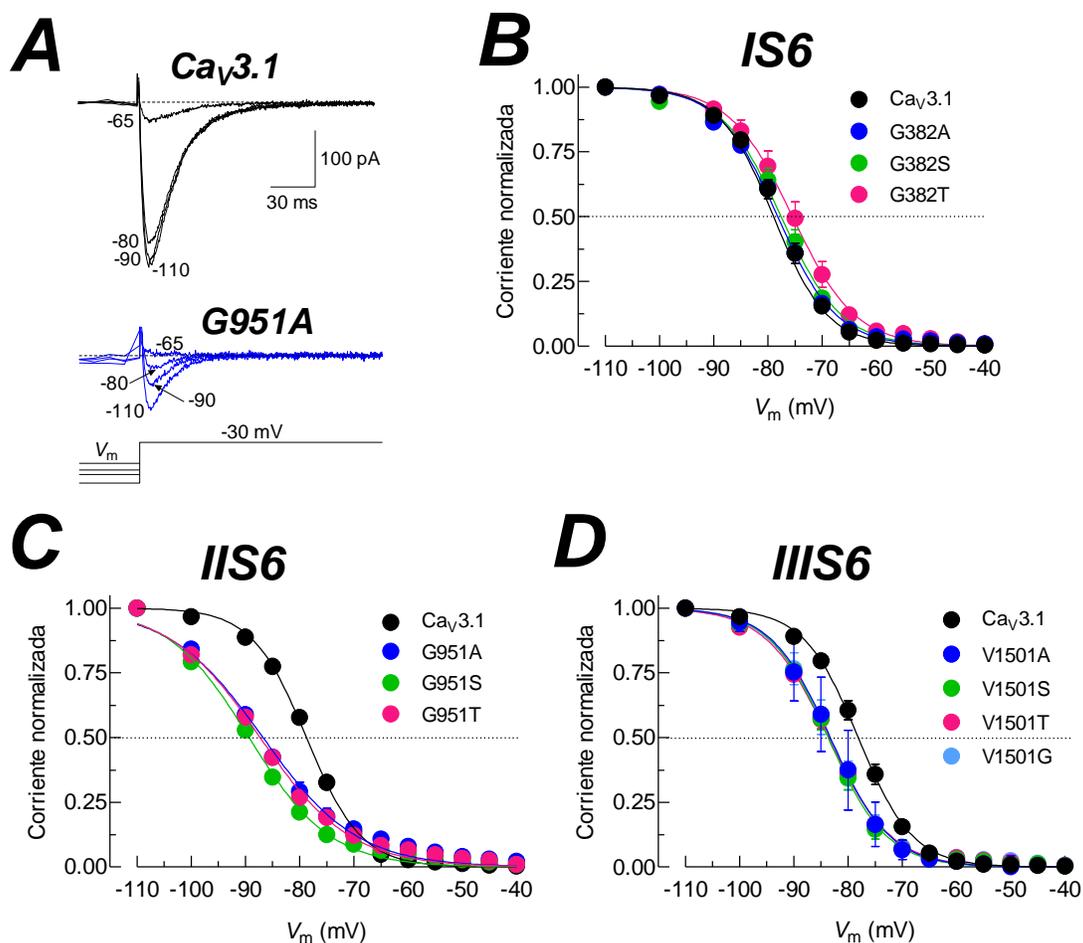


Figura 18. Inactivación en el estado estacionario de los canales $Ca_v3.1$. A) Trazos de corriente representativos del canal silvestre y la mutante G951A obtenidos en respuesta al protocolo *Hinf10s-100*, parte del cual se ilustra al pie del panel. Para fines comparativos solo se muestran las corrientes a -30 mV generadas después de los prepulsos de 10 s de duración a -110, -90, -80 y -85 mV. Nótese que la fracción de corriente disponible después del prepulso a -80 mV es drásticamente reducida en la mutante comparada con el canal silvestre. Curvas de inactivación en el estado estacionario para los canales $Ca_v3.1$ mutantes del dominio I (B), dominio II (C) y dominio III (D). Los gráficos muestran en el eje de las ordenadas la fracción de canales disponibles para ser activados a -30 mV en función del voltaje del prepulso de 10 s de duración. Los datos experimentales se ajustaron con la ecuación de Boltzmann (líneas continuas). Los parámetros de $V_{1/2}$ y k respectivos se muestran en la Tabla 2.

Los canales mutantes del segmento IIS6 también indujeron un desplazamiento de la curva de inactivación con respecto al canal silvestre, aunque en este caso la dependencia al voltaje se desplazó sólo 5 mV en la misma dirección (Figura 18D, Tabla 2).

Por último, solo la mutante de treonina del segmento IS6 (G382T) presentó un valor de $V_{1/2}$ estadísticamente diferente con respecto al canal silvestre (Tabla 2). Aunque en este caso la variación fue muy discreta (~ 3 mV), es de resaltar que el desplazamiento de la curva fue hacia voltajes más positivos con respecto al canal silvestre, es decir, la presencia de una treonina en lugar de la glicina en el segmento IIS6 confiere una mayor estabilidad al canal en los estados cerrado y abierto, ya que requiere despolarizaciones más fuertes para transitar al estado inactivado (Figura 18B). Esta propiedad de la mutante G382T se manifestó también en aspectos cinéticos de la corriente que genera, los cuales serán revisados más adelante.

En cuanto a los valores de la pendiente de las curvas de IEE (k), sin excepción todas las mutaciones investigadas en el presente trabajo de tesis presentaron diferencias significativas con respecto a la del canal silvestre (Tabla 2). Nuevamente las mutantes G951A, G951S, G951T exhibieron los efectos más drásticos al aumentar el valor de k entre 60 y 83% en relación con el del canal $Ca_v3.1$ -WT (de 4.6 ± 0.1 mV en este último, a 8.4 ± 0.6 mV, 7.4 ± 0.3 mV y 8.2 ± 0.4 mV en las mutantes mencionadas). Los cambios en el resto de las mutantes fue considerablemente más discretos (20% como máximo en el caso de V1501T) (Tabla 2).

B.3. Aspectos cinéticos de las corrientes generadas por los canales $Ca_v3.1$

B.3.1. Curso temporal de la activación e inactivación

Un posible efecto indicador de la participación de las glicinas y la valina estudiadas en el presente trabajo de tesis, como aminoácidos bisagra que participan en la apertura y cierre del canal, es la cinética de activación y en menor grado la de inactivación de las corrientes generadas por el canal $Ca_v3.1$. Para evaluar tal posibilidad los trazos de corriente obtenidos a partir del protocolo IV-100 (como los ilustrados en la Figura 17A), fueron ajustados con dos exponenciales, una correspondiente a la activación y otro para la inactivación, tal como se

muestra en la Figura 19A. La constante de tiempo (τ , tau) obtenida de cada exponencial se promedió entre grupos de células de cada una de las construcciones investigadas, incluyendo el canal Cav3.1 silvestre, y se graficaron en función del voltaje respectivo (Figura 19B, C y D).

En los 6 gráficos de la Figura 19 se aprecia la característica distintiva de la cinética de las corrientes generadas por los canales de la subfamilia Cav3, es decir, su marcada dependencia al voltaje, sobre todo a voltajes negativos, y una ausencia de ésta a valores más positivos que -20 mV. En otras palabras, a voltajes entre -60 y -20 mV la constante de tiempo se hace más rápida conforme el valor de V_m es más positivo, mientras que a potenciales más despolarizados que -20 mV la constante de tiempo se vuelve independiente del voltaje y se mantiene en un valor muy constante. En cuanto a los efectos debidos a las mutaciones, los resultados de la Figura 19 muestran que, con la excepción de la mutante G382T, la cinética de activación e inactivación se aceleró en mayor o menor grado con cualquiera de las mutaciones realizadas en los segmentos S6 aquí estudiados (Tabla 3). En particular, las constantes de tiempo de la activación de las mutantes del dominio IIS6 y IIIS6 se aceleraron significativamente en el intervalo de voltajes entre -60 y -30 mV (Figura 19 paneles C y D, gráficos de la izquierda), sin embargo a voltajes más positivos que -20 mV no se detectaron diferencias en los valores de tau. Los cambios en las constantes de tiempo asociadas al proceso de inactivación, por el contrario, fueron apreciables en prácticamente todo el intervalo de voltajes que se muestra en los gráficos (Figura 19B, C y D). De hecho, la inactivación presentó cambios más drásticos que la activación de la corriente; por ejemplo, las mutantes V1501S y V1501T exhibieron corrientes que se inactivaron hasta tres veces más rápidamente que el canal silvestre (Tabla 3).

Por el contrario, la mutación G382T generó las corrientes más lentas de todos los canales investigados en el presente trabajo. En la Figura 20 se aprecia que los valores de tau de la activación así como de la inactivación son más grandes (círculos rosas) que los del canal silvestre (círculos negros).

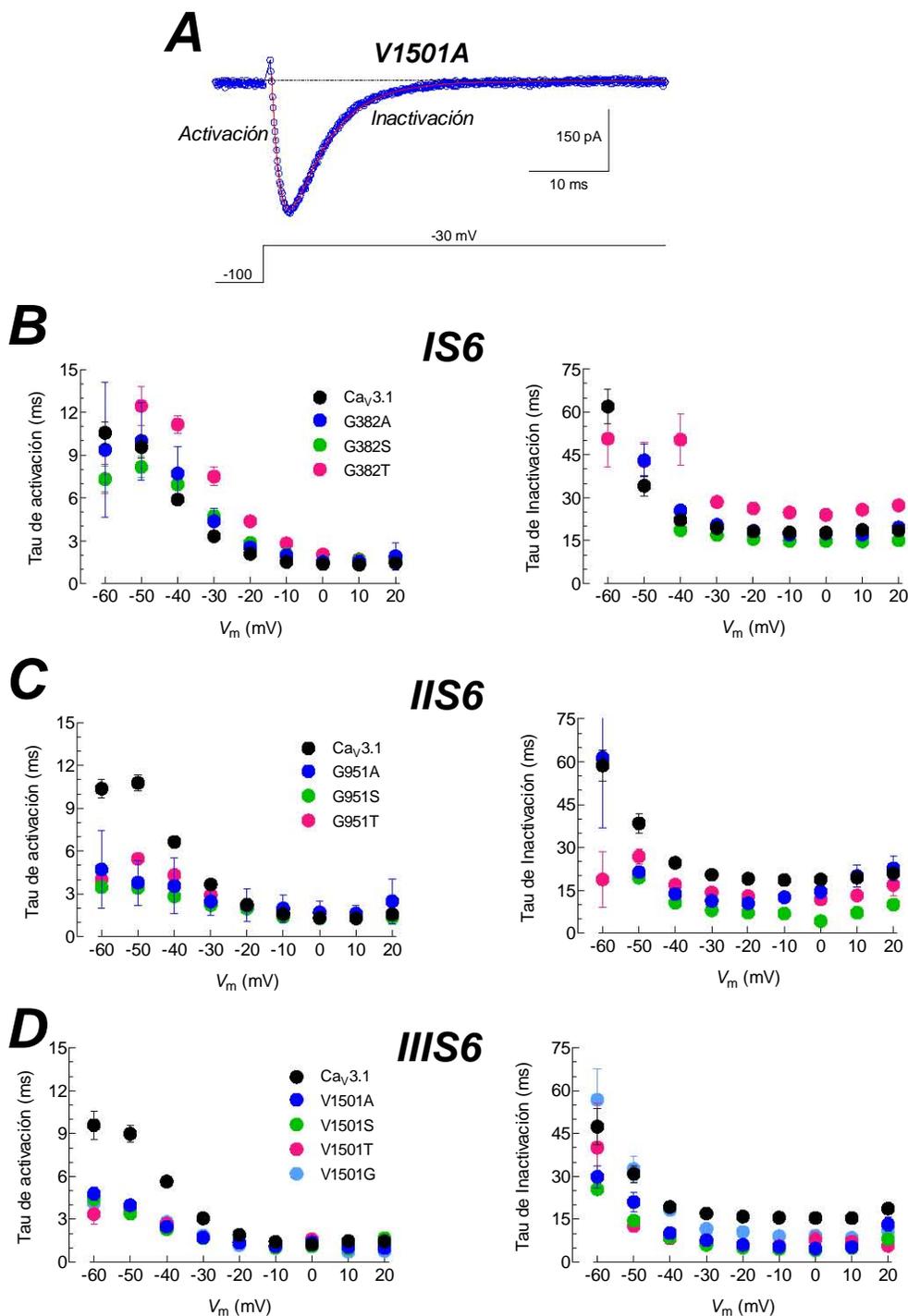


Figura 19. Cinética de activación e inactivación de los canales $Ca_v3.1$ silvestre y mutantes. A) Trazo de corriente representativo de la mutación V1501A evocado por una despolarización a -30 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -100 mV. La señal de corriente ilustrada con círculos azules fue muestreada cada 100 μ s y se ajustó con dos funciones exponenciales, una para activación y otra para inactivación (línea roja). Las constantes de tiempo (tau) de activación e inactivación obtenidas con tales ajustes se grafican en función del voltaje para las mutantes del segmento IS6 (B), IIS6 (C) y IIIS6 (D). Los datos son el promedio \pm EE, cuyos valores a -80 mV se presentan en la Tabla 3.

El enlentecimiento de la activación se puede atribuir en parte al corrimiento de la curva *I-V* hacia voltajes más positivos de la mutante G382T observado en la Figura 17B, ya que si los valores de la tau se recorren (ajustan) 10 mV hacia voltajes más negativos, eliminando así el efecto en la dependencia al voltaje de la activación de la corriente de la mutante G382T, se observa que las constantes de tiempo de activación ahora son prácticamente las mismas que las del canal silvestre (Figura 20A). Por el contrario, la misma maniobra con los valores de la tau de inactivación muestran que el enlentecimiento observado previamente en la Figura 19B se mantiene al eliminar el factor atribuible al corrimiento de la curva *I-V* (Figura 20B). Es decir, la mutación G382T confiere un enlentecimiento en el curso temporal de la inactivación del canal $Ca_v3.1$ independientemente del efecto sobre la dependencia al voltaje de la activación de dicha mutante. Esta observación es consistente con la IEE a voltajes más positivos, en comparación con el canal silvestre, descrita para esta mutante en la Figura 18B. Con fundamentos similares, la aceleración de la inactivación de las mutantes de los segmentos IIS6 y IIIS6 (Figura 19C y D) están en concordancia con la IEE a potenciales más negativos (Figura 18C y D).

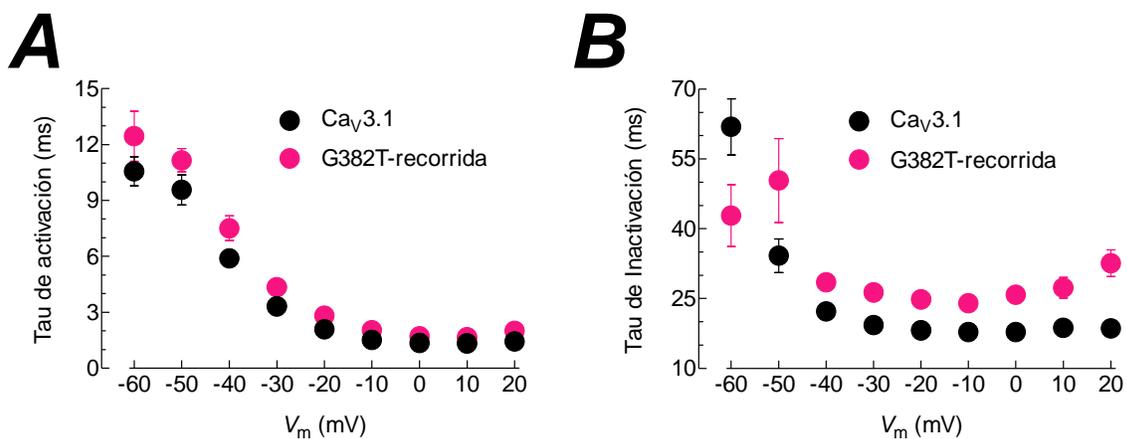


Figura 20. Eliminación del factor asociado a la dependencia de voltaje del efecto sobre la cinética de las corrientes de la mutante G882T. Mismos datos de la Figura 19B para el canal $Ca_v3.1$ silvestre y la mutante G882T. La diferencia radica en que los valores de tau de la activación (A) y la inactivación (B) de la mutante se presentan recorridos 10 mV hacia la izquierda en el eje de las abscisas (V_m) con el propósito de eliminar el efecto observado sobre la curva *I-V* de dicha mutante (ver Figura 17B). Por ejemplo, la tau de activación correspondiente a -20 mV del canal mutante se graficó en esta figura en la coordenada de -30 mV. Además, se agregaron los valores de tau a +30 mV de la mutante (en el grafico se muestra a +20 mV) para que todos los valores de V_m tengan su dato de tau correspondiente. Los valores de tau del canal silvestre no sufrieron ninguna modificación. Nótese que únicamente la cinética de inactivación fue verdaderamente enlentecida al intercambiar la glicina del segmento IS6 por una treonina.

Tabla 3. Comparación de las propiedades cinéticas de los canales Cav3.1 silvestre y mutantes

Canal	τ_{act} (ms)	τ_{inact} (ms)	τ_{desac} (ms)	τ_h (ms)
Cav3.1	3.4 ± 0.1 (106)	18.9 ± 0.7	3.32 ± 0.17 (94)	129 ± 4 (73)
G382A	4.4 ± 0.9 (12) *	20.5 ± 1.1	2.56 ± 0.10 (8)	158 ± 5 (11) *
G382S	4.7 ± 0.5 (14) *	17.0 ± 0.8	1.48 ± 0.13 (14) *	237 ± 15 (12) *
G382T	7.5 ± 0.7 (12) *	28.5 ± 1.9 *	2.65 ± 0.15 (10)	287 ± 13 (10) *
G951A	2.5 ± 0.9 (15) *	11.3 ± 0.6 *	2.39 ± 0.12 (13) *	227 ± 24 (11) *
G951S	2.2 ± 0.1 (13) *	7.9 ± 0.5 *	1.35 ± 0.05 (10) *	194 ± 17 (7) *
G951T	2.9 ± 0.1 (15)	14.2 ± 0.6 *	2.67 ± 0.08 (16)	209 ± 10 (11) *
V1501A	1.7 ± 0.1 (12) *	7.7 ± 0.4 *	1.87 ± 0.09 (10) *	164 ± 15 (11) *
V1501S	1.7 ± 0.1 (11) *	6.1 ± 0.4 *	1.50 ± 0.07 (9) *	223 ± 14 (11) *
V1501T	1.7 ± 0.1 (12) *	6.6 ± 0.4 *	1.33 ± 0.08 (10) *	174 ± 15 (8) *
V1501G	1.9 ± 0.1 (7) *	11.6 ± 0.5 *	2.71 ± 0.25 (7)	113 ± 7 (7)

Los valores son el promedio ± error estándar, con el número de células para cada condición indicado entre paréntesis. Las constantes de tiempo (τ) de activación e inactivación se obtuvieron a partir del ajuste con dos exponenciales de los trazos de corriente obtenidos a diferentes voltajes (protocolo IV); sólo se presentan los datos obtenidos a -30 mV. Las constantes de tiempo de desactivación (τ_{desact}) provienen del ajuste de las colas de corriente generadas mediante el protocolo IIV con una función exponencial; solo se presenta el valor de la tau a -100 mV. La tau de recuperación de la inactivación (τ_h) se obtuvo del ajuste con una función exponencial de los valores de la corriente recuperada en función del tiempo a -100 mV (protocolo Recovery). Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con (*), $p < 0.05$.

B.3.2. Recuperación de la inactivación

Otra característica cinética de las corrientes generadas por los canales Cav3 es el tiempo que requieren para recuperarse después de una despolarización, es decir, la velocidad con la que transitan del estado inactivado al estado cerrado (en reposo) de tal manera que el canal este nuevamente en posibilidad de ser activado por una segunda despolarización. Esta propiedad se denomina recuperación de la inactivación y en el presente trabajo se exploró utilizando el protocolo de voltaje Recovery-100. Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 21. En el panel A se ilustra una serie de trazos representativos de las corrientes de la mutante G382A registradas en respuesta a dicho protocolo. Se observa claramente que la amplitud del segundo pulso a -30 mV se incrementa en función del tiempo entre el primero y el segundo pulso, demandando hasta 2 s para alcanzar la misma magnitud de corriente que se genera

durante el primer pulso a -30 mV. La amplitud de la corriente registrada en respuesta al segundo pulso se normalizó respecto a la del primero, se promedió entre grupos de células expresando la misma mutante y se graficó en función del tiempo que separó los dos pulsos a -30 mV (Figura 21B, C y D). Las líneas continuas en dichos gráficos representan el mejor ajuste de cada grupo de datos con funciones exponenciales simples, mismas que proporcionaron la constante de tiempo de recuperación de la inactivación (τ_h) para cada canal Cav3.1. En promedio la población de canales silvestres requiere aproximadamente 650 ms para recuperarse por completo de la inactivación ($\tau_h = 129 \pm 4$ ms, $n = 94$; Tabla 3). Solo la mutante del segmento IIIS6, la V1501G, presento una cinética de recuperación ligeramente más rápida que el canal silvestre ($\tau_h = 113 \pm 7$ ms, $n = 7$), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. El resto de las mutantes presentaron un curso temporal de recuperación de la inactivación más lento que el canal silvestre (Figura 21B, C y D). Destacando nuevamente la mutante G382T (panel B) por presentar la constante de recuperación más lenta ($\tau_h = 287 \pm 13$ ms, $n = 10$), es decir, estos canales requieren 1.5 s (casi tres veces más tiempo que el canal silvestre) para transitar del estado inactivado al estado cerrado en reposo y estar disponibles para ser activados nuevamente. Esta observación también es consistente con las características de inactivación en el estado estacionario y lenta inactivación de esta mutante (Figuras 18 y 20).

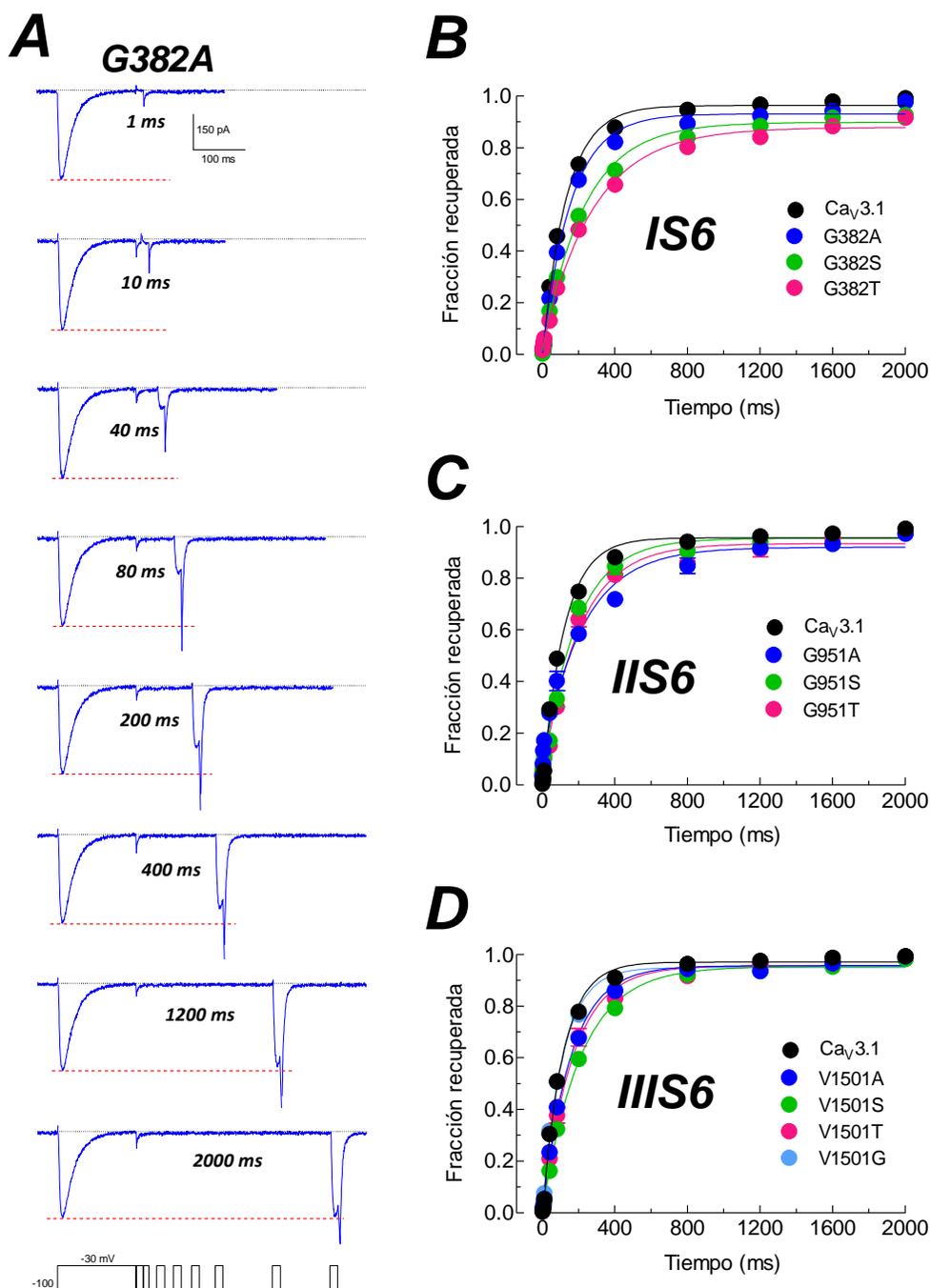


Figura 21. Recuperación de la inactivación. **A)** Trazos representativos de corrientes de calcio generadas por la mutante G382A en respuesta a la aplicación del protocolo *Recover₁₀₀* ilustrado al pie de la figura. Los pulsos a -30 mV fueron espaciados por periodos de tiempo desde 1 hasta 2000 ms. Nótese que la corriente del segundo pulso aumenta (recuperación) conforme transcurre más tiempo entre ambos pulsos. La amplitud de corriente del segundo pulso se normalizó respecto a la del primero y se grafica en función del intervalo de tiempo entre los dos pulsos para cada una de las mutantes del segmento IS6 (**B**), IIS6 (**C**) y IIIS6 (**D**). Los datos son el promedio \pm EE. Las líneas continuas representan el ajuste de los datos experimentales con una función exponencial simple. Los valores de las taus de recuperación (τ_h) se presentan en la Tabla 3.

B.4. Efectos de las mutaciones de los segmentos S6 en el cierre del canal $Ca_v3.1$

Además de la cinética de activación del canal, el curso temporal con el que se cierra un canal es indicativo del funcionamiento de la compuerta de activación y por lo tanto es un parámetro en el que se puede evaluar directamente la contribución de las mutaciones investigadas en el presente trabajo de tesis al funcionamiento de dicha compuerta. El cierre del canal se investigó mediante las colas de corriente que se generaron en respuesta a la aplicación del protocolo *IIV2ms60-2ch*. Este protocolo (ilustrado al pie de la Figura 22A) consiste de una despolarización breve de 2 ms a +60 mV, el cual resulta en la activación de prácticamente todos los canales $Ca_v3.1$ presentes en la célula en estudio. No obstante lo anterior, la corriente que se genera por este prepulso es casi imperceptible, ya que el potencial de +60 mV es muy cercano al potencial de inversión de la corriente bajo estudio, por lo que no existe una fuerza impulsora significativa que mueva a los iones a través de los canales abiertos por la despolarización. La segunda parte del protocolo, es decir, la serie de pulsos que repolariza el potencial de la membrana a voltajes tan negativos como -120 y hasta +40 mV en pasos de 10 mV, es la que evoca las colas de corriente, mismas que se generan por la conducción transitoria de corriente de todos los canales que se abrieron durante el prepulso a +60 mV. Como se observa en la Figura 22A, conforme la repolarización se hace a voltajes más positivos la amplitud de la cola de corriente disminuye proporcionalmente. Lo anterior se debe a que la fuerza impulsora para la entrada de calcio es más grande conforme el potencial se aleja de su V_{inv} , el cual como ya se mostró en la Figura 17 es cercano a +30 mV. Posterior al pico de la cola de corriente, sucede el decaimiento de la misma, lo cual obedece al cierre de los canales a cada uno de los voltajes explorados. Una primera observación de las colas de corriente del canal silvestre y la mutante G382S ilustradas en la Figura 22A, permiten inferir que el curso temporal es más rápido para el cierre de los canales de esta última. Debido a que el tamaño de las colas de corriente es proporcional al número de canales activados con el prepulso a +60 mV, el pequeño tamaño de las generadas por la mutante es consecuente con la baja densidad de corriente exhibida por las células transfectadas con esta mutante (Tabla 2). De cualquier manera, la magnitud de las colas de corriente en este caso es irrelevante; de hecho, la información sustancial se encuentra en la cinética de la misma, por lo que los trazos de corriente obtenidos al repolarizar la membrana a -100 mV fueron normalizadas respecto a la

amplitud y la comparación se presenta en la Figura 22B. Es evidente que el cierre del canal de la mutante G382S es significativamente más rápido que el del canal silvestre.

Para cuantificar los cambios en la cinética de las colas de corriente inducidas por las mutantes, cada una de ellas se ajustó con una función exponencial simple para obtener la constante de tiempo de desactivación o cierre del canal. Los datos se promediaron entre los diferentes grupos de canales y se graficaron en función del potencial de repolarización. En la Figura 22C, D y E se presenta el resumen de dicho análisis. Únicamente se presentan los datos para el intervalo de voltajes comprendido entre -120 y -80 mV, ya que a voltajes más positivos las colas de corriente presentan un componente asociado a la inactivación de canales (Serrano et al., 1999). Sin excepción, en todas las mutaciones estudiadas se presentó una aceleración del curso temporal de cierre de los canales $Ca_v3.1$; las mutaciones por serina presentaron las cinéticas más rápidas (círculos verdes), mientras que las sustituciones por alanina indujeron una aceleración más discreta del cierre del canal (círculos azul rey). Interesantemente, la mutación de la valina del segmento IIIS6 por una glicina (V1501G) produjo solo ligeros cambios en el curso temporal del cierre de los canales $Ca_v3.1$ (Fig. 22E, círculos azul claro), los cuales no fueron significativos a -100 mV (Tabla 3). La diferencia que se observa a -90 y -80 mV con respecto al canal silvestre, podría explicarse al menos en parte al corrimiento de la curva de IEE de 5 mV ya discutida de esta mutante (Tabla 2). Estos resultados permiten sugerir que los tres aminoácidos mutados en el presente trabajo de tesis tienen implicaciones en el funcionamiento de la compuerta de activación, ya que la sustitución de cualquiera de ellos por aminoácidos que preservan la estructura α -hélice de las proteínas (como alanina, e incluso glicina en el caso del segmento IIIS6), o por otros cuyas propiedades hidrofóbicas pueden alterar dichas estructuras (serina y treonina), aceleraron el curso temporal con el que los canales $Ca_v3.1$ se cierran.

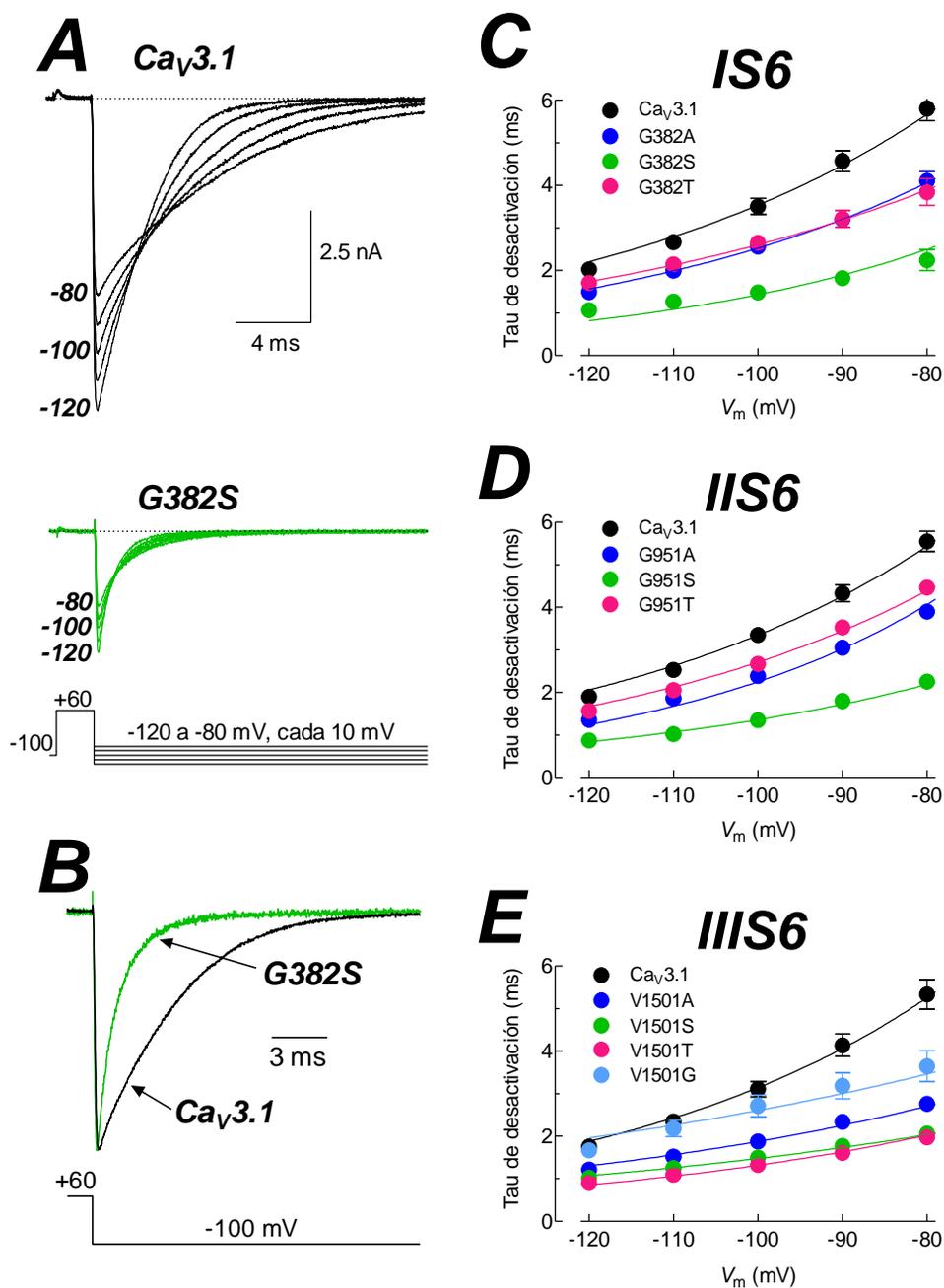


Figura 22. Cinética de desactivación de los canales $Ca_v3.1$ y las mutantes de los segmentos IS6, IIS6 y IIIS6. **A)** Colas de corriente representativas de los canales $Ca_v3.1$ -WT y la mutante G382S. Las señales de corriente fueron evocadas con el protocolo *IIV2ms60-2ch*, mismo que se ilustra al pie del panel. Para mayor claridad, únicamente se presentan las colas de corriente generadas por la repolarización del V_m a -120, -110, -100, -90 y -80 mV. Asimismo solo se grafican 17.66 ms de los 40 que dura cada uno de las repolarizaciones. **B)** Comparación de las colas de corriente obtenidas a -100 mV del canal silvestre (trazo negro) y de la mutante G382S (trazo verde). El trazo de corriente del canal mutante se multiplicó por 2.64 para que la amplitud máxima de la cola de corriente fuera de la misma magnitud que la del canal silvestre. Las constantes de tiempo (promedio \pm EE) de las colas de corriente en función del V_m de repolarización se presentan para los canales indicados de los segmentos IS6 (**C**), IIS6 (**D**) y IIIS6 (**E**). Los valores de las taus de desactivación (τ_{desac}) respectivas se presentan en la Tabla 3.

8. DISCUSIÓN

La obtención de la estructura cristalográfica del canal de potasio MthK (Jiang *et al.*, 2002b) fue el estudio precursor que permitió obtener evidencias acerca el mecanismo de activación de los canales activados por voltaje, así como los elementos estructurales involucrados en el proceso de apertura y cierre de los mismos. El descubrimiento de que una glicina altamente conservada en uno de los segmentos transmembranales que delinear la pared del poro de conducción (M2 en canales de bacterias y S6 en células eucariotas), es crucial para la torsión de la α -hélice de este segmento, evento que origina la apertura del canal, permitiendo así el flujo de iones a través del poro del canal. Debido a esta función de permitir la apertura y cierre del canal, a este aminoácido se designó con el nombre de glicina “bisagra”. Posteriormente, en estudios de mutagénesis se ha demostrado que la glicina correspondiente en el canal de sodio activado por voltaje NaChBac funciona como “bisagra” de la compuerta del canal (Zhao *et al.*, 2004). Sin embargo, en canales de células eucariotas el papel de las glicinas bisagra parece ser menos determinante ya que se ha mostrado la contribución de otros aminoácidos del segmento S6, particularmente una secuencia Pro-X-Pro conservada en algunos canales de potasio (Ding *et al.*, 2005; Raybaud *et al.*, 2006; Hardman *et al.*, 2007). A la fecha existe escasa información del papel de las glicinas bisagra en el mecanismo de apertura y cierre de canales Ca_v (Hohaus *et al.*, 2005; Kudrnac *et al.*, 2009), así como tampoco de los canales de calcio tipo T y de los Na_v de mamíferos. Estos canales difieren de los de bacterias en el número de dichos residuos presentes en el canal funcional, mientras que los de bacterias contienen cuatro (uno en cada TM2 o S6), en los de mamíferos solo existen tres (en los de sodio: S6 de los dominios I, II y III), y dos (en los de calcio; S6 de los dominios I y II) (Figura 8). El único trabajo previo en canales Ca_v tipo T es una contribución de nuestro grupo de trabajo en el que se investigó el papel de dichos residuos bisagra en el canal $\text{Ca}_v3.3$ (Sepulveda-Hirose, 2012). El presente trabajo de tesis tuvo como finalidad investigar el papel de las glicinas bisagra, así como el de la Val1501, en el mecanismo de apertura y cierre de los canales $\text{Ca}_v3.1$. Los resultados obtenidos aquí, en conjunto con los del trabajo previo de nuestro grupo, proporcionan evidencias contundentes sobre la contribución de dichos residuos en el mecanismo de apertura de los canales de calcio tipo T y de los canales Ca_v en general. A continuación se discuten las

principales contribuciones del presente trabajo de investigación y se comparan con los resultados previamente descritos en la literatura acerca de los elementos estructurales involucrados en la apertura y cierre de los canales iónicos activados por voltaje.

A. Las mutaciones en los segmentos IS6, IIS6 y IIIS6 disminuyen drásticamente la corriente generada por los canales Cav3.1

Las mutantes de G382, G951 y V1501 presentaron corrientes macroscópicas de menor amplitud con respecto al canal silvestre (Figura 17). Varios trabajos anteriores han mostrado resultados similares al realizar mutaciones puntuales en los canales Cav (Hohaus *et al.*, 2005; Sepulveda-Hirose, 2012; Demers-Giroux *et al.*, 2013). Una explicación a esta observación es que a consecuencia de la mutación el número de canales presentes en la membrana plasmática disminuye en comparación con los niveles de canal Cav3.1 silvestre. Este razonamiento aplicaría incluso para aquellas mutaciones por prolina en las que no se detectaron corrientes en lo absoluto (Figura 16). Sin embargo, mediante estudios de microscopia confocal nuestro grupo ha mostrado previamente que mutantes similares del canal Cav3.3 fusionadas a la GFP que a pesar de no generar corrientes se localizaron en la membrana plasmática con una densidad similar a la del canal Cav3.3 silvestre (Sepulveda-Hirose, 2012). Otros estudios con canales Cav han reportado observaciones similares (Hohaus *et al.*, 2005; Kudrnac *et al.*, 2009). Por lo tanto, es posible que la ausencia de corrientes en nuestras construcciones “no conductoras”, así como la baja densidad de corriente en el resto de las mutaciones, sea el resultado de un efecto inducido por la mutación y como consecuencia el funcionamiento del canal se viera afectado significativamente; y no sobre el número de canales presentes en la membrana plasmática. Los efectos sobre el funcionamiento del canal podrían incluir efectos como disminución en la conductancia unitaria o en la probabilidad de apertura, escenarios poco probables pero que no podemos descartar por completo en este trabajo.

El caso de las mutantes de prolina requiere además las siguientes consideraciones. Como se observa en la Figura 16, estas mutantes resultaron en canales no funcionales o condujeron corrientes tan pequeñas (>20 pA) que fue imposible analizar sus propiedades biofísicas. Como ya se mencionó anteriormente, las propiedades fisicoquímicas de la prolina fue determinante

para dilucidar el papel de las glicinas bisagra en los canales NaChBac, dado que al romper la estructura de α -hélice la prolina favoreció la estabilidad del canal en el estado abierto (Zhao et al., 2004), demostrando así el papel de las glicinas bisagra en el mecanismo de apertura y cierre del canal de sodio de bacterias. Desafortunadamente, en nuestro caso la mutación de la glicina correspondiente por prolina no generó corrientes medibles, por lo que se empleó otros aminoácidos como la serina y treonina que por sus características hidrofóbicas pudieran introducir modificaciones estructurales a la α -hélice (o al entorno inmediato) de los segmentos S6 aquí estudiados. Estrategias similares fueron utilizadas en canales Cav de alto umbral de activación (Kudrnac et al., 2009). En nuestras manos, las mutantes por serina y treonina produjeron corrientes medibles cuyas propiedades biofísicas sí pudieron ser analizadas en detalle y la información obtenida fue relevante para determinar el papel de los aminoácidos bisagra del Cav3.1, como se discutirá en los siguientes apartados.

También cabe destacar que las mutantes del segmento S6 del dominio II generaron corrientes equivalentes a menos del 10% de las registradas en los canales Cav3.1 silvestres, incluyendo la mutación de la glicina bisagra por alanina, la cual exhibió la densidad de corriente de menor amplitud en todo el estudio (Tabla 2). Se ha mostrado que las substituciones por alanina inducen ligeros efectos en la estructura en α -hélice de las proteínas, pero cambios importantes en el tamaño y propiedades químicas de los residuos (Blaber et al., 1993; Petsko & Ringe, 2004) por lo que el resultado mencionado era poco previsible. No obstante, un resultado similar fue descrito para la glicina bisagra del canal de potasio *Shaker* (G466), en el que la presencia de una alanina en lugar de la glicina produjo canales no funcionales (Ding et al., 2005), dicha mutación letal fue rescatada con la mutación de la valina contigua a la glicina bisagra por otra glicina (G466A/V467G), denotando la función crucial de la glicina bisagra en el mecanismo de activación del canal *Shaker*, dado que la flexibilidad conferida por la mutación V467G rescató la eliminada por la mutación G466A resultando en canales funcionales con propiedades biofísicas muy parecidas a las del canal *Shaker* silvestre. Por lo tanto, es razonable suponer que nuestra mutante G382A haya reducido la flexibilidad del segmento IIS6 en tal forma que disminuya drásticamente la transición del canal cerrado al estado abierto. En consecuencia, las mutaciones por aminoácidos más hidrofóbicos y

voluminosos como la serina y la treonina afectan similarmente el funcionamiento de los canales Cav3.1 (Tabla 2). Estas observaciones sugieren que la glicina bisagra el segmento IIS6 tiene un papel preponderante en el mecanismo de activación o apertura del canal del canal Cav3.1.

Otro parámetro que resultó modificado en las mutaciones con respecto al canal silvestre fue el potencial de inversión, sobre todo en las mutaciones realizadas en el IIS6. Cabe mencionar que un cambio en el potencial de inversión, puede significar un cambio en la selectividad del canal por el ión permeante, es decir, que el canal disminuya su selectividad por el Ca²⁺ a consecuencia de la mutación y que ahora se requiera menos energía (voltaje) para que el canal permita el flujo de iones hacia afuera de la célula. Es pertinente aclarar que el ion que genera las corrientes salientes a través de los canales Cav3.1 es el Cs⁺, el cual bajo las presentes condiciones de registro, es el único catión que puede fluir a través de dichos canales (Fenwick *et al.*, 1982). En todo caso, para que el Cs⁺ pueda fluir a través de los canales Cav3.1 se requiere que exista una mayor fuerza impulsora para la salida de éste que la que existe para el Ca²⁺ a un voltaje determinado, situación que no se modificó en ninguno de los experimentos realizados, es decir, la composición de las soluciones fue la misma en todos los casos, por lo que esta no es la explicación más viable a las diferencias observadas en el potencial de inversión.

Por otro lado, la selectividad de los canales Cav se debe a una fuerte interacción del Ca²⁺ con el filtro de selectividad del canal, cuyo sustrato molecular se ubica cerca de las glicinas y la valina mutadas en el presente trabajo, por lo que la posibilidad de que dichas mutaciones hayan inducido cambios estructurales en o cerca del sitio de unión del Ca²⁺ no pueden ser descartadas en su totalidad. Tales modificaciones podrían disminuir la interacción del Ca²⁺ con el filtro de selectividad de tal manera que se requiera una menor despolarización para que el Cs⁺ fluya a través del canal hacía afuera de la célula. Interesantemente, el efecto sobre el V_{inv} fue más drástico cuando las corrientes transportadas fueron más pequeñas (mutantes del dominio II; Tabla 2), mientras que cuando las corrientes fueron más grandes el V_{inv} fue menos afectado (mutantes del dominio III; Tabla 2). Evidentemente se requiere de otro tipo de

experimentos para determinar las causas exactas del cambio en el V_{inv} de las mutantes en cuestión.

B. Efecto de las mutantes en la inactivación del canal

La inactivación en el estado estacionario de los canales $Ca_v3.1$ mutantes resultó severamente afectada por las mutaciones de los dominios II y III, y en menor medida por la mutación G382T del dominio I (Figura 18). Particularmente, las mutaciones del segmento IIS6 provocaron que la inactivación de los canales se lleve a cabo a voltajes más negativos que el canal $Ca_v3.1$ (el $V_{1/2}$ fue 10 mV más negativo; Tabla 2). Con las mutaciones del dominio III los efectos fueron menos drásticos pero igualmente significativos. Estos resultados indican que la glicina del segmento IIS6 y la valina del IIIS6 previenen que el canal $Ca_v3.1$ silvestre se inactive a partir del estado cerrado, ya que su ausencia promueve la inactivación de los canales a voltajes más negativos. En un trabajo previo del grupo de Hering (Marksteiner *et al.*, 2001) reportan que mutaciones puntuales de aminoácidos del segmento IIIS6 por alaninas (*scanning* de alaninas) del canal $Ca_v3.1$ de ratón produce el efecto opuesto en las curvas de IEE, es decir, los canales mutantes se inactivan a voltajes más positivos que el silvestre. Sin embargo, todos los residuos mutados en ese trabajo se encuentran río abajo de la valina 1501 estudiada en el presente trabajo (es decir, más cercano al extremo intracelular del segmento S6). Resultados similares a estos últimos, fueron reportados por el grupo de Parent (Demers-Giroux *et al.*, 2013) al realizar un *scanning* de alaninas y glicinas en aminoácidos hidrofóbicos distales del segmento IIS6 del canal $Ca_v3.2$. En conjunto estas observaciones sugieren que la disminución de hidrofobicidad en los residuos por debajo de la valina 1501 (lograda con las substituciones por alanina) evita que los canales $Ca_v3.1$ se inactiven del estado cerrado (Marksteiner *et al.*, 2001), mientras que un aumento en la flexibilidad del segmento S6 (logrado al introducir una glicina o alanina) o un aumento en la hidrofiliidad (por los grupos polares de la serina y treonina) en la posición de la valina 1501 promueve que una mayor proporción de canales se inactiven a partir del estado cerrado. Las observaciones del presente trabajo también son consistentes con lo reportado previamente por nuestro grupo de investigación en el canal $Ca_v3.3$, donde se obtuvieron resultados similares al mutar la valina correspondiente del segmento IIIS6 de dicho canal (Sepulveda-Hirose, 2012). La contribución de la valina 1501 del segmento IIIS6

parece ser importante no solo para la IEE del canal, es decir, de la transición del estado cerrado al inactivado, sino también de la inactivación a partir del estado abierto, ya que las cuatro mutaciones puntuales investigadas en dicho residuo aceleraron casi tres veces el curso temporal de la inactivación de la corriente comparada con el canal silvestre (Tabla 3). Nuevamente, estos resultados concuerdan con lo observado en el canal Cav3.3 (Sepulveda-Hirose, 2012), pero contrastan con lo reportado en el canal Cav3.1 de ratón, y en el segmento IIS6 del canal Cav3.2, en los que se reportó que la inactivación de la corriente ocurre más lentamente como resultado del *scanning* de alaninas y glicinas realizados en tales trabajos (Marksteiner *et al.*, 2001; Demers-Giroux *et al.*, 2013).

Por el contrario, la mutación de la glicina del segmento IIS6 por treonina (G382T) promovió que la inactivación del canal Cav3.1 a partir del estado cerrado se lleve a cabo a voltajes más positivos (Figura 18B), sin embargo el efecto fue más bien discreto (aprox. 3 mV); además el valor de $V_{1/2}$ de inactivación fue estadísticamente diferente del observado en el canal silvestre (Tabla 3). En consistencia con esta observación, la inactivación a partir del estado abierto del canal también fue disminuida por la mutación G382T (Figura 19). Adicionalmente, esta fue la mutante que desplazó en mayor medida (~ 8 mV) la activación del canal Cav3.1 hacia voltajes más positivos (Tabla 2), mientras que las mutaciones por alanina y serina indujeron efectos más discretos aunque significativos también. Este conjunto de observaciones son consistentes con una contribución de la glicina del segmento IIS6 a la dependencia al voltaje tanto de la activación como de la inactivación del canal Cav3.1. Es interesante mencionar, que con base en modelos tridimensionales del canal Cav3.1 generados en nuestro laboratorio (datos no publicados), la mutación por treonina en el segmento IIS6 introduce un cambio importante en la nube de átomos circundante en dicha posición, provocando colisiones entre los mismos (la treonina es un residuo considerablemente más voluminoso y polar que la glicina), lo cual se puede reflejar en una modificación del funcionamiento del segmento IIS6, requiriendo más energía para que se active el canal y a su vez oponiéndose a que el canal transite al estado inactivado. El mismo modelo *in silico* del canal Cav3.1 predice menos colisiones de átomos cuando la glicina se intercambia por una alanina o una serina, lo cual podría ser la explicación para los efectos menos consistentes de dichas mutantes sobre el

funcionamiento del canal Cav3.1 (Figura 17B, Tablas 2 y 3). Desafortunadamente no se cuenta con la información de la mutante correspondiente en el canal Cav3.3 (Sepulveda-Hirose, 2012), por lo que se requiere realizar tales mutaciones para llegar a un posible consenso en cuanto a la generalidad de los efectos de mutar la glicina del dominio II de los canales Cav3.

C. Efecto de las mutaciones de los segmentos IS6, IIS6 y IIIS6 en el cierre del canal Cav3.1

El propósito del presente estudio de tesis fue obtener información referente al mecanismo de activación de los canales Cav3.1 y de manera particular la contribución de los aminoácidos “bisagra” (G382, G951 y V1501) en el proceso de apertura y cierre del canal Cav3.1; por tales razones el curso temporal del cierre de este canal representa un aspecto sustancial para evaluar el funcionamiento de la compuerta de activación, tal como ha sido estudiado en canales de sodio NaChBac (Zhao *et al.*, 2004). Las colas de corriente generadas por el cierre de los canales Cav3.1 mutantes y silvestre estudiados en el presente trabajo fueron ajustadas con una función exponencial para obtener la constante de tiempo de desactivación de cada uno de los canales investigados. Interesantemente las mutaciones de los tres aminoácidos bisagra (glicinas en el IS6 y IIS6; y valina en el IIIS6) del canal Cav3.1 aceleraron la cinética de cierre del canal Cav3.1 (Figura 22). Es de llamar la atención que dentro de las varias mutaciones la sustitución por serina fue siempre la más consistente en cuanto a los efectos sobre la cinética de cierre del canal (Tabla 3). En orden descendente le siguieron la treonina y luego la alanina. Aunque el menor efecto se observó en la mutación V1501G del segmento IIIS6, cuya cinética de desactivación fue muy similar al control (Figura 22E). Estos resultados sugieren que la función de los aminoácidos bisagra de los segmentos IS6, IIS6 y IIIS6 del canal Cav3.1 fortalecen la conformación del canal en el estado abierto y que cualquier perturbación de dichos residuos se refleja en un movimiento de la α -hélice de dichos segmentos que promueve la transición del canal al estado cerrado a partir del estado abierto. Es desafortunado el hecho de que las mutantes de tales residuos por prolina no generó canales funcionales en ningún caso, ya que los efectos introducidos por este aminoácido a la estructura de la α -hélice se han visto reflejados como un drástico enlentecimiento del cierre del canal NaChBac (Zhao *et al.*, 2004) y en el canal Cav1.2 (del grupo HVA) (Hohaus *et al.*, 2005). Sin embargo, en el trabajo previo de nuestro laboratorio en el canal Cav3.3 (Sepulveda-

Hirose, 2012), las mutaciones de las glicinas bisagra de los segmentos IS6 y IIS6 por prolina si generaron corrientes medibles y el análisis de las colas de corriente demostró que el canal Cav3.3 se cierra dos veces más rápido con la prolina en el segmento IS6, pero la modificación por prolina en el segmento IIS6 disminuyó la velocidad de cierre en más de un 100% (Figura 9 paneles B y C), mientras que la mutación de la valina correspondiente en el segmento IIIS6 no generó corrientes. Interesantemente, la mutación de dicha valina por glicina propició el efecto más significativo sobre el curso temporal del cierre del canal Cav3.3, provocando que éste se cierre y se inactive significativamente más lento a partir del estado abierto (Figura 9D). Lo que sugiere que una mayor flexibilidad del segmento IIIS6 inducida por la presencia de la glicina promueve que el canal sea más estable en el estado abierto y que retrase su transición a los estados cerrado e inactivado. A partir de tales razonamientos, otra perspectiva del presente trabajo será realizar mutaciones de los residuos contiguos a las glicinas bisagra del dominio I y II del canal Cav3.1 en los canales que ya tienen la mutación G382P y G951P, con la finalidad de analizar la posibilidad de que la doble mutante exprese corrientes, tal y como se ha visto en el canal de potasio *Shaker* (Ding *et al.*, 2005).

En suma, las observaciones del presente trabajo en conjunto con las ya reportadas para el canal Cav3.3 sugieren que los aminoácidos bisagra de los segmentos IS6, IIS6 y IIIS6 de los canales Cav3 forman parte del sustrato molecular que sustenta el mecanismo de apertura y cierre de estos canales Cav. Sin embargo, debido a la variedad de efectos observados sobre el curso temporal de cierre del canal y que ninguna mutación indujo un cambio superior al 300% sobre la constante de tiempo del canal silvestre (Tabla 3), lo cual aunque es una diferencia sustancial, no se compara con los cambios de 30 a 2000 veces en la constante de tiempo de desactivación observada en canales Cav HVA y NaChBac, respectivamente (Zhao *et al.*, 2004; Hohaus *et al.*, 2005); así como los efectos observados en la activación dependiente de voltaje, la inactivación en el estado estacionario, y la recuperación de la inactivación del canal Cav3.1 es probable que otros aminoácidos (Hohaus *et al.*, 2005; por ejemplo, ver Demers-Giroux *et al.*, 2013), además de los estudiados en el presente trabajo intervengan en el proceso de apertura y cierre del canal Cav3.1 en particular y en general de los canales Cav3.

9. CONCLUSIONES

1. Las mutaciones puntuales en los dominios IS6, IIS6 y IIIS6 reducen drásticamente la amplitud de la corriente con respecto al canal silvestre. Es probable que esto se deba a un efecto de la mutación sobre el funcionamiento del canal, aunque una disminución en el número de canales en la membrana plasmática, no se puede descartar.
2. La mayoría de las mutaciones evaluadas mostraron un cambio significativo en la dependencia al voltaje de la inactivación (IEE), particularmente las mutantes del segmento IIS6 promovieron que los canales $Ca_v3.1$ se inactiven en un intervalo de voltajes que es 10 mV más negativo que al que lo hace el canal silvestre. Por lo tanto, la G951 contribuye significativamente a la transición del canal del estado cerrado al estado abierto, evitando que se inactive a partir del estado cerrado.
3. Un efecto contrario se observó con la mutante G382T del segmento IS6, la cual desplazó tanto la activación como la inactivación en el estado estacionario del canal silvestre a voltajes más positivos. Es decir, la glicina de este segmento favorece la transición del canal del estado cerrado al estado inactivado y lo estabiliza en esta última conformación.
4. Todas las mutaciones investigadas aceleraron el curso temporal con el que se cierra el canal $Ca_v3.1$, lo cual sugiere que los aminoácidos G382, G951 y V1501 forman parte de la estructura involucrada en el mecanismo de apertura y cierre del canal $Ca_v3.1$.
5. Es probable que el mecanismo involucrado en el movimiento de la compuerta de activación de los canales $Ca_v3.1$ requiera de elementos estructurales adicionales a las glicinas “bisagra” descritas para otros canales activados por voltaje.
6. Es necesario la realización de experimentos adicionales para entender completamente el mecanismo de apertura y cierre de los canales de calcio activados por voltaje y en específico del canal $Ca_v3.1$.

10. REFERENCIAS

- Ahlijanian, M.K., Striessnig, J., & Catterall, W.A. 1991. Phosphorylation of an alpha 1-like subunit of an omega-conotoxin-sensitive brain calcium channel by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase. *J Biol Chem* 266:20192-20197.
- Alam, A. & Jiang, Y.X. 2009a. High-resolution structure of the open NaK channel. *Nature Structural & Molecular Biology* 16:30-34.
- Alam, A. & Jiang, Y.X. 2009b. Structural analysis of ion selectivity in the NaK channel. *Nature Structural & Molecular Biology* 16:35-41.
- Arikath, J. & Campbell, K.P. 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 13:298-307.
- Armstrong, C.M. & Matteson, D.R. 1985. Two distinct populations of calcium channels in a clonal line of pituitary cells. *Science* 227:65-67.
- Arteaga, R. 2007. Papel del triptófano en la región A1D de los canales de calcio HVA en la modulación del canal de calcio alfa1G por subunidades beta. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Bae, J., Suh, E.J., & Lee, C. 2010. Interaction of T-Type Calcium Channel Ca(v)3.3 with the beta-Subunit. *Molecules and Cells* 30:185-191.
- Bean, B.P. 1989. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* 51:367-384.
- Berridge, M.J. 2012. Calcium signalling remodelling and disease. *Biochemical Society Transactions* 40:297-309.
- Blaber, M., Zhang, X.J., & Matthews, B.W. 1993. Structural basis of amino acid alpha helix propensity. *Science* 260:1637-1640.
- Carbone, E. & Lux, H.D. 1984. A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* 310:501-502.
- Catterall, W.A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521-555.
- Catterall, W.A. 2011. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3:a003947.
- Cribbs, L.L., Gomora, J.C., Daud, A.N., Lee, J.H., & Perez-Reyes, E. 2000. Molecular cloning and functional expression of Ca(v)3.1c, a T-type calcium channel from human brain. *Febs Letters* 466:54-58.
- Cribbs, L.L., Lee, J.H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., & Perez-Reyes, E. 1998. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca²⁺ channel gene family. *Circ Res* 83:103-109.
- Darszon, A. & Hernandez-Cruz, A. 2014. T-type Ca²⁺ channels in spermatogenic cells and sperm. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 466:819-831.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Beltran, C., & Trevino, C.L. 2011. Calcium Channels in the Development, Maturation, and Function of Spermatozoa. *Physiological Reviews* 91:1305-1355.
- Demers-Giroux, P.O., Bourdin, B., Sauve, R., & Parent, L. 2013. Cooperative Activation of the T-type Ca(V)3.2 Channel INTERACTION BETWEEN DOMAINS II AND III. *J Biol Chem* 288:29281-29293.
- Ding, S., Ingleby, L., Ahern, C.A., & Horn, R. 2005. Investigating the putative glycine hinge in Shaker potassium channel. *J Gen Physiol* 126:213-226.
- Doyle, D.A., Morais, C.J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., & MacKinnon, R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W., & Catterall, W.A. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
- Fatt, P. & KATZ, B. 1953. The Electrical Properties of Crustacean Muscle Fibres. *Journal of Physiology-London* 120:171-&.
- Fenwick, E.M., Marty, A., & Neher, E. 1982. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 331:599-635.
- George, A.L. 2005. Inherited disorders of voltage-gated sodium channels. *Journal of Clinical Investigation* 115:1990-1999.
- Gomora, J.C., Murbartian, J., Arias, J.M., Lee, J.H., & Perez-Reyes, E. 2002. Cloning and expression of the human T-type channel Ca(v)3.3: insights into prepulse facilitation. *Biophys J* 83:229-241.

- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F.J.** 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hardman, R.M., Dalibalta, S., & Mitcheson, J.S.** 2005. The role of inner helix glycine residues in the activation gating of HERG potassium channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 39:169-170.
- Hardman, R.M., Stansfeld, P.J., Dalibalta, S., Sutcliffe, M.J., & Mitcheson, J.S.** 2007. Activation Gating of hERG potassium channels - S6 glycines are not required as gating hinges. *J Biol Chem* 282:31972-31981.
- Hille, B.** 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*. Third edition ed.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., & Pease, L.R.** 1989. Site-Directed Mutagenesis by Overlap Extension Using the Polymerase Chain-Reaction. *Gene* 77:51-59.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F.** 1952a. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117:500-544.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F.** 1952b. Propagation of electrical signals along giant nerve fibers. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 140:177-183.
- Hodgkin, A.L. & Huxley, A.F.** 1952c. The components of membrane conductance in the giant axon of Loligo. *J Physiol* 116:473-496.
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., & KATZ, B.** 1952. Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. *J Physiol* 116:424-448.
- Hohaus, A., Beyl, S., Kudrnac, M., Berjukow, S., Timin, E.N., Marksteiner, R., Maw, M.A., & Hering, S.** 2005. Structural determinants of L-type channel activation in segment IIS6 revealed by a retinal disorder. *J Biol Chem* 280:38471-38477.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., & MacKinnon, R.** 2002a. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417:515-522.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., & MacKinnon, R.** 2002b. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417:523-526.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Ruta, V., Cadene, M., Chait, B.T., & MacKinnon, R.** 2003a. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423:33-41.
- Jiang, Y., Ruta, V., Chen, J., Lee, A., & MacKinnon, R.** 2003b. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423:42-48.
- Kudrnac, M., Beyl, S., Hohaus, A., Stary, A., Peterbauer, T., Timin, E., & Hering, S.** 2009. Coupled and independent contributions of residues in IS6 and IIS6 to activation gating of Ca_v1.2. *J Biol Chem* 284:12276-12284.
- Llinas, R., Sugimori, M., Hillman, D.E., & Cherksey, B.** 1992. Distribution and functional significance of the P-type, voltage-dependent Ca²⁺ channels in the mammalian central nervous system. *Trends Neurosci* 15:351-355.
- Lumpkin, E.A., Marshall, K.L., & Nelson, A.M.** 2010. The cell biology of touch. *Journal of Cell Biology* 191:237-248.
- Magidovich, E. & Yifrach, O.** 2004. Conserved gating hinge in ligand- and voltage-dependent K⁺ channels. *Biochemistry* 43:13242-13247.
- Marksteiner, R., Schurr, P., Berjukow, S., Margreiter, E., Perez-Reyes, E., & Hering, S.** 2001. Inactivation determinants in segment IIIIS6 of Ca_v(v)_{3.1}. *J Physiol* 537:27-34.
- Matteson, D.R. & Armstrong, C.M.** 1986. Properties of two types of calcium channels in clonal pituitary cells. *J Gen Physiol* 87:161-182.
- McCleskey, E.W., Fox, A.P., Feldman, D.H., Cruz, L.J., Olivera, B.M., Tsien, R.W., & Yoshikami, D.** 1987. Omega-conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4327-4331.
- McCusker, E.C., Bagnieris, C., Naylor, C.E., Cole, A.R., D'Avanzo, N., Nichols, C.G., & Wallace, B.A.** 2012. Structure of a bacterial voltage-gated sodium channel pore reveals mechanisms of opening and closing. *Nature Communications* 3.
- Neher, E. & Sakmann, B.** 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802.
- Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., Loo, J.A., Dooley, D.J., Nadasdi, L., Tsien, R.W., Lemos, J., & Miljanich, G.** 1998. Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*. *Biochemistry* 37:15353-15362.

- Nicholls, J.G., M.A.R., and B.G. Wallace.** 1992. *From Neuron to Brain*. 3 ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts U.S.A. 1-807 pp.
- Nilius, B., Hess, P., Lansman, J.B., & Tsien, R.W.** 1985. A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 316:443-446.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., & .** 1984. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312:121-127.
- Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Furutani, Y., Hirose, T., Asai, M., Inayama, S., Miyata, T., & Numa, S.** 1982. Primary Structure of Alpha-Subunit Precursor of Torpedo-Californica Acetylcholine-Receptor Deduced from Cdna Sequence. *Nature* 299:793-797.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P., & Tsien, R.W.** 1985. Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316:440-443.
- Park, J.Y., Kang, H.W., Jeong, S.W., & Lee, J.H.** 2004. Multiple structural elements contribute to the slow kinetics of the Cav3.3 T-type channel. *J Biol Chem* 279:21707-21713.
- Payandeh, J., El Din, T.M.G., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W.A.** 2012. Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature* 486:135-U166.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W.A.** 2011. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* 475:353-U104.
- Perez-Reyes, E.** 1999. Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell Mol Life Sci* 56:660-669.
- Perez-Reyes, E.** 2003. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 83:117-161.
- Perez-Reyes, E., Cribbs, L.L., Daud, A., Lacerda, A.E., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M., & Lee, J.H.** 1998. Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* 391:896-900.
- Petsko, G.A. and D.Ringe.** 2004. *Protein structure and function*. New Science Press Ltd, London, UK.
- Prevarskaya, N., Skryma, R., & Shuba, Y.** 2010. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* 16:107-121.
- Raftery, M.A., Hunkapiller, M.W., Strader, C.D., & Hood, L.E.** 1980. Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science* 208:1454-1456.
- Randall, A. & Benham, C.D.** 1999. Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Mol Cell Neurosci* 14:255-272.
- Randall, A. & Tsien, R.W.** 1995. Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 15:2995-3012.
- Raybaud, A., Dodier, Y., Bissonnette, P., Simoes, M., Bichet, D.G., Sauve, R., & Parent, L.** 2006. The role of the GX(9)GX(3)G motif in the gating of high voltage-activated Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* 281:39424-39436.
- Sakmann, B. and E. Neher.** 1995. *Single-Chanel Recording*. Second ed. Plenum Press, New York.
- Sambrook, J. and D. Russell.** 2001. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sands, Z., Grottesi, A., & Sansom, M.S.** 2005. Voltage-gated ion channels. *Curr Biol* 15:R44-R47.
- Sather, W.A. & McCleskey, E.W.** 2003. Permeation and selectivity in calcium channels. *Annu Rev Physiol* 65:133-159.
- Sepulveda-Hirose, R.K.** 2012. Papel de las glicinas "bisagra" de los segmentos S6 en el mecanismo de activación de los canales CaV3.3. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Serrano, J.R., Perez-Reyes, E., & Jones, S.W.** 1999. State-dependent inactivation of the alpha1G T-type calcium channel. *J Gen Physiol* 114:185-201.
- Staes, M., Talavera, K., Klugbauer, N., Prenen, J., Lacinova, L., Droogmans, G., Hofmann, F., & Nilius, B.** 2001. The amino side of the C-terminus determines fast inactivation of the T-type calcium channel alpha1G. *J Physiol* 530:35-45.
- Talley, E.M., Cribbs, L.L., Lee, J.H., Daud, A., Perez-Reyes, E., & Bayliss, D.A.** 1999. Differential distribution of three members of a gene family encoding low voltage-activated (T-type) calcium channels. *J Neurosci* 19:1895-1911.

- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T., & Numa, S.** 1987. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* 328:313-318.
- Thomas, P., Surprenant, A., & Almers, W.** 1990. Cytosolic Ca²⁺, Exocytosis, and Endocytosis in Single Melanotrophs of the Rat Pituitary. *Neuron* 5:723-733.
- Tombola, F., Pathak, M.M., & Isacoff, E.Y.** 2006. How does voltage open an ion channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:23-52.
- Veselovskii, N.S. & Fedulova, S.A.** 1983. [2 types of calcium channels in the somatic membrane of spinal ganglion neurons in the rat]. *Dokl Akad Nauk SSSR* 268:747-750.
- Wilde, A.A.** 2008. Channelopathies in children and adults. *Pacing Clin Electrophysiol* 31 Suppl 1:S41-S45.
- Yarov-Yarovoy, V., Brown, J., Sharp, E.M., Clare, J.J., Scheuer, T., & Catterall, W.A.** 2001. Molecular determinants of voltage-dependent gating and binding of pore-blocking drugs in transmembrane segment IIS6 of the Na⁽⁺⁾ channel alpha subunit. *J Biol Chem* 276:20-27.
- Yarov-Yarovoy, V., McPhee, J.C., Idsvoog, D., Pate, C., Scheuer, T., & Catterall, W.A.** 2002. Role of amino acid residues in transmembrane segments IS6 and IIS6 of the Na⁺ channel alpha subunit in voltage-dependent gating and drug block. *J Biol Chem* 277:35393-35401.
- Zhao, Y., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., & Catterall, W.A.** 2004. A gating hinge in Na⁺ channels; a molecular switch for electrical signaling. *Neuron* 41:859-865.