



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

## CONTRIBUCIÓN DE LOS EXTREMOS AMINO Y CARBOXILO DE LA SUBUNIDAD $\alpha$ DEL CANAL HVA $CaV\alpha 2.2$ EN SU REGULACIÓN POR LAS SUBUNIDADES $CaV\beta$

TESIS

Que presenta obtener el título de

**BIÓLOGO**

Presenta

**IVÁN URIEL VALLADARES HERNÁNDEZ**

Director de Tesis

**Dr. Juan Manuel Arias Montaña**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2016





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Para la realización del presente trabajo se contó con el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CANACYT, CB-2009-01-131778), al Dr. Juan Manuel Arias Montaña, su cual se me otorgó una beca durante el periodo de febrero a julio del 2014.

También se contó con el apoyo otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), en el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), clave IN216215, al Dr. Juan Manuel Arias Montaña

El trabajo experimental se realizó en los laboratorios de electrofisiología del Proyecto de Neurociencias, en la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); y en el laboratorio 15 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV - IPN).

Los avances de este trabajo fueron presentados en el XLII Coloquio Estudiantil de Tercera Etapa en la FESI en 2013, así como en el LVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas en Oaxaca, Oaxaca en el 2014.

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

**Dr. Juan Manuel Arias Montaña**

**Proyecto de Neurociencias, UIICSE, FES Iztacala – UNAM**

# AGRADECIMIENTOS

A mis sinodales de tesis: la Dra. María Rosa Ávila Costa, la Dra. Alicia Elizabeth Hernández Echeagaray, la Dra. Bertha Segura Alegría y al Dr. José Alejandro Sandoval Romero por la revisión y asesoramiento durante la realización del presente trabajo así como su culminación.

Al Dr. Juan Manuel Arias Montaña, por su apoyo, su dedicación y sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio; por brindarme la oportunidad de trabajar juntos y por la confianza que me ha dado. Mi más sincera admiración a Ud. Dr. Manuel.

Al Dr. Ubaldo García Hernández, que me permitió realizar la parte experimental de electrofisiología en su laboratorio, en el CINVESTAV – IPN.

Al Dr. Edward Perez-Reyes del departamento de Farmacología de la Universidad de Virginia, EUA, por la donación de los ADNc de las diferentes subunidades utilizadas en el proyecto.

A la Dra. Clara Estela Díaz Velásquez, por su apoyo en lo académico y personal, así como por cuidarnos y consentirnos en el laboratorio.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, a Nahum, Raul y Miguel, por permitirme aprender de Uds.

Y a la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser parte de mi formación durante tantos años.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2016

# DEDICATORIAS

Agradezco y dedico el presente trabajo a mi familia, a mis amigos y a todas aquellas personas que me han apoyado durante todo este tiempo, porque sin ustedes en mi vida, en la escuela o en el trabajo, mi vida académica y personal no sería la misma.

Para mis padres, que con palabras de motivación y con acciones admirables, me han ayudado a seguir adelante. Les agradezco las valiosas enseñanzas que me han dado pero sobre todo que crean en mí.

Para mis hermanas, porque han sido parte esencial en mi formación académica y ahora, de mi vida profesional. Les agradezco haber crecido con ustedes de tantas formas y espero poder compartir muchísimos logros más juntos.

Para mi pequeña y gran Sofía, mi más genuina e inigualable inspiración en el mundo, mis ganas de seguir adelante, mi amor chiquito. Porque para ti serán todos mis logros, y es que contigo he aprendido tanto que puedo decir que tú eres y serás mi más grande motivación.

Para Ángeles, que has sido un apoyo constante, por la gran persona que has sido conmigo, por ti y tu amistad, muchas gracias.

Para mis amigos, que aunque no mencione a todos y cada uno de ustedes, saben que son muy importantes para mí. Les agradezco por todas aquellas experiencias vividas en el aula de clases y en las prácticas de campo. Gracias por formar parte de mi vida.

Y un particular agradecimiento a Cinthya Valeria, porque este trabajo le pertenece de la misma manera, Q.E.P.D.

# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN.....	iii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 MEMBRANAS Y TRANSPORTE .....	1
1.2 GENERALIDADES DE LOS CANALES IÓNICOS.....	2
1.3 CANALES IÓNICOS EN CÉLULAS EXCITABLES .....	3
1.4 CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR LIGANDO.....	6
1.5 CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE.....	6
1.6 CANALES DE CALCIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE.....	7
1.7 SUBUNIDAD $\alpha_1$ .....	9
1.8 SUBUNIDADES $\beta$ .....	10
1.9 INTERACCIÓN $Cav\alpha - Cav\beta$ .....	11
1.10 LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN ENFERMEDADES GENÉTICAS .....	12
2. ANTECEDENTES .....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. HIPOTESIS .....	16
5. OBJETIVOS .....	17
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	17
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
6.1 DIGESTIONES, PURIFICACION DE ADN PLASMÍDICO Y LIGACIONES.....	18
6.2 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES .....	19
6.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES CRG12Ba, CRG23Bb y NG12B.....	19
6.4 CONSTRUCCIÓN DE LA SUBUNIDAD QUIMÉRICA $\alpha$ .....	20
6.5 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CON LA SUBUNIDAD $\beta$ .....	22
6.6 TRANSFECCION EN CÉLULAS HEK 293T .....	22
6.7 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO .....	24
6.8 ANÁLISIS DE DATOS .....	25
7. RESULTADOS .....	26
7.1 PROTEÍNAS QUIMÉRICAS ENTRE $Cav\alpha 2.2$ Y $Cav\alpha 3.1$ .....	26
7.2 CONSTRUCCIÓN DE LAS QUIMERAS NG12BCa Y NG12BCb.....	29
7.3 SUBCLONACIÓN DE LAS SUBUNIDADES $\beta$ EN EL VECTOR pIRES2_EGFP .....	32
7.4 CORRIENTE IÓNICA DE LA QUIMERA RG12B .....	35

7.5 LA SUSTITUCIÓN DEL EXTREMO AMINO TERMINAL Y EL ASA I-II SIMULTÁNEAMENTE NO GENERAN CORRIENTES IÓNICAS EN EL CANAL QUIMÉRICO.....	37
7.6 LA ADICIÓN SIMULTÁNEA DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL NO ES SUFICIENTE PARA ACTIVAR AL CANAL QUIMÉRICO .....	39
8. DISCUSIÓN.....	41
8.1 G12B MUESTRA UN COMPORTAMIENTO “ANORMAL” .....	42
8.2 NG12B, NG12BCA Y NG12BCB NO PRESENTAN CORRIENTE .....	43
9. CONCLUSIONES.....	46
10. PERSPECTIVAS .....	47
11. BIBLIOGRAFÍA.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Ca<sub>v</sub>α<sub>1</sub></b>	<b>subunidad alfa 1 de los canales de calcio dependientes de voltaje</b>
<b>Ca<sub>v</sub>β</b>	subunidad beta de los canales de calcio dependientes de voltaje
<b>CCDV</b>	Canales de Calcio Dependientes de Voltaje
<b>HEK293 T</b>	Human Embryonic Kidney 293, línea celular
<b>HVA</b>	High Voltage Activated, canales de calcio de alto umbral de activación
<b>LVA</b>	Low Voltage Activated, canales de calcio de bajo umbral de activación
<b>ATP</b>	Trifosfato de Adenosina
<b>ATPasas</b>	Enzimas que degradan ATP
<b>Na<sup>+</sup></b>	Ion sodio
<b>K<sup>+</sup></b>	Ion potasio
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion calcio
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Ion cloruro
<b>AID</b>	Alpha Interaction Domain o Dominio de Interacción en Alfa
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>μM</b>	Micromolar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>μL</b>	Microlitros
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>μg</b>	Microgramos
<b>CMV</b>	Promotor del citomegalovirus
<b>NG12B</b>	Proteína quimérica donde se sustituyó el amino terminal y el asa I-II de la subunidad alfa de CaV2.2 en CaV3.1
<b>CRG12Ba</b>	Proteína quimérica donde se sustituyó el asa I-II y el carboxilo terminal de la subunidad alfa de CaV2.2 en CaV3.1, con el motivo VAVIM presente en el IVS6 de los canales HVA

- CRG12Bb** Proteína quimérica donde se sustituyó el asa I-II y el carboxilo terminal de la subunidad alfa de CaV2.2 en CaV3.1, sin el motivo VAVIM presente en el IVS6 de los canales HVA
- NG12BCa** Proteína quimérica donde se sustituyó el amino terminal, el asa I-II y el carboxilo terminal de la subunidad alfa de CaV2.2 en CaV3.1, con el motivo VAVIM presente en el IVS6 de los canales HVA
- NG12BCb** Proteína quimérica donde se sustituyó el amino terminal, el asa I-II y el carboxilo terminal de la subunidad alfa de CaV2.2 en CaV3.1, sin el motivo VAVIM presente en el IVS6 de los canales HVA
- RG12B** Proteína quimérica en donde se sustituyó el asa I-II de la subunidad alfa de CaV2.2 en CaV3.1, sin el motivo VAVIM presente en el IVS6 de los canales HVA, reportada como G12B en Arias *et al.*, 2005.
- VAVIM** Motivo de cinco aminoácidos (Valina, Alanina, Valina, Interleucina y Metionina)

## RESUMEN

Las subunidades  $\beta$  ( $Ca_v\beta$ ) de los canales de calcio dependientes del voltaje de alto umbral (HVA) son esenciales para que la subunidad  $\alpha_1$  ( $Ca_v\alpha_1$ ), formadora del poro, sea expresada en la membrana plasmática, además de regular la dependencia al voltaje, la cinética y la probabilidad de apertura de los canales. Aunque actualmente se sabe con detalle cómo interactúan esas subunidades, se entiende poco de qué forma esa interacción contribuye a la modulación de las propiedades del canal. Aprovechando que las subunidades auxiliares no modifican las características de los canales de bajo umbral (LVA), hemos desarrollado una estrategia quimérica en la cual diferentes dominios de los canales LVA han sido remplazados por regiones homólogas de los canales HVA. En trabajos anteriores se ha mostrado que la sustitución del asa intracelular I-II, sitio de interacción con la subunidad  $\beta$ , del canal LVA  $\alpha_{1G}$  por la contraparte del canal HVA  $\alpha_{1B}$ , le confiere a esta quimera una regulación parcial por las subunidades  $\beta$ . En este trabajo hemos añadido, mediante técnicas moleculares, regiones intracelulares extras a esta quimera para evaluar si bajo estas condiciones se transfiere la modulación completa de las subunidades  $\beta$  de un canal HVA a uno LVA, midiendo la expresión de las proteínas quiméricas en las células HEK 293 mediante el registro electrofisiológico de las corrientes generadas por su activación. La adición del extremo amino terminal solo o en combinación con el extremo carboxilo condujo a la ausencia de corrientes detectables aún coexpresando las subunidades  $\beta$ . Este modelo de estudio de los canales de calcio puede conducir al hallazgo de datos relevantes sobre los mecanismos de su regulación por las subunidades  $\beta$ .

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 MEMBRANAS Y TRANSPORTE

Las membranas celulares son cruciales para mantener la vida de las células. Tal es el caso de la membrana plasmática que define los límites de la célula y mantiene las diferencias esenciales entre el citosol y el ambiente extracelular (Alberts *et al.*, 2008).

En procariontes la estructura está confinada solamente a rodear las células separándolas del medio exterior; en cambio, en los eucariontes esta estructura es también la responsable de la compartimentalización dentro de la célula formando los organelos que son rodeados por al menos una bicapa lipídica (Latorre *et al.*, 1996).

Las membranas biológicas están formadas de una bicapa lipídica anfipática con un espesor de 4-6 nm, en las que están incorporados carbohidratos, diferentes ácidos grasos y proteínas. Dentro de las principales funciones de la membrana están: 1) delimitar y aislar a la célula del medio exterior; 2) servir de anclaje al citoesqueleto, que le ayuda a dar forma a la célula; 3) percibir y traducir señales extracelulares; y 4) controlar la entrada y salida de sustancias (Koolman y Röhm, 2004).

Para permitir el paso de sustancias solubles en agua de un lado a otro de la membrana, se encuentran ancladas en ella proteínas que la dotan con la capacidad de ser permeable a ciertas moléculas, lo que le provee funciones tales como mantener las diferencias entre el medio intracelular y extracelular.

Una generalidad reconocida es que todas las proteínas de transporte son proteínas transmembranales, las cuales contienen múltiples segmentos que atraviesan por completo y varias veces la membrana y que por lo general forman hélices alfa (Lodish *et al.*, 2013).

En la actualidad se reconocen tres tipos de proteínas de transporte en la membrana: bombas impulsadas por ATP, transportadores y canales. Las bombas son ATPasas que usan la energía de la hidrólisis del ATP para mover iones o moléculas pequeñas a través

de la membrana en contra de un gradiente, ya sea químico, eléctrico o ambos. Algunos autores se refieren a tal proceso como transporte activo.

Los transportadores, también llamados acarreadores, mueven una amplia variedad de iones y moléculas a través de la membrana y se han identificado tres tipos de ellos. Los uniportadores transportan un solo tipo de molécula a favor de su gradiente de concentración; por ejemplo, los transportadores de glucosa GLUT (Zhao y Keating, 2007) y el transportador de aminoácidos MCT10 (Halestrap y Meredith, 2004). En el transporte acoplado se involucra a dos o más tipos de moléculas, en el cual el movimiento de un tipo de ion o molécula se realiza en contra de su gradiente de concentración al mismo tiempo que mueven uno u varios iones a favor de su gradiente de concentración, en la misma dirección (simporte) o en diferentes direcciones (antiporte).

Por último, están los *canales*, que transportan desde agua, iones específicos o pequeñas moléculas hidrofílicas a favor de su gradiente químico y/o eléctrico. Debido a que este tipo de transporte no necesita energía, también se le refiere a éste como transporte pasivo o transporte facilitado (Lodish *et al.*, 2013).

## 1.2 GENERALIDADES DE LOS CANALES IÓNICOS

Como ya se describió, los canales iónicos son proteínas de membrana concebidas como poros, los cuales cuando están abiertos permiten el transporte de iones a favor de un gradiente químico y/o eléctrico (Lacinová, 2005).

Los canales tienen la misma relación en la señalización eléctrica en los nervios, los músculos y las sinapsis como las enzimas la tienen para el metabolismo. Aunque su diversidad es menos amplia que la de las enzimas, hay muchos tipos de canales que trabajan de forma conjunta, abriéndose y cerrándose para dar lugar a las señales y respuestas en el sistema nervioso.

Además, el origen aparente de los canales tiene relación con el hecho de que si bien, la membrana celular se originó a partir de múltiples eventos azarosos permitiendo aislar los componentes de la célula del ambiente, ésta evitaba que se llevara a cabo el intercambio tanto de algunos sustratos como desechos ionizados, por lo que era necesario un mecanismo de transporte que permitiese este intercambio y que además conservara las propiedades de la membrana. Sin embargo, a pesar de las muchas hipótesis sobre la

evolución de estos mecanismos de transporte, todos los organismos actuales siguen un diseño más elaborado que, además de ser selectivo, es capaz de ser controlado con base a las necesidades y/o estímulos de la célula.

No obstante, fue hasta 1980 que se logró conocer lo que sabemos hoy en día acerca de la selectividad iónica gracias a trabajos de medición de flujos fisiológicos. Los fisiólogos dividían tradicionalmente el mecanismo de transporte en dos clases, los acarreadores y los poros, divididos en base a criterios de cinética. Por ejemplo, un acarreador era visto como un transbordador que difunde hacia ambos lados de la membrana acarreando pequeñas moléculas que tienen sitios de unión estéreo-específicos, mientras que un poro era visto como un túnel llenos de agua por el cual podían atravesar ciertos iones y pequeñas moléculas lo suficientemente pequeñas para entrar en el poro.

En la actualidad se ha podido distinguir entre ambos tipos de transporte a partir de diferentes técnicas que permiten darnos ideas de cómo o cuál es el mecanismo entre acarreadores y poros. Además, es notoria la gran importancia que los canales y los iones tienen para la excitabilidad de ciertas células, tales como las neuronas y las células musculares (Hille, 2001).

### **1.3 CANALES IÓNICOS EN CÉLULAS EXCITABLES**

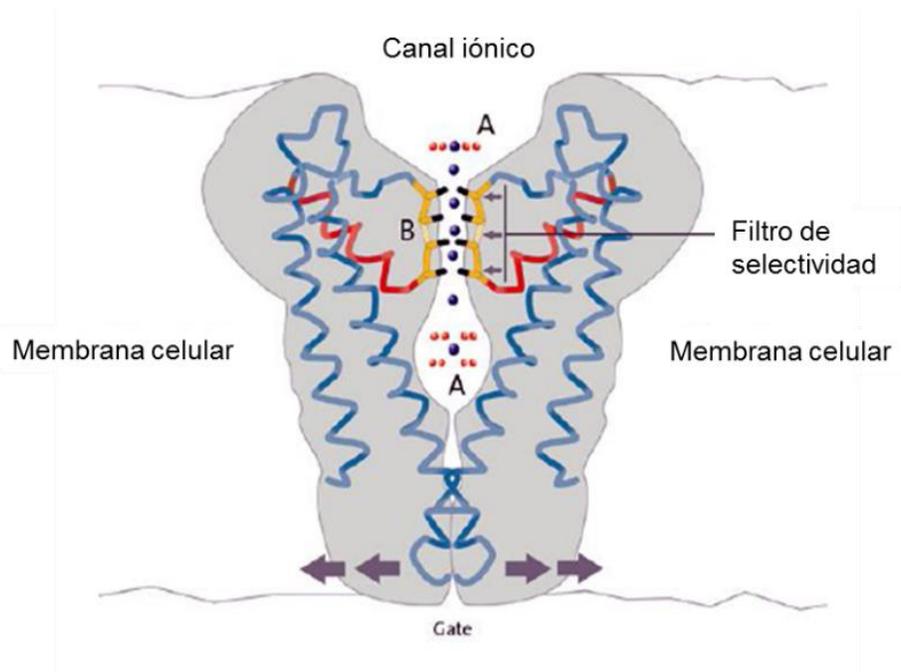
La mayoría de los canales en la membrana plasmática de las células animales y vegetales que conectan al citosol con el exterior de la célula son como túneles, los cuales son poros selectivos que pueden abrirse y cerrarse. Para un transporte eficiente, los canales tienen una ventaja sobre los acarreadores la cual consiste en que pueden pasar hasta  $10^8$  iones por un solo canal abierto en un segundo, alrededor de  $10^5$  veces más que el acarreador más rápido. Por otro lado, los canales no se acoplan a ninguna fuente de energía para llevar a cabo el transporte, por lo que la dirección del flujo siempre es pasivo (a favor de su gradiente de concentración). Por lo tanto, la función de los canales iónicos es la de permitir el paso de iones inorgánicos específicos, basándose en la selectividad del canal, principalmente para  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Cl}^-$ , difundiendo rápidamente a favor de su gradiente de concentración (Ilustración 1). Visto de otra manera, la habilidad para controlar el flujo iónico a través de esos canales es esencial para muchas funciones celulares. Tal es el caso de las neuronas, en donde particularmente se ha especializado el uso de canales iónicos así como una gran diversidad, los cuales permiten recibir, conducir y transmitir señales con otras neuronas.

Los canales iónicos son expresados ubicuamente y controlan el paso de varios iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ ) en las células excitables, tales como miocitos cardiacos y las neuronas. La actividad de los distintos canales iónicos establece el potencial de membrana en reposo y genera potenciales de acción para controlar procesos biológicos esenciales incluyendo la contracción muscular, la liberación de neurotransmisores y la regulación en la expresión génica. En células no excitables, así como en la membrana de los organelos, los canales iónicos controlan el flujo de sales y agua, regulan el volumen celular, así como el pH (Roseto *et al.*, 2003).

Hay aproximadamente 400 genes que codifican para las distintas subunidades de canales iónicos y sus variantes alternativas de splicing. Estos difieren con respecto a su localización subcelular, por sus mecanismos de activación, la modulación por subunidades accesorias, por la selectividad iónica, su papel fisiológico así como por moléculas de señalización (Subramanyam y Colecraft, 2014).

Por otro lado, se puede resaltar que los canales iónicos tienen tres propiedades importantes: la primera es que son capaces de reconocer y ser específicos a ciertos iones; la segunda es que se abren y cierran en respuesta a señales específicas tales como estímulos mecánicos, químicos y eléctricos, aunque existen algunos canales que permanecen abiertos de manera permanente; y la tercera, que pueden conducir iones a través de la membrana (Kandel, 2001)

Así pues, con base al estímulo que abre los canales, se puede agrupar en canales iónicos de fuga (abiertos constitutivamente), otros activados por ligandos específicos (tales como receptores), y otros más son regulados por el cambio en el voltaje (canales iónicos dependientes de voltaje) (Tabassum y Feroz, 2011; Koolman y Röhm, 2004).



**Ilustración 1.** Estructura molecular del canal de potasio KscA, de la bacteria *Streptomyces lividans*, en donde se observa el filtro de selectividad del canal. Como en todos los demás canales, existen determinantes moleculares en el filtro de selectividad que dictaminan el tipo de ión (tamaño y carga) que pasa a través de ellos (Tabassum y Feroz, 2011).

## 1.4 CANALES IÓNICOS ACTIVADOS POR LIGANDO

Los canales iónicos activados por ligando, o receptores ionotrópicos, son un grupo de proteínas de membrana los cuales son abiertos o cerrados en respuesta a la unión de un compuesto químico (un ligando), tal como un neurotransmisor. El vínculo directo entre el sitio de unión al ligando y la apertura o cierre del canal, es contrastado con la función indirecta de los receptores metabotrópicos, los cuales usan segundos mensajeros para llevar a cabo su efecto final.

Con respecto a los receptores ionotrópicos, estos están conformados por proteínas oligoméricas que se ensamblan de tal manera que forman un poro que permite un flujo iónico a través de la membrana postsináptica, y por lo tanto están involucrados en una gran variedad de funciones en el cerebro.

Los sitios de unión del ligando en estos canales están normalmente localizados en una región diferente a donde está localizado el poro conductor del ion; es decir, un sitio de unión alostérico. Dicho receptor ionotrópico es usualmente muy selectivo para uno o más iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Cl}^-$  (Tabassum y Feroz, 2011).

## 1.5 CANALES IÓNICOS DEPENDIENTES DE VOLTAJE

En el caso de los canales activados por voltaje, existe un sensor de varios aminoácidos cargados positivamente que se mueven en el campo eléctrico de la membrana durante la apertura o cierre del canal (Guharay y Sachs, 1984).

Son muy comunes en muchos tipos de células, sin embargo, estos canales son especialmente críticos en las neuronas y en tejidos musculares, permitiendo una despolarización rápida y coordinada en respuesta a cambios provocados en el voltaje. En las neuronas se encuentran a lo largo del axón y en la sinapsis, propagando direccionalmente las señales eléctricas; en las células musculares se encuentran localizados en la placa neuromuscular así como en los túbulos T de la sarcómera (Catterall, 2011).

Los canales iónicos dependientes de voltaje generalmente están conformados de diferentes subunidades, de tal manera que quedan organizados por una subunidad formadora del poro central por el cual se permite el paso de los iones a favor de su gradiente de concentración. Estos canales tienden a ser ion – específicos aunque iones

de tamaño y carga similar pueden pasar a través de ellos, pero con menor afinidad (Tabassum y Feroz, 2011).

## 1.6 CANALES DE CALCIO DEPENDIENTE DE VOLTAJE

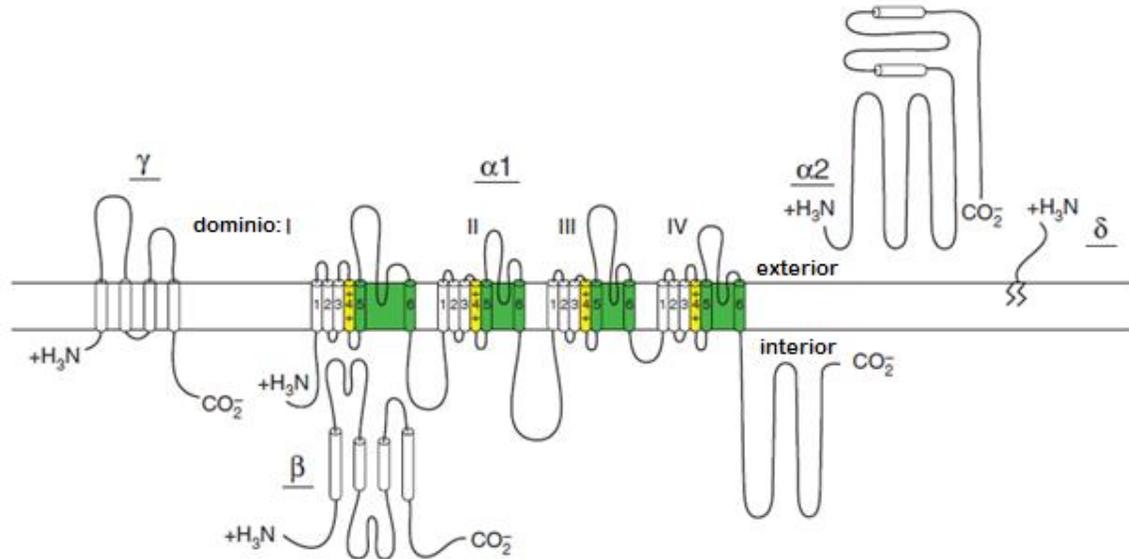
Los gradientes iónicos que se mantienen dentro y fuera de la célula juegan papeles cruciales en muchos procesos biológicos. Tal es el caso del ion  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual regula muchos de los procesos celulares comunes, como lo son la proliferación y la síntesis de proteínas; además, participa en funciones celulares específicas asignándole una gran versatilidad y propiedades de señalización molecular (Barbado *et al.*, 2009). La concentración extracelular de calcio ( $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ) tiene valores de hasta 2 mM, mientras que la concentración intracelular de este ion se mantiene a niveles muy bajos (~100 nM) en condiciones de reposo, pero aumenta súbitamente (10-100  $\mu\text{M}$ ) posterior a un estímulo (Buraei y Yang, 2010).

La concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es mediada por una gran cantidad de proteínas como lo son las bombas iónicas, las proteínas transportadores y en gran medida por canales iónicos (Hernández, 2005). Estas proteínas son de gran importancia ya que controlan un gran rango de procesos fisiológicas (Zamponi, 2005), siendo transductores de señales claves de la excitabilidad eléctrica, convirtiendo la señal eléctrica en potenciales de acción (Catterall, 2011).

Particularmente, los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) son la principal vía de entrada del calcio a la célula y, basado en el voltaje requerido para la activación de éstos canales, son clasificados en canales de bajo umbral y de alto umbral, (LVA y HVA, respectivamente, por sus siglas en inglés). Además los CCDV se clasifican con base en las corrientes generadas, así como en las características electrofisiológicas y farmacológicas, reconociéndose corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo -L, -N, -P/Q, -R y -T (Buraei y Yang, 2010).

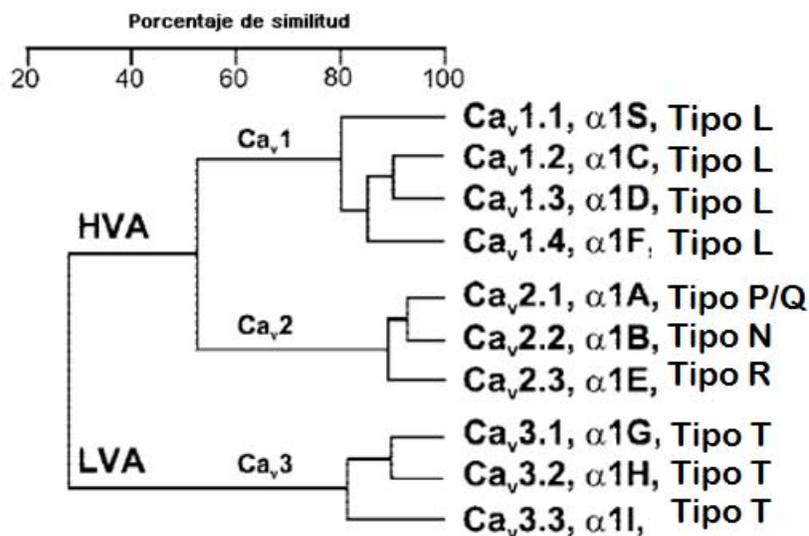
La caracterización de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  empieza con su purificación y clonación a partir del musculo esquelético, lo cual mostró que son complejos multiméricos con subunidades  $\alpha_1$  ( $\text{Ca}_v\alpha_1$ ),  $\alpha_2$  ( $\text{Ca}_v\alpha_2$ ),  $\beta$  ( $\text{Ca}_v\beta$ ),  $\gamma$  ( $\text{Ca}_v\gamma$ ) y  $\delta$  ( $\text{Ca}_v\delta$ ) (Buraei y Yang, 2010). El análisis de las propiedades bioquímicas, de glicosilación y de hidrofobicidad de estas cinco subunidades conduce a comprender un modelo con una subunidad  $\alpha_1$  transmembranal

principal de 190 kDa, en asociación con un dímero  $\alpha_2\delta$  unido por un puente disulfuro de 170 kDa, una subunidad intracelular  $\beta$  fosforilada de 55 kDa y una subunidad transmembranal  $\gamma$  de 33 kDa (Ilustración 2) (Takahashi *et al.*, 1987).



**Ilustración 2. Representación topológica de las subunidades que conforman los canales de calcio dependientes de voltaje (Catterall, 2011).**

De acuerdo a la similitud de su estructura primaria, las distintas subunidades  $\alpha_1$  ( $\text{Ca}_v\alpha_1$ ) se agrupan en tres familias:  $\text{Ca}_v1$ ,  $\text{Ca}_v2$  y  $\text{Ca}_v3$ ; las dos primeras integran la clase de canales HVA y la tercer familia corresponde a los canales LVA. Cada grupo presenta una homología de más del 70% dentro de una misma subfamilia, lo cual define la especificidad dentro de cada una de ellas. Sin embargo, esta homología es  $\leq 50\%$  entre las tres familias de los CCDV (Lacinová, 2005; Ilustración 3). La subunidad  $\alpha_1$  es el principal componente de los CCDV y la única responsable de sus propiedades biofísicas y farmacológicas (Arias, 2009).



**Ilustración 3. Clasificación de los canales de calcio y la nomenclatura utilizada para asignar el nombre a cada subunidad  $\alpha_1$  (modificado de Pérez-Reyes, 2003).**

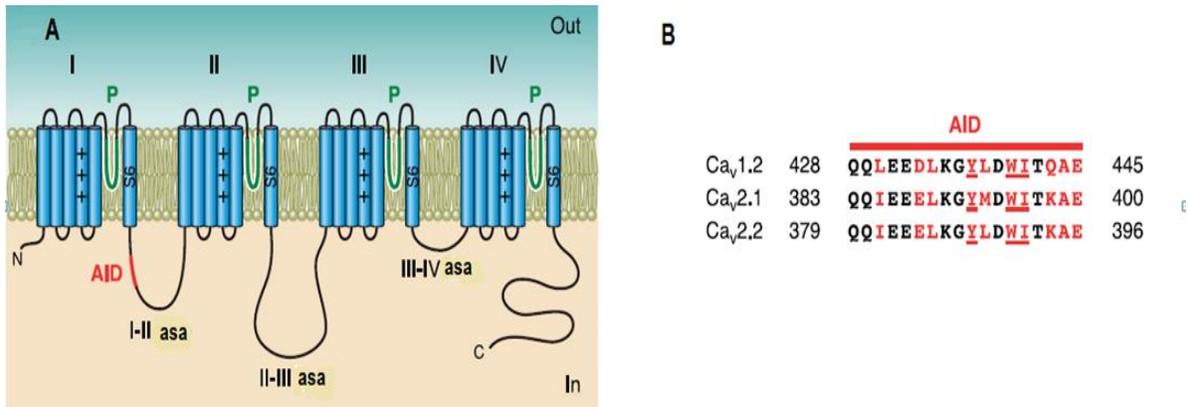
## 1.7 SUBUNIDAD $\alpha_1$

La subunidad  $\alpha_1$  contiene un poro acuoso central situado dentro de la membrana en el que se localiza el filtro de selectividad iónica. Además, esta subunidad determina la dependencia al voltaje del canal, la cual cambia en función del campo eléctrico de la membrana (Jiménez, 2010).

Esta subunidad está formada por 4 dominios homólogos (I-IV), cada uno con 6 segmentos transmembranales (S1-S6), donde el segmento S4 funciona como el sensor de voltaje. El asa del poro P se encuentra localizada entre los segmentos S5 y S6 de cada dominio (Ilustración 4A).

Por otro lado, los extremos amino y carboxilo, así como las 3 asas que unen los dominios I-IV (asas I-II, II-III y III-IV) de las subunidades  $Ca_v\alpha_1$  son intracelulares. De particular importancia en los canales tipo HVA es el asa I-II que presenta: 1) el AID (por Alpha Interacting Domain), una región de 18 aminoácidos de longitud, cuya secuencia está altamente conservada y que es el sitio principal de la interacción de las subunidades

Ca<sub>v</sub>α<sub>1</sub> con las Ca<sub>v</sub>β (Ilustración 4B); y 2) sitios de interacción con las subunidades β/γ de las proteínas G triméricas, que representa un factor crucial en la modulación de los canales Cav presinápticos. En el caso de los canales LVA, a pesar de que se ha demostrado una ligera interacción con las subunidades Ca<sub>v</sub>β, ésta no es crucial para la modulación del canal (Bae *et al.*, 2010).



**Ilustración 4. Topología de la subunidad α de los CCDV.** En el panel A se esquematizan los seis segmentos transmembranales, donde el S4 forma el sensor de voltaje y los segmentos S5 y S6 forman el poro del canal. En el panel B observamos la secuencia de aminoácidos del Dominio de Interacción Alfa (AID), marcados con rojo los que presentan la interacción con la subunidad β (Buraei y Yang, 2010).

## 1.8 SUBUNIDADES β

La purificación de los canales Ca<sub>v</sub>1 y Ca<sub>v</sub>2 demostró una proteína citosólica fuertemente unida que se denominó subunidad β (Ca<sub>v</sub>β). Posteriormente se identificaron un total de 4 proteínas similares las cuales fueron agrupadas en la subfamilia de subunidades Ca<sub>v</sub>β (β1-β4), cada una con variantes de splicing, codificadas por cuatro genes distintos. Todas las subunidades Ca<sub>v</sub>β pueden aumentar fuertemente las corrientes de calcio cuando son coexpresadas en sistemas de expresión heterólogos (Pragnell *et al.*, 1994; Shistik *et al.*, 1995).

Las subunidades Ca<sub>v</sub>β también afectan la dependencia al voltaje y las cinéticas de activación e inactivación. Además, estas subunidades son indispensables para la modulación de los canales Ca<sub>v</sub>1 y Ca<sub>v</sub>2 por las cinasas de proteína, proteínas G triméricas y proteínas G pequeñas RGK (Rem, Rem2, Rad, Gem/Kir) (Varadi *et al.*, 1991;

Chen *et al.*, 2005). No es sorprendente por tanto que animales knockout de  $\beta 1$  y  $\beta 2$  no sean viables, o para el caso de  $\beta 3$  y  $\beta 4$ , que presenten severas patofisiologías.

Basados en el análisis de la secuencia de aminoácidos y estudios funcionales y bioquímicos, se reconoce que las subunidades  $\text{Ca}_v\beta$  contienen cinco regiones distintas. La primera, tercera y quinta son variables en longitud y en la secuencia de aminoácidos, mientras que la segunda y cuarta región están altamente conservadas y son homólogos a los dominios Src homólogo 3 (SH3) y cinasa de guanilato (GK), respectivamente, las cuales son unidas por una región núcleo llamada HOOK (Takahashi *et al.*, 2004).

La existencia de un módulo SH3-HOOK-GK, sitúa a las  $\text{Ca}_v\beta$  en una familia de proteínas llamadas cinasas de guanilato asociadas a membrana (MAGUKs), cuyo papel principal es ser proteínas de anclaje jugando papeles importantes en regiones estructuralmente especializadas tales como la sinapsis u otras uniones celulares (Buraei y Yang, 2010).

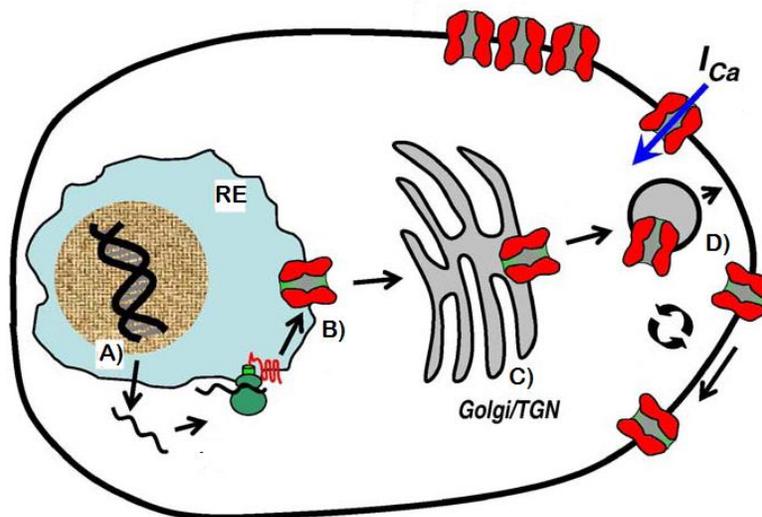
## 1.9 INTERACCIÓN $\text{Ca}_v\alpha$ - $\text{Ca}_v\beta$

En particular, las subunidades  $\beta$  ( $\text{Ca}_v\beta$ ) juegan un papel crucial en el tránsito de los canales hacia la membrana plasmática y en la sintonización, regulación y modulación del canal por otras proteínas y moléculas de señalización, particularmente de los canales HVA (Buraei y Yang, 2010). Además, las subunidades  $\text{Ca}_v\beta$  controlan la activación, inactivación y probablemente la apertura del canal, la farmacología y la expresión en la superficie celular (Arias *et al.*, 2005).

La afinidad de la interacción  $\text{Ca}_v\alpha_1$ - $\text{Ca}_v\beta$  varía, dependiendo de las subunidades que se traten o del método con el que se lleve a cabo dicha medición, sin embargo, se estima que la  $K_d$  de esta interacción oscila desde 24 hasta 62 nM (AID: $\text{Ca}_v\beta$ ; Bae *et al.*, 2010). Como se mencionó anteriormente, la secuencia del AID está conservada entre las familias  $\text{Ca}_v1$  y  $\text{Ca}_v2$ , pero no para los miembros de la familia  $\text{Ca}_v3$ . El AID interacciona en una estequiometría de 1:1 con la subunidad  $\beta$ , a través de una extensa y altamente conservada hendidura hidrofóbica nombrada cesta de unión a alpha (ABP, Alpha Binding Pocket; Van Petegem *et al.*, 2004)

## 1.10 LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE EN ENFERMEDADES GENÉTICAS

Una de las rutas más importante de la entrada de calcio a las células excitables es a través de los CCDV. Este catión se encarga de controlar, entre muchos procesos fisiológicos, la expresión génica. Sin embargo, a partir de la década pasada, varios trastornos hereditarios en los humanos se han relacionado con mutaciones en los genes que codifican para los CCDV. Estas enfermedades genéticas son designadas como “canalopatías de calcio” donde se incluye cualquier alteración en la función de los CCDV, desde la biogénesis de la proteína hasta su exportación a la membrana (Ilustración 5). Hay varios tipos de desórdenes, esencialmente musculares y neurológicos, donde se involucran varios genes de los CCDV (Bidaud *et al.*, 2006), considerándose de mayor importancia aquellas canalopatías que afectan al sistema nerviosos central (Jiménez, 2010).



**Ilustración 5.** Esquema que indica el nivel subcelular al que los CCDV están involucrados en las canalopatías. Se sugiere que las canalopatías de calcio afectan cualquier proceso celular que involucre a la biogénesis y tráfico a la membrana plasmática de los CCDV. La alteración en la función de estos canales puede originarse desde: A) La transcripción y traducción del gen; B) el ensamble y empaquetamiento en el retículo endoplásmico (RE); C) así como la maduración de la proteína en el aparato de Golgi; D) una vez en la membrana plasmática los defectos varían desde la compartimentación, agrupamiento o anomalías en su reciclaje. (Modificado de Bidaud *et al.*, 2006).

## 2. ANTECEDENTES

Se ha señalado mucho acerca de la importancia del ion  $\text{Ca}^{+2}$  y su participación en una gran variedad de funciones celulares. Entre las actividades en las que participa comúnmente están: intervención en vías como segundo mensajero, proliferación celular, síntesis de proteínas y diferenciación celular. Sin embargo, está relacionado a funciones específicas como lo es la contracción muscular, además de su función como neuromodulador en la excitabilidad eléctrica y la plasticidad sináptica. La asociación entre el  $\text{Ca}^{+2}$  y la regulación de la expresión génica ha incrementado el interés en los canales de  $\text{Ca}^{+2}$ , sobre todo en los dependientes de voltaje, para los cuales se ha demostrado participan en varias rutas de la regulación génica (Barbado *et al.*, 2009).

Por otro lado, se ha demostrado que en los  $\text{Ca}_v$  tipo HVA, la subunidad  $\beta$  junto con la calmodulina (CaM) se unen al asa I-II y al extremo terminal carboxilo, respectivamente, desempeñando un papel importante en los procesos de inactivación dependiente del voltaje (VDI), la inactivación dependiente de calcio (CDI) y la facilitación dependiente de calcio (CDF) (Halling *et al.*, 2005). No obstante, la importancia recae principalmente en la subunidad  $\beta$  la cual afecta las propiedades de flujo y regulación del canal. La secuencia primaria de esta subunidad  $\text{Ca}_v\beta$  codifica cinco dominios, organizado en V1-C1-V2-C2-V3. Los dominios V1, V2 Y V3 son variables, mientras que los dominios C1 y C2 se encuentran conservados. Los dominios C1-V2-C2 forman el núcleo funcional de la subunidad. A partir de esto, se recalca que el sitio de interacción entre las subunidades  $\text{Ca}_v\beta$ - $\text{Ca}_v\alpha_1$  es una región conservada, compuesta de 18 aminoácidos, localizada en el asa I-II de algunos  $\text{Ca}_v$  llamada AID (Alpha Interacting Domain) (Minor y Van Petegem, 2006).

Bajo el entendido de que el AID se localiza en el asa que une a los dominios I-II de los canales HVA, además de que es el sitio de interacción con las subunidades  $\beta$ , y tomando como estrategia a las proteínas quiméricas, se generó el canal quimérico G12B en donde se sustituyó el asa I-II de la subunidad  $\alpha_1$   $\text{Ca}_v3.1$  por la misma región de  $\text{Ca}_v2.2$ . Los resultados mostraron que se transfirió parcialmente la regulación por las subunidades  $\text{Ca}_v\beta$ , esto fue, desplazando el potencial de activación hacia potenciales más negativos, así como un ligero enlentecimiento en la inactivación del canal. Sin embargo, la subunidad que tuvo mayor efecto en regular a la quimera fue la subunidad  $\beta_{2a}$ , aunque no de manera

tan marcada como con los canales HVA, por lo que se sugiere que la simple adición del AID no es suficiente y que tal vez existen otras regiones de interacción entre ambas subunidades que juegan un papel importante, participando en la función correcta del canal, particularmente los HVA (Arias *et al.*, 2005).

Asimismo se ha encontrado que la sustitución del extremo carboxilo terminal del canal Cav3.1 por el de Cav1.2 disminuye dramáticamente la cinética de inactivación de las corrientes del canal quimérico, lo que sugiere que el extremo carboxilo terminal de los canales Cav3.1 contienen un elemento crítico que media la inactivación rápida (Staes *et al.*, 2001).

Un fenómeno parecido ocurre al intercambiar la mayor parte de las asas I-II entre los canales Cav1.2 y Cav2.3, quimeras en las cuales el fenotipo principal de la activación es la del canal del cual proviene el asa I-II. Estos datos en conjunto sugieren que los dominios de las diferentes subunidades Cav $\alpha_1$  de los canales tipo HVA funcionan de forma independiente, y que la regulación que se obtiene al asociarse la subunidad Cav $\beta$  lo determinará el contexto de las regiones que unen los diferentes dominios (González *et al.*, 2010).

Si bien la subunidad  $\beta$  de los CCDV regula muchas de las propiedades biofísicas del canal, la misma subunidad  $\alpha_1$  contiene elementos que regulan su función. Particularmente, en la región proximal del carboxilo terminal de los canales HVA, se conserva un motivo cuya función resulta en la modulación de la cinética de inactivación de estos canales. Dicho motivo está formado por cinco aminoácidos: Valina, Alanina, Valina, Isoleucina y Metionina (VAVIM), y la mutación de alguno de estos aminoácidos resulta en una inactivación rápida o lenta del canal. Sin embargo, dicho motivo podría no solo jugar un papel importante en la cinética de inactivación del canal, sino que también puede estar involucrado con algún otro proceso no descrito todavía (Raybaud *et al.*, 2007).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El calcio es un mensajero intracelular por excelencia, que requiere de un control fino en sus niveles citoplasmáticos para mediar los distintos procesos en que interviene. Así, aunado a que existen otros mecanismos involucrados en la regulación del calcio intracelular tales como las bombas e intercambiadores, los CCDV representan una de las vías más importantes de influjo de calcio.

Sin embargo, la alteración de los CCDV puede provocar enfermedades denominadas canalopatías de calcio que consisten en la alteración de las propiedades biofísicas de los CCDV originado ya sea por una transcripción errónea del gen codificante, por splicing alternativo inadecuado, o a nivel del retículo endoplásmico rugoso o en el aparato de Golgi durante la maduración de la proteína. En la membrana plasmática pueden cambiar sus propiedades electrofisiológicas intrínsecas a partir de una distribución errónea o un mal agrupamiento dentro de ésta, además de las posibles anomalías en su reciclaje y/o degradación.

Es por esto que el conocimiento de la estructura y función de los canales  $Ca_v$  es de suma importancia ya que esas proteínas están involucradas de forma íntima en la fisiología de las células que constituyen, entre otros, sistemas como el cardio-vascular y el nervioso. Dichos canales juegan papeles importantes, tales como la duración, amplitud y propagación de los potenciales de acción, el establecimiento de la frecuencia de disparo neuronal (marcapaso) y la liberación de neurotransmisores en las sinapsis químicas.

En algunos casos se ha reportado que los defectos en la función del canal se deben a alteraciones en los sitios de interacción de la subunidad  $\alpha_1$  con las subunidades auxiliares o con proteínas que regulan al canal. La lista de enfermedades asociadas con la alteración en la función de los componentes proteicos de los  $Ca_v$  es larga, e incluye padecimientos como la ceguera nocturna estacionaria congénita, la hipertensión, fallas cardíacas, la migraña hemipléjica familiar, la epilepsia de ausencia infantil, el síndrome de Timothy, la ataxia espinocerebral tipo 6, la ataxia episódica tipo 2, etc. (Liao *et al.*, 2009)

Desafortunadamente, los estudios en proteínas de membrana representan un reto mayor y son comparativamente pocas las estructuras conocidas para este tipo de moléculas.

Resalta en ellos la determinación de la estructura de algunos canales iónicos mediante técnicas como la cristalografía de rayos X o la resonancia magnética nuclear (NMR).

La sola determinación de la conformación tridimensional de una proteína no proporciona la información precisa, sin ambigüedades, de sus relaciones estructura-función, por lo que es evidente que aún falta mucho tiempo para que dispongamos de la información de la estructura de la mayoría de las proteínas de interés biológico y médico.

#### **4. HIPOTESIS**

Al reemplazar, los extremos amino y carboxilo, además del asa I-II de la subunidad  $Ca_v\alpha_1$  de un canal  $Ca_v2.2$ , a un canal  $Ca_v3.1$ , se transferirá la regulación completa y característica de las subunidades  $Ca_v\beta$ .

## 5. OBJETIVOS

A partir de la quimera RG12B (Arias *et al.*, 2005), cuya base es la  $Ca_v\alpha 3.1$  y en la cual se sustituyó el asa I-II de la  $Ca_v\alpha 2.2$ , se proponen los siguientes objetivos:

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Transferir simultáneamente los extremos amino y carboxilo terminales de la  $Ca_v\alpha 2.2$  en la proteína quimérica RG12B y determinar la capacidad funcional que tienen las subunidades  $Ca_v\beta$  para regular este nuevo canal quimérico.

### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Utilizar como molde el ADN de la proteína quimérica RG12B y sustituir las secuencias que generan el extremo amino y el extremo carboxilo de la subunidad  $Ca_v\alpha 2.2$ , generando así distintas proteínas quiméricas.
2. Transfectar las proteínas quiméricas sola o en combinación con las subunidades  $Ca_v\beta$ , en la línea celular HEK293 T.
3. Evaluar la función de la proteína quimérica a partir del registro electrofisiológico (patch clamp en la configuración de célula completa o whole cell), analizar las propiedades biofísicas de cada canal quimérico y comparar tales datos con las propiedades de canal RG12B.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

Para cumplir con el objetivo del presente trabajo, se realizaron dos quimeras entre la subunidad  $\alpha_1$  del canal de calcio Tipo N ( $\text{CaV}\alpha_12.2$ ), y la subunidad  $\alpha_1$  del canal de calcio tipo T ( $\text{CaV}\alpha_13.1$ ). Cabe mencionar que al inicio del presente trabajo ya se contaba con las quimeras en las cuales se habían sustituido los extremos amino y carboxilo en la quimera RG12B pero de manera independiente (es decir, el amino terminal de  $\text{Ca}_v2.2$  en RG12B, dando por resultado la quimera NG12B; y dos modalidades del carboxilo terminal de  $\text{Ca}_v2.2$  en RG12B, dando lugar a las quimeras CRG12Ba y CRG12Bb). Sin embargo, antes de realizar cualquier maniobra experimental, solo se realizó un análisis de restricción de las construcciones ya mencionadas y de esta manera realizar la sustitución simultánea de ambos extremos en RG12B (Arias *et al.*, 2005).

### 6.1 DIGESTIONES, PURIFICACION DE ADN PLASMÍDICO Y LIGACIONES

Todas las digestiones que permitieron identificar la composición del plásmido (con base en los fragmentos generados), fueron llevadas a cabo de la siguiente manera: en un volumen de 10  $\mu\text{l}$  se añadió 1  $\mu\text{l}$  del regulador de reacción 10 $\times$ , 4 U de enzima, dependiendo de la enzima se añadió 1  $\mu\text{l}$  de BSA 10 $\times$ , 1  $\mu\text{l}$  de plásmido y agua deionizada suficiente para 10  $\mu\text{l}$ , incubadas al menos 4 h a 37 °C (o dependiendo de la temperatura óptima de la enzima a otra diferente). Las digestiones de las cuales se purificaba algún fragmento se realizaron considerando obtener al menos 300 ng de dicho fragmento, en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  respetando las proporciones arriba mencionadas, es decir, 5  $\mu\text{l}$  de regulador de reacción 10 $\times$ , 4 U de enzima, BSA 10 $\times$  de ser requerido, ADN plasmídico y agua suficiente para 50  $\mu\text{l}$ .

La purificación tanto de plásmidos como de fragmentos de ADN se realizaron utilizando los kits comerciales GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) y GeneJET Plasmid DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) respectivamente, que en ambos casos se purifican por columnas de sílica de alta afinidad.

Con respecto las ligaciones, todas se realizaron respetando una relación molar de 3:1 entre inserto:vector, quedando de la siguiente manera: 2  $\mu\text{l}$  de buffer de reacción 10 $\times$ , 2.5

U de ligasa T4, fragmentos de ADN a ligar (100-200 ng en total) y agua suficiente para 20  $\mu$ l.

## 6.2 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Una vez obtenidas las diferentes clonas se procedió a amplificarlas por medio de la transformación de bacterias competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . La transformación de estas bacterias se realizó por choque térmico (Seidman *et al.*, 1997) cuyo protocolo consiste brevemente en lo siguiente: incubación en hielo (30 min); choque térmico (40 s a 42 °C); incubación en hielo (2 min); adición de medio LB s/antibiótico (200  $\mu$ L) e incubación durante 1 h; finalmente se sembraron en una placa de agar que tenía ampicilina o kanamicina en el medio a concentraciones de 100 y 25  $\mu$ g/ml, respectivamente, esto con el fin de identificar las transformantes positivas (aquellas que habían incorporado el plásmido). Después de 16-20 h de incubación, se identifican las colonias resistentes y se sembraron en tubos de ensayo con 5 ml de medio LB enriquecido con el antibiótico apropiado e incubadas 16 h con agitación constante (200 rpm); finalmente se procedió a la extracción de ADN plasmídico por miniprep por lisis alcalina (Birboim, 1983). Los plásmidos fueron identificados por análisis de restricción. La concentración de cada plásmido se determinó por espectrofotometría (equipo Epec<sup>TM</sup> con la microplaca TAKE3 a 260 y 280 nm, con una relación entre ambas lecturas >1.90) y por densidad óptica relativa en electroforesis en gel de agarosa (ImageLab).

## 6.3 IDENTIFICACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES CRG12Ba, CRG23Bb y NG12B

Para poder diferenciar las construcciones CRG12Ba y CRG12Bb, se realizó una amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que genera un fragmento de 2,555 pb (para el caso de CRG12Ba), que contiene al carboxilo terminal de nuestro canal quimérico. Brevemente, los oligonucleótidos utilizados fueron: en sentido, GACGAGGCTCTGAAGATCTG y antisentido, GCGGCCGCTCAGCACCAAGTGATCCTGTCTG, y las reacciones de PCR se realizaron mezclando: 5  $\mu$ l de buffer de reacción (5x), 1  $\mu$ l de dNTPs (5 mM cada uno), 0.5 U de la polimerasa de ADN *Taq*, 1  $\mu$ l de oligonucleótido en sentido y 1  $\mu$ l de oligonucleótido en antisentido (10  $\mu$ M cada uno), 0.5  $\mu$ l de molde (ADN plasmídico purificado por miniprep, ~ 100 ng por reacción) y agua suficiente para 25  $\mu$ l. En dicho amplicón puede estar presente o ausente la secuencia que codifica para el motivo VAVIM (TTGCTGTGATCATGG), y en éste hay un sitio de

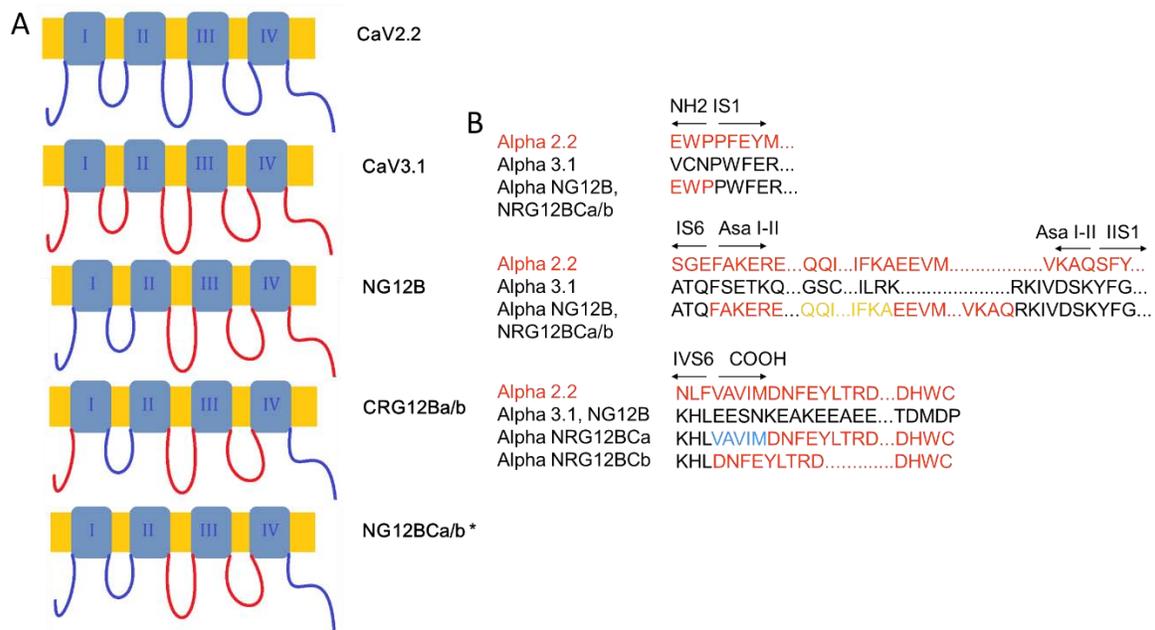
restricción para la enzima BclI (resaltado en negritas). Es decir, si nuestro amplicón era susceptible de ser cortado por la enzima, entonces pertenecía a la construcción CRG12Ba, pero si no fuese así, el amplicón pertenecería a la construcción CRG12Bb.

Por otro lado, solo se realizó el análisis de la quimera NG12B tras digerir el plásmido con las enzimas NsiI y HindIII.

#### 6.4 CONSTRUCCIÓN DE LA SUBUNIDAD QUIMÉRICA $\alpha$

Para la construcción de las quimeras, así como para analizar cualquier plásmido, se realizaron ensayos *in silico* con el software A Plasmid Editor (ApE; Davis, 2013) que nos permitió identificar los sitios correspondientes a los extremos amino y carboxilo terminales en las quimeras ya descritas y así diseñar la mejor estrategia para llevar a cabo el objetivo, lo que consistió básicamente en digerir (con enzimas de restricción) y ligar (ligasa de ADN T4) los fragmentos que contengan los dominios de nuestro interés.

Como ya se mencionó, las quimeras se diferenciaban en los dominios sustituidos resumidos en la ilustración 6. Una de ellas contenía el asa I-II y el extremo amino terminal del Cav $\alpha$ 2.2, y las otras dos contenían el extremo carboxilo terminal completo de la Cav $\alpha$ 2.2, pero a una de ellas se le eliminó 5 aminoácidos que constituyen el motivo VAVIM, el cual se ha descrito que tiene un papel importante en las propiedades electrofisiológicas del canal.



**Ilustración 6. Representación topológica de las quimeras entre CaV2.2 y CaV3.1. En el panel A se observa en color azul las asas intracelulares que pertenecen a la subunidad CaV2.2 y que son sustituidas en la misma región en la subunidad 3.1 (se marca con “\*” las clonas que se realizaron en el presente trabajo. En el panel B tenemos la secuencia de aminoácidos de las diferentes quimeras indicando el lugar preciso donde se llevó a cabo la sustitución.**

Las quimeras se identificaron como NG12B, CRG12Ba y CRG12Bb, las cuales correspondían a la quimera RG12B con la región amino, carboxilo c/VAVIM y carboxilo s/VAVIM, respectivamente, y se insertaron en el vector de expresión HE4 (vector pcDNA3 modificado) en donde se incluye los promotores CMV, T7 y Sp6 que nos permite expresar nuestras proteínas quiméricas en células eucariotas o transcribir el ARNc para su inyección en ovocitos de *Xenopus*.

La estrategia para generar las construcciones que son objeto de la presente tesis, fue la siguiente: existe un sitio Nsil a 3,000 nucleótidos del inicio de la secuencia codificante (CDS) el cual está presente en las construcciones anteriormente mencionadas (NG12B, CRG12Ba y -b), que junto con otros sitios de restricción que flanquean el inicio y fin de la CDS, nos permite intercambiar regiones completas entre ellas, por ejemplo, tras digerir NG12B con HindIII y Nsil, tenemos la región que corresponde al amino modificado y tras digerir las quimeras CRG12Ba y -b con Nsil y NotI podemos obtener la región que

contiene el carboxilo modificado. Así que se realizó la ligación de dichos fragmentos y se comprobó por medio de análisis de restricción las construcciones finales NG12BCa y NG12BCb.

Sin embargo, para la construcción de la quimera NG12BCa se utilizó una estrategia diferente debido a que de la manera anterior no se logró obtenerla. Dicha estrategia consistió en intercambiar el fragmento que está flanqueado por dos sitios de restricción de la enzima Bsu36I entre las quimeras NG12BCb (la cual se pudo obtener con la estrategia con Nsil) y la quimera CRG12Ba; es importante mencionar que en dicha región se encuentra el motivo VAVIM. La nueva quimera se comprobó por análisis de restricción y por la reacción de PCR realizada anteriormente.

## 6.5 CONSTRUCCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS CON LA SUBUNIDAD $\beta$

Se generaron plásmidos bicistrónicos para las subunidades  $\beta$ 2a y  $\beta$ 3 con la proteína verde fluorescente en el vector pIRES2-EGFP, de tal manera que la secuencia codificante para cualquiera de las subunidades se encontraba al comienzo del transcrito y antes de la secuencia IRES y posteriormente se encuentra la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente, cuya fluorescencia se ha intensificado (EGFP). La expresión de la EGFP fue utilizada como gen reportero de aquellas células que fueron transfectadas exitosamente.

Todas las construcciones fueron confirmadas por análisis de restricción y por secuenciación para descartar alguna modificación diferente a la deseada.

## 6.6 TRANSFECCION EN CÉLULAS HEK 293T

Las células derivadas de riñón de embrión humano 293 T (Human Embryonic Kidney, HEK293T) fueron mantenidas en medio DMEM con 10% de suero bovino fetal a 37 °C en una incubadora humificada con 5% de CO<sub>2</sub>. La transfección fue transitoria con el ADN plasmídico que codifican para las subunidades quiméricas RG12B, NG12B, NG12BCa y NG12BCb, así como con las proteínas  $\beta$ 2a y  $\beta$ 3, esto para poder probar su papel regulador sobre las subunidades  $\alpha$  quiméricas (ilustración 6). Las cotransfecciones se realizaron en proporciones de 1:3 (subunidad  $\beta$ : quimera), basándonos en el protocolo de Reed *et al.* (2006) con polietilenimina (PEI, 25 kDa).

**Tabla 1. Condiciones experimentales que se realizaron en el siguiente trabajo.**

<b>Condiciones probadas</b>	<b>RG12B</b>	<b>NG12B</b>	<b>NG12BCa</b>	<b>NG12BCb</b>
<b>Sin <math>\beta</math></b>	X	X	X	X
<b>c/<math>\beta</math>2a</b>	-	X	X	X
<b>c/<math>\beta</math>3</b>	-	X	X	X

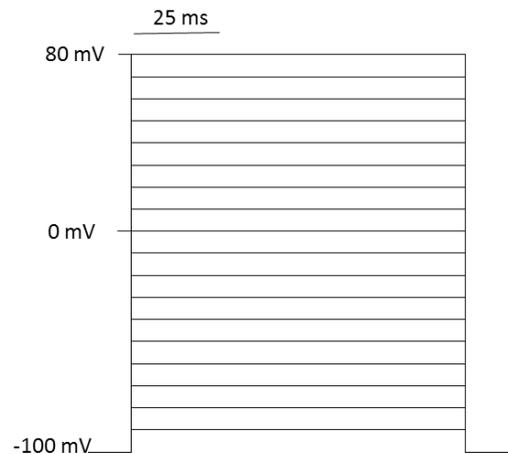
En todas las condiciones existió una cotransfección, en el caso de evaluar a la subunidad sola, ésta se cotransfectaba con el vector solo (pIRES2\_EGFP), en las demás condiciones fue con alguna subunidad  $\beta$ . Cabe señalar que en todos los casos se transfirió una cantidad total de 1.5  $\mu$ g de ADN plasmídico.

El procedimiento de la transfección fue el siguiente: una vez obtenido el volumen en el cual se tiene 1.5  $\mu$ g de ADN se añaden 6 volúmenes de PEI, se mezclan por vortex durante 10 s y se incuban durante 10 min; posteriormente se le añadió 50  $\mu$ l de NaCl (150 mM) y se incubó durante 30 min, todo lo anterior a temperatura ambiente. Una vez obtenida dicha mezcla se le añadió a  $\sim 10^6$  células, las cuales fueron colocadas previamente en cajas Petri de cultivo (35 mm) un día antes de la transfección. Después de 24-72 h posteriores a la transfección, aproximadamente  $10^3$  células fueron sembradas en cámaras de registro precubiertas con poli-L-lisina e incubadas al menos 1 h antes de su uso. Las células transfectadas fueron identificadas por epifluorescencia utilizando la GFP como marcador al momento del registro.

## 6.7 REGISTRO ELECTROFISIOLÓGICO

Las células HEK transfectadas fueron registradas en fijación de voltaje utilizando la configuración en célula completa. Todas las corrientes fueron obtenidas en solución externa que consistió en (mM): 5 CaCl<sub>2</sub>, 166 TEACl, 10 HEPES y el pH fue ajustado a 7.4 con TEA-OH. La solución de la pipeta contenía (en mM): 125 CsCl, 10 EGTA, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 4 Mg-ATP, 0.3 NaGTP y 10 de HEPES, el pH fue ajustado a 7.2 con CsOH. Las pipetas de registro con resistencias de 5-10 MΩ se llenaron de solución interna. La resistencia en serie de las pipetas fue compensada al menos al 60%. La densidad de la corriente fue calculada con la corriente al pico y dividida entre la capacitancia de la célula.

El protocolo para evaluar la función de los canales quiméricos fue midiendo la corriente generada a diferentes potenciales de prueba (mV), es decir, la relación corriente – voltaje, el cual consistió en mantener a las células a un potencial de -100 mV (Vh), y se aplicaron pulsos cuadrados con incremento de 10 mV desde -90 a +80 mV, de 200 ms de duración, cada 5 s entre cada pulso (ilustración 8).



**Ilustración 7. Protocolo de pulsos cuadrados con el cual se analizó la funcionalidad de las quimeras generadas.**

Los registros se obtuvieron usando un amplificador Axopatch 200A, conectado a una interfase Digidata 1400 adquiriendo los registros con el programa WinWCP V4.7.3 (University of Strathclyde).

## 6.8 ANÁLISIS DE DATOS

La adquisición de datos fue mediante el programa WinWCP V4.7.3 (University of Strathclyde) y el análisis de éstos se realizó usando el software pClamp 10.4 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA); los datos resultantes fueron ajustados con el programa SigmaPlot 12 (Systat Software, San José, CA, USA) y la elaboración de las gráficas fue por medio de Prism 4.0 (GraphPad Software inc., San Diego, CA, EUA).

La activación dependiente de voltaje se calculó con el uso de la siguiente fórmula:

$$I = \frac{G_{max}(V_m - V_{rev})}{1 + \exp\left(\frac{V_{50} - V_m}{k}\right)}$$

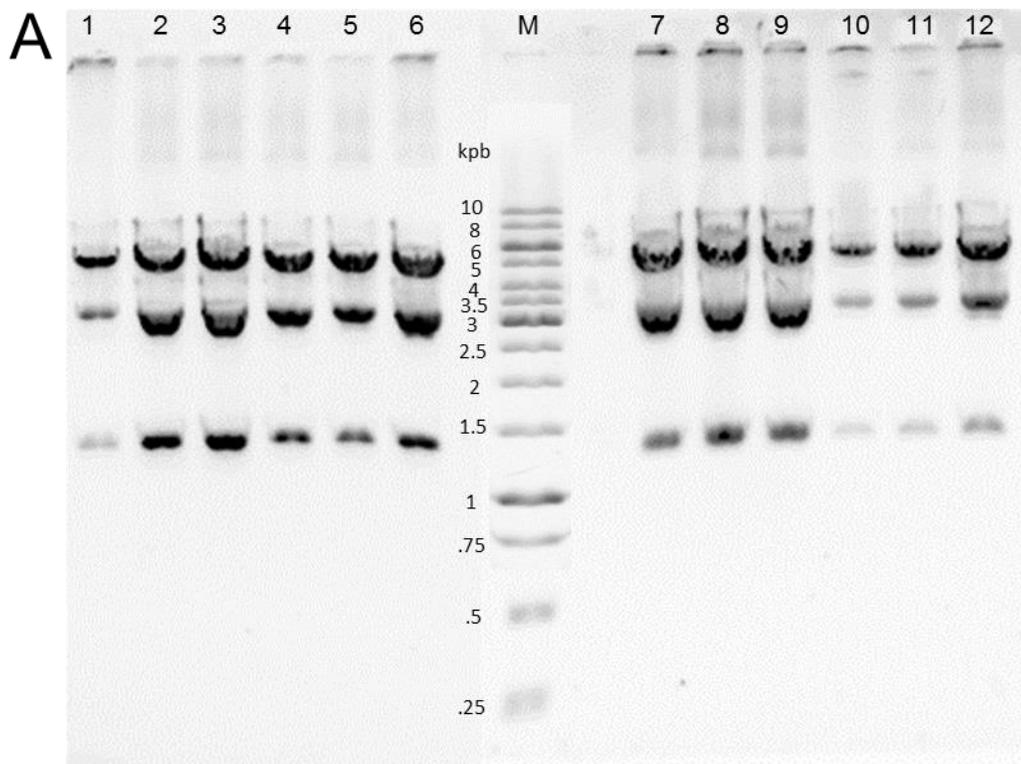
Donde  $I$  es la corriente en cada potencial probado,  $G_{max}$  es la conductancia máxima,  $V_m$  es el potencial de membrana,  $V_{rev}$  es el potencial aparente de inversión,  $V_{50}$  es el potencial de activación media y  $k$  es el factor de pendiente. La conductancia fue calculada usando una forma modificada de la ley de Ohm:

$$G = \frac{I}{V_m - V_{rev}}.$$

## 7. RESULTADOS

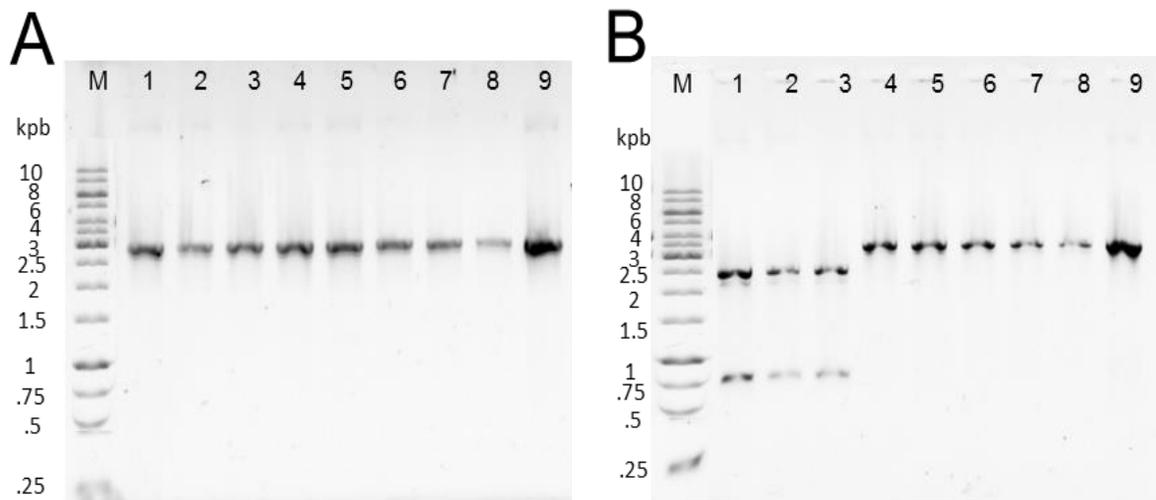
### 7.1 PROTEÍNAS QUIMÉRICAS ENTRE $Cav\alpha 2.2$ Y $Cav\alpha 3.1$

Al comienzo de este trabajo ya se contaba con las construcciones NG12B, CRG12Ba y CRG12Bb. Sin embargo, fue necesario realizar un análisis de restricción de dichos plásmidos para comprobarlo. Fue así como primero se digirieron las construcciones CRG12Ba y CRG12Bb con EcoRI, que genera tres fragmentos con los siguientes tamaños: 7,529, 3,662 y 1,322 pb (ilustración 8).



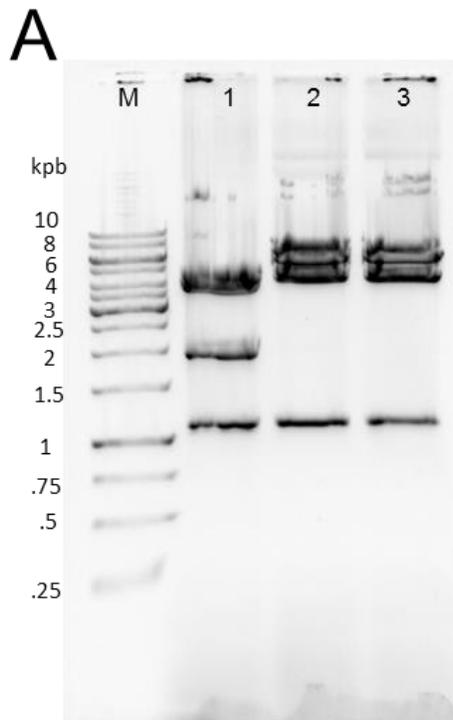
**Ilustración 8.** Digestión de los plásmidos CRG12Ba y CRG12Bb con EcoRI. En esta figura se muestra la fotografía de un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio (EtBr) a una concentración de 250 ng/ $\mu$ l. En los primeros seis carriles (1-6) se tiene a la construcción CRG12Ba (al lado izquierdo del marcador de peso molecular, M), y los siguientes seis carriles (7-12), son la digestión de la construcción CRG12Bb.

Debe resaltarse que aunque ambas clonas parezcan ser iguales, existe una ligera diferencia entre ellas (anteriormente mencionada), 15 nucleótidos (TTGCTGT**GATCAT**G) que codifican para el motivo VAVIM, y para comprobarlo se realizó una amplificación del ADN por la PCR que genera un fragmento de 2,555 pb, en donde se incluye tal motivo y además se encuentra un sitio de restricción para la enzima BclI (letras en negritas en la secuencia VAVIM), y cuya digestión dará como resultado dos bandas (en el caso de contener el sitio BclI) de 1,903 y 652 pb (ilustración 9).



**Ilustración 9. Caracterización de las clonas CRG12Ba y CRG12Bb.** En el panel A y B se muestran geles de agarosa al 0.8% teñido con EtBr. En el panel A se observa una banda de aproximadamente 2.5 kpb en cada carril, siendo el producto de PCR con las dos clonas CRG12Ba y CRG12Bb. En el panel B se muestra la digestión con la enzima BclI de dicho producto. En los carriles 1-3 tenemos el amplicón digerido generando dos bandas confirmando su procedencia de la clona CRG12Ba. En los carriles 4-9, no se digirieron las muestras, lo cual confirma que son productos amplificados de la clona CRG12Bb.

Para la identificación de la construcción donde la región amino ha sido modificada, se realizó un análisis de restricción con las enzimas HindIII y NsiI, cuya digestión *in silico* nos indica que se generan seis fragmentos de 4,502, 4,286, 2,086, 1,062, 72 y 19 pb. Además, se incluye una digestión adicional de las quimeras CRG12Ba y CRG12Bb con las enzimas NsiI y NotI, con un patrón de cinco fragmentos de 6,649, 4,716, 1,062, 72 y 14 pb, dando lugar a la estrategia que se tomó para generar las construcciones finales y la cual se menciona en la siguiente sección (ilustración 10).



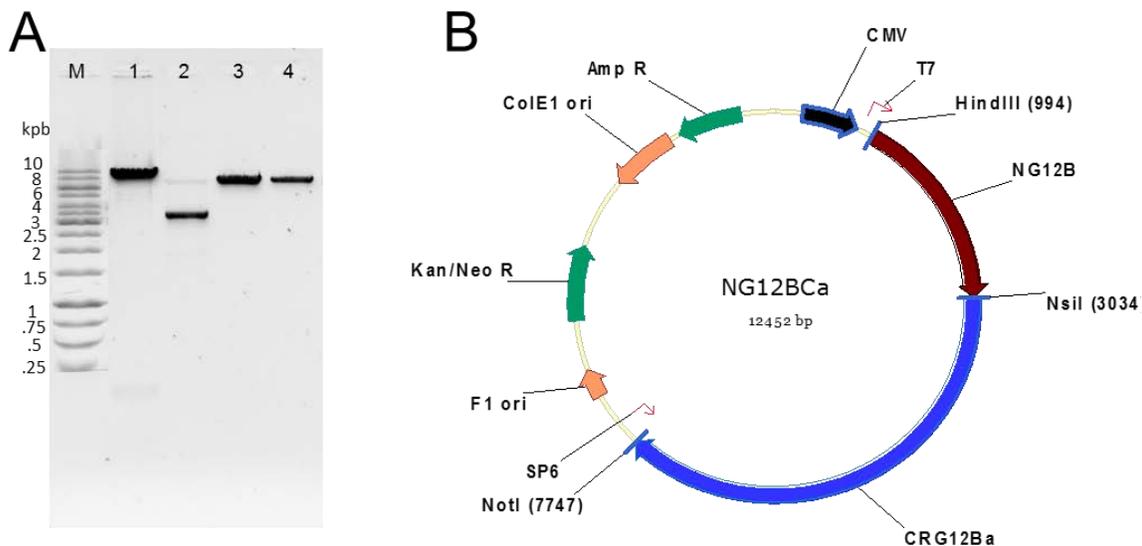
**Ilustración 10. Caracterización de las clonas NG12B, CRG12Ba y CRG12Bb. En esta figura se muestra la fotografía de un gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr. En el carril 1 se muestra la digestión de NG12B con las enzimas HindIII y NsiI; y en el carril 2 y 3 tenemos la digestión de las clonas CRG12Ba y CRG12Bb con las enzimas NsiI y NotI.**

Cabe mencionar que no es posible observar todas las bandas en el gel de agarosa debido a que las bandas de bajos pesos moleculares (< 100 pb) migran mucho más rápido que las bandas más grandes, aunado al hecho de que la sensibilidad de la técnica requiere bandas de al menos 10 ng para que puedan ser detectadas, lo cual no se obtiene dada la cantidad inicial del plásmido incluido en la digestión. Es pertinente indicar que las construcciones arriba mencionadas ya habían sido secuenciadas y no se observaron modificaciones adicionales a las deseadas (Aguilar-Vazquez, 2015).

## 7.2 CONSTRUCCIÓN DE LAS QUIMERAS NG12BCa Y NG12BCb

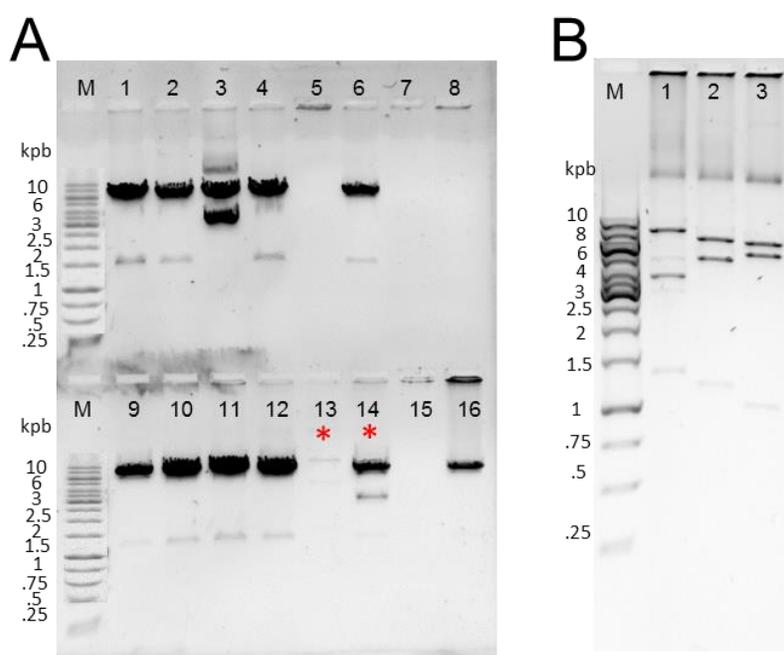
Como ya se mencionó anteriormente, en las quimeras NG12BCa y NG12BCb existe un sitio NsiI a aproximadamente 3,000 pb del inicio de la secuencia codificante del canal y que nos permite, junto con otros sitios de restricción que están al inicio y fin de la secuencia codificante, intercambiar fragmentos completos entre las clonas ya hechas, es decir, sustituir la región con el amino modificado en las clonas CRG12Ba y -b, y/o intercambiar la región con el carboxilo modificado en NG12B (Ilustración 11). De esta manera, la estrategia que se utilizó para generar las construcciones mencionadas fue la siguiente:

Para obtener el fragmento que contiene el extremo amino modificado (longitud de 2,040 pb), se digirió con las enzimas HindIII y NsiI, mientras que para el fragmento que contiene el carboxilo modificado (fragmento de 4,713 pb) se digirió con las enzimas NsiI y NotI. De tal manera que el vector (HE4) que contendrá ambos fragmentos una vez ligados se digirió con HindIII y NotI. Dichas bandas se purificaron y se observan en la ilustración 11-A.



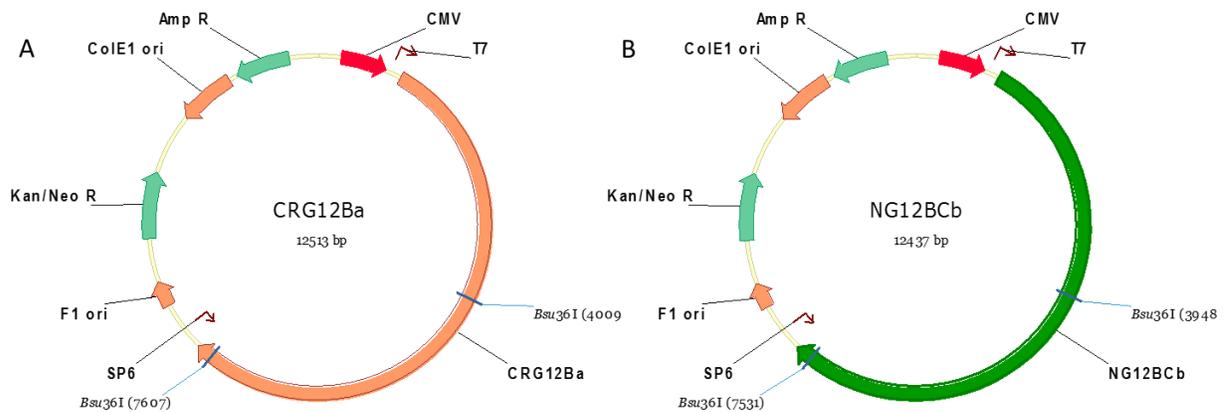
**Ilustración 11. Construcción de los plásmidos NG12BCa y NG12BCb.** En el panel A se muestra un gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr, en el cual se muestran el vector (HE4) en el carril 1, y los fragmentos purificados de NG12B de 2,040 pb (carril 2), de CRG12Ba y CRG12Bb de 4,716 y 4,701 respectivamente (carril 3 y 4). En el panel B se muestra un esquema que presenta el plásmido final en donde se incluye tanto el extremo amino como el carboxilo modificados.

Por lo tanto, la ligación de Vector HE4 + NG12B parcial + CRG12Ba parcial, dará lugar a la quimera NG12BCa; y la ligación de Vector HE4 + NG12B parcial + CRG12Bb parcial dará lugar a la construcción NG12BCb. Como parte del análisis de los plásmidos obtenidos, se realizaron tres digestiones: 1) digestión con la enzima EcoRI con la que obtendríamos tres fragmentos (7,529, 3,601 y 1,307 pb); 2) con la enzima Nsil, con la que se obtendrían cuatro fragmentos (6,588, 4,715, 1,062 y 72 pb); y 3) con BglII con la que se obtendrían tres fragmentos (6,260, 5,199 y 978 pb) (ilustración 12).



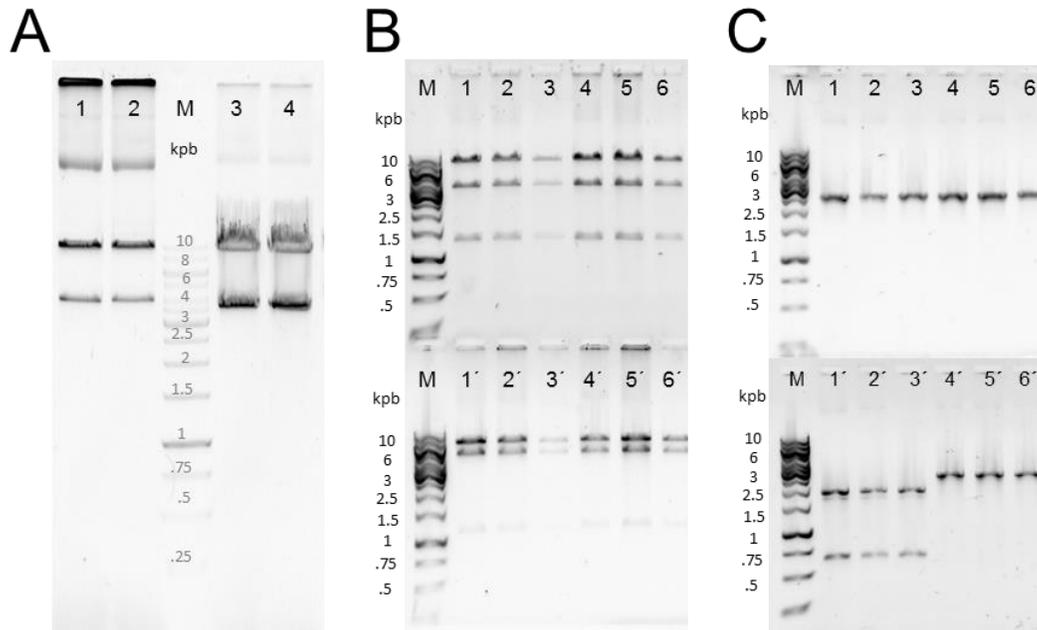
**Ilustración 12. Análisis de restricción para las clonas NG12BCa y NG12BCb.** En el panel A observamos un gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr, en donde se muestran las 16 clonas obtenidas después de ligar los fragmentos anteriormente mencionados y digeridas con la enzima EcoRI; en la parte superior del panel A se encuentran las clonas ligadas con el fragmento CRG12Ba-parcial (carriles 1-8) y en la parte inferior las clonas ligadas con el fragmento CRG12Bb-parcial (carriles 9 – 16) y se indica con un asterisco (\*) las clonas que coinciden con el resultado predicho por el análisis *in silico* . En el panel B se repitió la digestión con EcoRI (carril 1), Nsil (carril 2) y BglII (carril 3) mostrándose solo el resultados de la clona que resultó ser positiva, la clona número 13.

Los datos observados en la ilustración anterior nos indican que de la ligación sólo obtuvimos la construcción NG12BCb (clona 13). Por otro lado, existen dos sitios de reconocimiento para la enzima Bsu36I que contiene la región modificada del carboxilo terminal de una longitud aproximada de 3,600 pb y que nos permitiría intercambiar el mismo fragmento de la clona CRG12Ba en la clona recién obtenida NG12BCb (ilustración 13).



**Ilustración 13. Esquema de los plásmidos CRG12Ba y NG12BCb.** En el panel A y B observamos que existen dos sitios de restricción para la enzima Bsu36I en ambas clonas que permite intercambiar el mismo fragmento entre estas clonas, esto con el fin de generar la construcción restante, NG12BCa.

De esta manera obtendríamos la construcción NG12BCa. Para evaluar si realmente se trataba de ambas clonas, se realizó la digestión con las enzimas EcoRI (7,529, 3,601 y 1,322 pb) y con Nsil (6,588, 4,730, 1,062 y 72 pb), y para discernir entre las clonas NG12BCa y NG12BCb, se realizó por medio de una PCR la amplificación de un fragmento de 2,555 pb, amplicón en el cual existe un sitio BclI para el caso de la quimera NG12BCa (Ilustración 14).



**Ilustración 14. Construcción de la clona NG12BCa.** En el panel A se muestra un gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr, en donde observamos la digestión de la clona NG12BCb (lado izquierdo del marcador de peso molecular, M), y de la clona CRG12Ba (al lado derecho de M), ambos digeridos con la enzima Bsu36I. En el panel B se muestra, (posterior al intercambio del fragmento Bsu36I), un gel de agarosa en donde se corrieron dos digestiones diferentes; la parte superior corresponde a la digestión con EcoRI, y la parte inferior a la digestión con NsiI. En los primeros tres carriles tenemos la clona NG12BCa, y en los siguiente tres la clona NG12BCb, observándose un patrón de digestión muy similar en ambos casos. En el panel C observamos el amplicón de la PCR (parte superior de C) y cuyo producto digerido nos indica que las primeras tres clonas contienen el sitio BclI, lo que concluye que contienen la secuencia codificante del motivo VAVIM.

Después de realizar el análisis de restricción correspondiente de las quimeras realizadas, se observa que se obtuvieron clonas positivas para NG12BCa y para NG12BCb, por lo que se amplificaron y purificaron para ser transfectadas en la línea celular HEK293T.

### 7.3 SUBCLONACIÓN DE LAS SUBUNIDADES $\beta$ EN EL VECTOR pIRES2\_EGFP

El uso de vectores bicistrónicos ha permitido la producción independiente de proteínas fluorescentes que son ampliamente usadas como reporteras de la transfección. Los plásmidos que contenían a las subunidades  $\beta$  fueron analizadas *in silico* con el programa ApE, para poder transferir la secuencia codificante de cada subunidad  $\beta$  desde el vector HE4 al vector pIRES2\_EGFP. En la tabla siguiente se mencionan la(s) enzima(s) utilizada(s) para este objetivo.

Tabla 2. Estrategia utilizada para subclonar a las subunidades  $\beta$  de los CCDV.

Construcción	Tamaño de los fragmentos generados (pb)
HE4 – $\beta$ 2a	EcoRI: 5725, 2150*
HE4 – $\beta$ 3	EcoRI y SacII: 5460, 1896*
pIRES2_EGFP	EcoRI (para clonarlo con $\beta$ 2a) y EcoRI - SacII(para clonarlo con $\beta$ 3)

Además de digerir los plásmidos arriba mencionados, el vector pIRES2-EGFP también fue digerido (o linearizado) con las mismas enzimas para poder ser ligados a su fragmento correspondiente. En la ilustración 15 se muestra el esquema de los plásmidos HE4- $\beta$ 2a y HE4- $\beta$ 3, y se señalan los sitios utilizados para extraer la CDS de cada subunidad y subclonarla en el vector de expresión pIRES2\_EGFP.

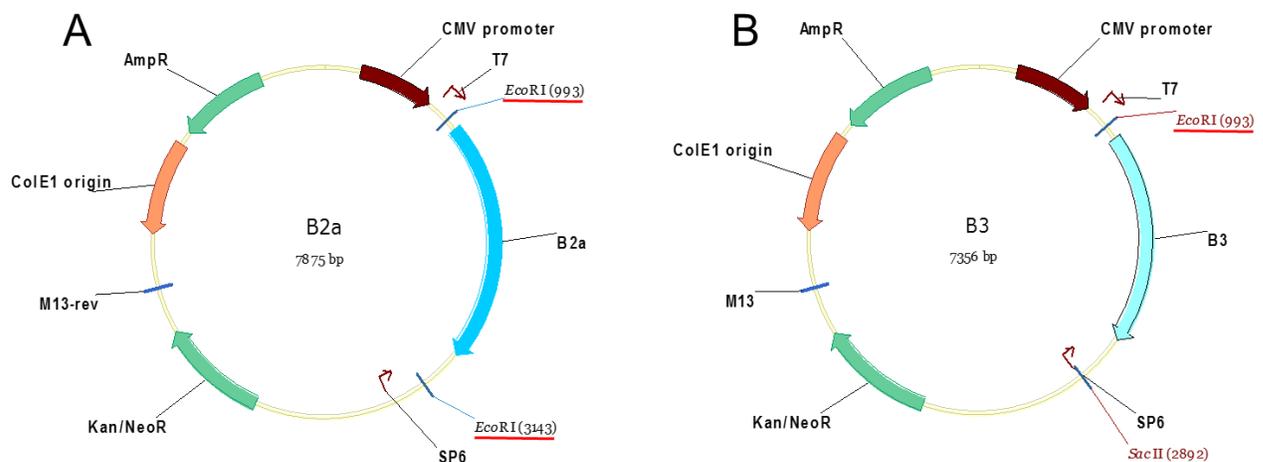
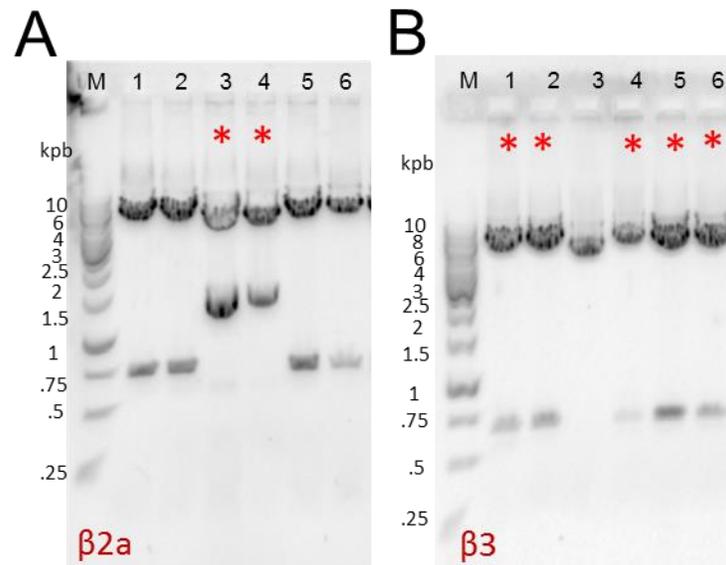


Ilustración 15. Esquema de los plásmidos que contienen a las subunidades  $\beta$  de los CCDV. En el panel A se resaltan los sitios EcoRI que permiten obtener la CDS de la subunidad  $\beta$ 2a del vector HE4. En el panel B se resaltan los sitios para las enzimas EcoRI y SacII que permiten obtener la CDS de la subunidad  $\beta$ 3. En cada caso, el vector pIRES2\_EGFP fue digerido con la(s) enzima(s) requerida.

Para comprobar que los plásmidos construidos eran los deseados (en particular aquel que fue digerido con una sola enzima), se realizaron diferentes digestiones para comprobar la estructura de cada plásmido; sin embargo, en la ilustración 16 sólo se muestra la digestión con Apal. El resultado del análisis *in silico* muestra diferentes patrones de digestión los cuales también se muestran en la ilustración 17, siendo de la siguiente manera:  $\beta_{2a}$  (5,874, 1,457, 127 pb) y  $\beta_3$  (6,350, 677, 127, 30 pb).



**Ilustración 16. Subclonación de las subunidades  $\beta_{2a}$  y  $\beta_3$  en el vector pIRES2-EGFP. En el panel A se observa un gel de agarosa al 0.8% teñido con EtBr, en donde se muestra la digestión con la enzima Apal, indicando con un asterisco (\*) las construcciones que resultaron ser positivas (estar en la orientación correcta) para cada subunidad.**

Una vez obtenido las diferentes clonas, tanto de las subunidades  $\alpha_1$  quiméricas como de las subunidades  $\beta_{2a}$  y  $\beta_3$ , se prosiguió con amplificarlos (transformación de bacterias y miniprep con el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo Fisher Scientific Inc.) y calcular la concentración de cada uno de ellos por medio del equipo Epc<sup>TM</sup> con la microplaca TAKE3 a 260 y 280 nm, con una relación entre ambas lecturas >1.90. En la tabla 3 se enlistan los plásmidos que se utilizaron para la transfección y su concentración.

**Tabla 3. Concentración de los plásmidos utilizados para la transfección en las células HEK 293T.**

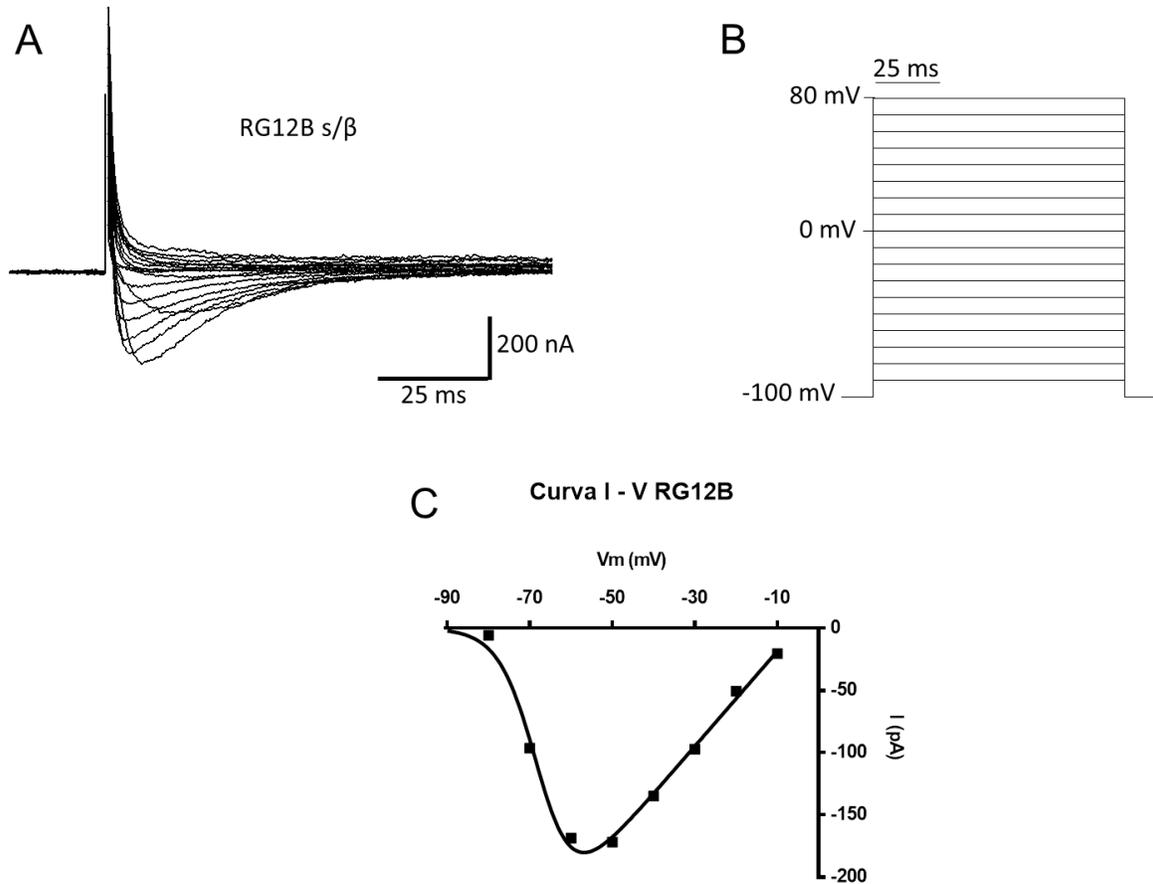
<b>Plásmido</b>	<b>Concentración (ng/<math>\mu</math>L)</b>
<b>RG12B</b>	450
<b>NG12B</b>	460
<b>NG12BCa</b>	570
<b>NG12BCb</b>	335
<b>pIRES2_EGFP_<math>\beta_{2a}</math></b>	500
<b>pIRES2_EGFP_<math>\beta_3</math></b>	500

#### **7.4 CORRIENTE IÓNICA DE LA QUIMERA RG12B**

Los canales quiméricos se transfectaron de manera transitoria, de manera aislada y en conjunto con las subunidades  $\beta$ , por medio del método con PEI (ver materiales y métodos), en la línea celular HEK 293T. Las células que resultaron ser positivas a la transfección fueron identificadas como verdes tras ser estimuladas por epifluorescencia (excitación máxima = 488 nm; emisión máxima = 507 nm).

Para evaluar al canal quimérico RG12B se utilizó un protocolo de pulsos cuadrados, es decir, una serie de pulsos que tienen una duración de 200 ms, cuya intensidad del pulso va aumentando de 10 en 10 mV, desde -90 a 80 mV, con un intervalo de 5 segundos entre cada pulso (ilustración 17). Con este protocolo se obtuvieron datos con los cuales se construyó la relación corriente - voltaje (I-V), en presencia y ausencia de las subunidades  $\beta$ , siendo una continuación al trabajo realizado por Arias *et al.*, (2005), dando especial énfasis a las condiciones en las cuales se cotransfectaba la subunidad  $\beta_{2a}$  y  $\beta_3$ , debido a que fueron las subunidades que lograron ejercer un efecto más notorio en el canal quimérico RG12B.

Durante los experimentos se tomó como control positivo a la corriente generada por la quimera RG12B (Arias *et al.*, 2005), observándose una conductancia de 38.22 pS, un  $V_{rev}$  de  $-3.7$  mV, un  $V_{50}$  de  $-66.6$  mV y una  $k$  de activación de 4.5 mV.



**Ilustración 17. Corriente iónica obtenida de la quimera RG12B.** En el panel A se muestran una serie de trazos que corresponden a la corriente de calcio generada por la quimera RG12B sin subunidad  $\beta$  por medio del protocolo de estimulación de pulsos cuadrados, el cual está resumido en el panel B (para mayores detalles, ir a la sección de materiales y métodos). En el panel C observamos la relación que existe entre las corrientes generadas por la quimera RG12B a diferentes voltajes (curva I-V).

Así como se muestra en la ilustración 17, la proteína quimérica puede generar corrientes de calcio, lo que además reitera que la transfección (con el método de Reed *et al.* (2006) con polietilenimina (PEI, 25 kDa), se realizó exitosamente y que las corrientes iónicas observadas por Arias *et al.*, 2005 pueden ser reproducidas. A continuación, se muestra una tabla donde se resumen algunos de los datos obtenidos con la quimera RG12B comparados con los obtenidos por Arias *et al.*, 2005.

**Tabla 4. Comparación de algunas propiedades electrofisiológicas del canal RG12B obtenidas en el 2005 y 2015.**

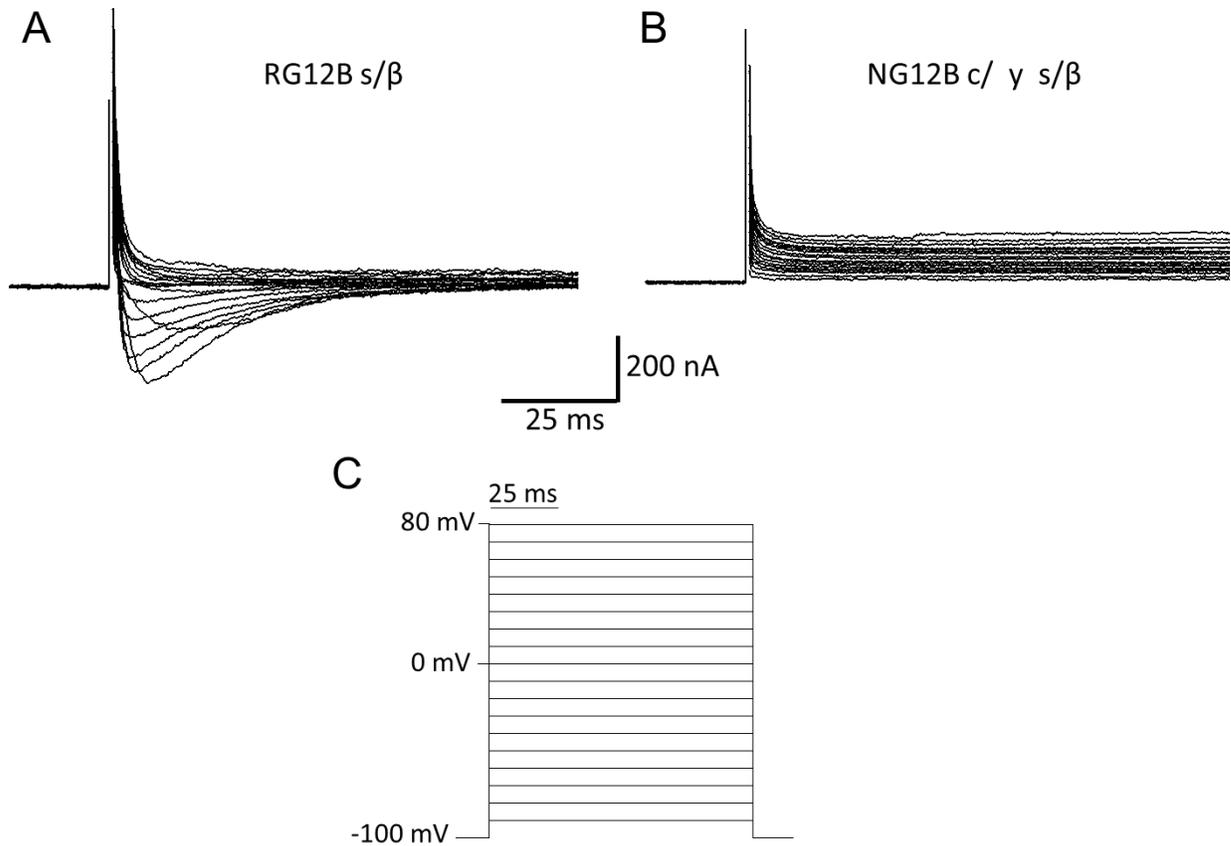
	<b>Canal RG12B (2005)</b>	<b>Canal G12B (2015)</b>
<b><math>G_{m\acute{a}x}</math> (pS)</b>	33	38.22
<b><math>V_{inv}</math> (mV)</b>	~40	~0
<b><math>V_{50}</math> de activación (mV)</b>	-63.1	-66.6
<b><math>k</math> de activación (mV)</b>	4.3	4.5

Como se observa en los datos obtenidos de la quimera RG12B, los valores obtenidos se asemejan mucho a lo reportado por Arias *et al.*, (2005), no obstante, las propiedades electrofisiológicas que presentan diferencias grandes, como el  $V_{inv}$  o el desplazamiento de la  $V_{50}$  son discutidas más adelante.

### **7.5 LA SUSTITUCIÓN DEL EXTREMO AMINO TERMINAL Y EL ASA I-II SIMULTÁNEAMENTE NO GENERAN CORRIENTES IÓNICAS EN EL CANAL QUIMÉRICO**

La evaluación electrofisiológica de la quimera NG12B se realizó de igual manera a la quimera RG12B, es decir, se aplicó una serie de pulsos cuadrados de 200 ms de duración, con incremento de 10 mV cada estímulo, desde -90 a 80 mV, con intervalos de 5 s entre cada pulso. Sorpresivamente, la quimera NG12B no presentó corrientes iónicas bajo el protocolo aplicado. Tal resultado, comparado con el obtenido con la quimera RG12B sugiere que el extremo amino de  $\alpha 1B$  puede estar interfiriendo con la función del canal quimérico, sin embargo, la manera en la que lo esté haciendo es ambiguo, siendo que dicha modificación puede afectar desde el plegamiento de la proteína quimérica desde el retículo endoplásmico, o puede estar interfiriendo en su transporte a la membrana plasmática debido a una mala o ausente interacción con proteínas chaperonas las cuales favorecen e intensifican la expresión del canal en la membrana (papel sugerido para las subunidades  $\beta$  aumentando la expresión de la subunidad  $\alpha$  en membrana), o bien, a que dicha modificación no afectó a la estructura tridimensional de la proteína en estado cerrado pero que sí afecta cuando el canal tiende a activarse, y cuya función normal no puede ser restablecida aún en presencia de subunidades  $\beta$  (ilustración 18).

Más adelante se discutirá los posibles mecanismos por los cuales podría no observarse corriente iónica de la quimera NG12B.

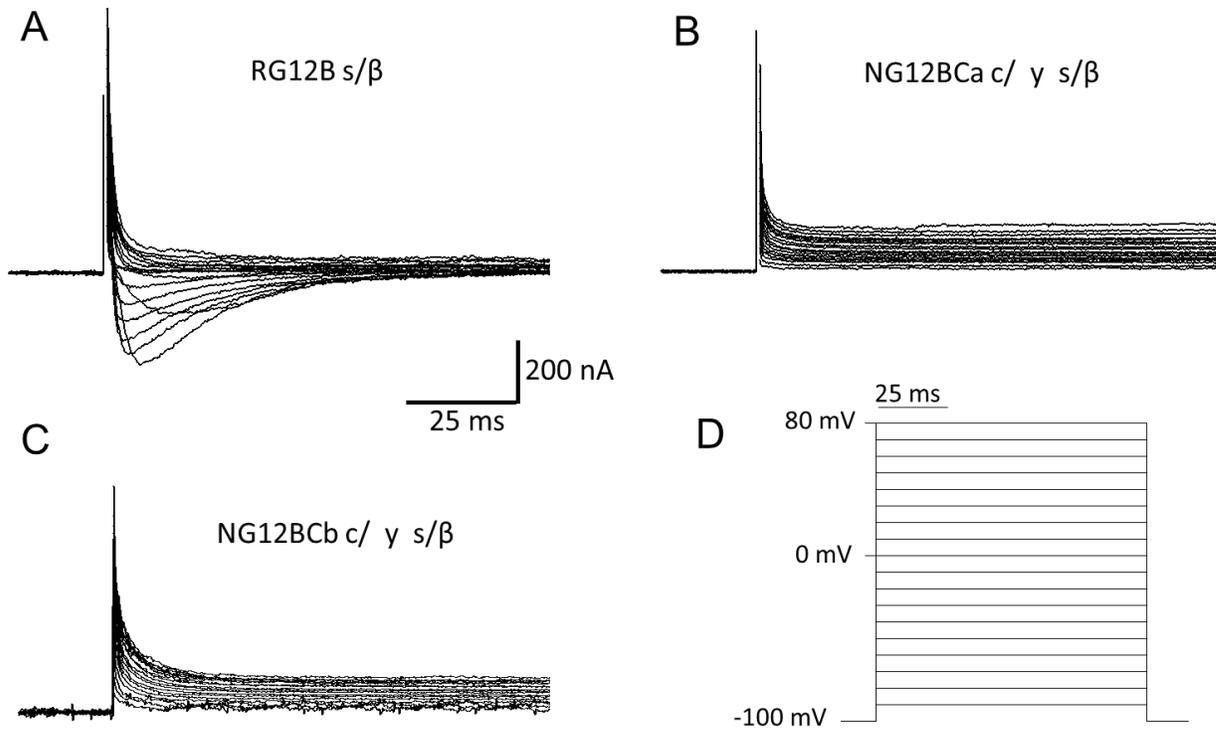


**Ilustración 18. Corrientes de calcio generada por la quimera NG12B. En el panel A se muestra una serie de trazos que corresponde a las corrientes iónicas generadas por la quimera RG12B sin subunidad  $\beta$  (Arias *et al.*, 2005). En el panel B se muestra que la quimera NG12B no generó corrientes de calcio, tanto en presencia como en ausencia de las subunidades  $\beta$  ( $n = 5$  células). El panel C muestra el protocolo de estimulación utilizado para evaluar la función de los canales quiméricos.**

## 7.6 LA ADICIÓN SIMULTÁNEA DEL EXTREMO CARBOXILO TERMINAL NO ES SUFICIENTE PARA ACTIVAR AL CANAL QUIMÉRICO

Si recordamos, las quimeras entre proteínas emparentadas generan patrones de actividad muy similar a la proteína de donde se tomó el dominio de interés, y que cuando sustituimos más fragmentos (o regiones con una mayor longitud) en teoría sería posible transferir la actividad completa de la proteína original. En el caso de estos canales quiméricos, aunado a lo reportado por Arias *et al.* (2005), esperábamos que al sustituir un mayor número de asas intracelulares tendríamos una actividad más similar a la de la subunidad  $\alpha_1\beta$ , tanto expresada sola o junto con las subunidades reguladoras  $\text{Ca}_v\beta$ .

Por tal motivo se realizaron las quimeras NG12BCa y NG12BCb, las cuales se diferencian en el motivo VAVIM localizado en el asa 6 del dominio IV (IVS6; Aguilar-Vazquez, 2015). El protocolo para evaluar electrofisiológicamente su función fue similar al utilizado para las quimeras RG12B y NG12B, el cual consiste en la aplicación de pulsos cuadrados como se muestra en la ilustración 19D, tanto en presencia como en ausencia de subunidades  $\beta$ . sin embargo, al igual que con la quimera NG12B, no se logró obtener corriente de estos canales quiméricos.



**Ilustración 19. Los canales quiméricos NG12BCa y NG12BCb no generan corrientes iónicas detectables. En el panel A se muestran las corrientes iónicas generadas por la quimera RG12B sin subunidad  $\beta$ . En los paneles B y C se muestran los trazos obtenidos de las quimeras NG12BCa y NG12BCb, respectivamente. Se observa que ninguna de las dos quimeras es capaz de generar corrientes iónicas detectables, tanto en presencia como en ausencia de subunidades  $\beta$  ( $n = 6$  células por condición). En el panel D se muestra el protocolo de estimulación utilizado para evaluar la función de los canales quiméricos.**

Como se observa en la ilustración 19, las quimeras en las cuales se sustituyó de manera simultánea los extremos amino y carboxilo de la subunidad  $Ca_v\alpha 2.2$  en la quimera RG12B, es decir, las quimeras NG12BCa y NG12BCb, no generaron corrientes iónicas detectables ni aun siendo cotransfectadas con las subunidades  $\beta$ , siendo resultados muy similares a los obtenidos con la quimera en donde sólo se había sustituido el extremo amino de la subunidad  $Ca_v\alpha 2.2$ , sugiriendo que posiblemente la modificación del extremo amino jugó un papel prioritario en el acople o exportación o funcionalidad del canal quimérico. En la siguiente sección se mencionan algunas posibles explicaciones ante los resultados obtenidos.

## 8. DISCUSIÓN

Los canales de calcio dependientes de calcio permiten el paso de los iones de calcio a través de un poro selectivo para este ión y el cual es abierto en respuesta a la despolarización de la membrana celular. Dicho flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  crea una corriente entrante y despolarizante, dando como resultado una acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma, el cual puede actuar como un agente químico que promueve la secreción de hormonas y neurotransmisores, la contracción muscular, así como una gran variedad de eventos celulares dependientes de calcio.

Es así como, tras sensar los cambios en el potencial de membrana, los canales de calcio son capaces de generar señales eléctricas al mismo tiempo que permiten el paso de un mensajero químico intracelular muy importante. Dicha habilidad dual es única entre los canales iónicos, siendo de suma importancia el papel que juegan los canales de calcio en procesos como el de acople excitación-contracción y excitación-secreción.

El estudio en los últimos años acerca de la gran variedad de canales de calcio y su papel en los diferentes tipos celulares se ha incrementado de manera sorprendente, en donde el enfoque molecular ha aportado información bastante importante.

No obstante, los canales de calcio dependientes de voltaje no actúan de manera aislada, sino que es necesaria la interacción con otras proteínas, siendo de particular interés aquellas subunidades que interaccionan y/o modulan a la subunidad formadora del poro, por ejemplo, la subunidad  $\beta$  de estos canales.

El mecanismo por el cual la subunidad formadora del poro,  $\alpha$ , interacciona con las subunidades  $\beta$  ha sido de gran interés desde hace más de 25 años, sin embargo, todo el conocimiento obtenido no ha sido suficiente para elucidar dicho proceso, Es así como trabajos semejantes al presente, buscan contribuir al conocimiento del fenómeno interacción y regulación entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de los canales de calcio dependientes de voltaje, utilizando como estrategia el uso de proteínas quiméricas, esto entre las subunidades  $\text{Ca}_v\alpha 2.2$  y  $\text{Ca}_v\alpha 3.1$ .

## 8.1 G12B MUESTRA UN COMPORTAMIENTO “ANORMAL”

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos arrojan información muy útil con respecto a ciertos aspectos. En primer lugar, lo obtenido por la quimera RG12B no logró ser reproducido tal como lo reporta Arias *et al.*, (2005). Esto puede ser debido a fallas técnicas como lo es una compensación deficiente de los componentes capacitivos tanto de la pipeta como de la membrana plasmática (en célula completa). Es otras palabras, la compensación consiste en aplicar una corriente eléctrica que funja como carga eléctrica, la cual a su vez amortigua los cambios de distribución de las cargas eléctricas en la membrana celular, con el objetivo que el campo magnético que se da lugar como resultado de la distribución de especies iónicas dentro y fuera de la membrana, se mantenga estable y permita un ambiente continuo entre la célula y la pipeta de registro.

Dicha compensación es de suma importancia cuando se desea registrar canales iónicos activados por el voltaje de membrana, ya que una sub- o sobrecompensación alterará el potencial de membrana que se desea establecer y dará lugar a una condición ficticia que no solo afectará el voltaje requerido para la activación de los canales iónicos, sino que también surtirá un efecto en la distribución de las especies iónicas que se localizan en ambos lados de la membrana.

Por lo que, tomando en cuenta lo descrito anteriormente, y aplicado a lo obtenido en el registro de la quimera RG12B, observamos que el voltaje al cual se activan la mitad de toda la población de canales de calcio activados por voltaje ( $V_{50}$ ), se desplazó hacia la izquierda (potencial hiperpolarizante) así como el potencial de inversión de la corriente ( $V_{rev}$ ), cuyos valores fueron  $-66.6$  mV y  $-3.7$  mV, respectivamente. De acuerdo a lo reportado por Arias *et al.*, (2005), dichos valores corresponden a  $-63.1$  mV para la  $V_{50}$ , y para el potencial de inversión aparente de  $23$  mV; por lo que hay una diferencia de  $-3.5$  mV para la  $V_{50}$  de activación y  $-26$  mV para el  $V_{rev}$ . Tales datos sugieren que los canales se están activando de manera “normal”; sin embargo, para explicar el desplazamiento del  $V_{rev}$  se especula que tras una sobrecompensación (o una sobrecarga eléctrica), la distribución de cargas se modifica, y para el caso del calcio, un ión que tiene carga positiva, se induce que exista un flujo a favor de concentración mucho más rápido a cómo usualmente se observa, siendo mucho más notorio a potenciales positivos.

## 8.2 NG12B, NG12BCA Y NG12BCB NO PRESENTAN CORRIENTE

En el presente trabajo se generaron dos quimeras, NG12BCa y NG12BCb, pero se evaluaron tres proteínas quiméricas, NG12B, NG12BCa y NG12BCb. Las tres quimeras evaluadas en este trabajo no mostraron corrientes iónicas, tanto en ausencia como en la presencia de las subunidades  $Ca_v\beta$ . Dichos resultados se pueden comparar con los obtenidos por Fang y Colecraft, 2011, en donde se intercambiaron las asas intracelulares entre dos subunidades  $Ca_v\alpha$ , específicamente entre  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v3.1$ , utilizando como esqueleto de las quimeras a la subunidad  $Ca_v3.1$ .

Para el caso de la quimera que contenía el extremo amino y el asa I-II de la subunidad  $Ca_v1.2$  (ccggg), se observó que era capaz de generar corrientes más grandes que las mostradas por  $Ca_v3.1$ , pero más pequeñas a las registradas por la quimera que sólo contenía el asa I-II (gcggg). El efecto que tuvo la subunidad  $\beta 2a$  sobre esta quimera fue prácticamente nulo; sin embargo, a diferencia de nuestra quimera NG12B, la quimera ccggg sí presentó corrientes.

Sin embargo, el extremo amino de las subunidades  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v2.2$  difieren en algunos aspectos: 1) el extremo amino de  $Ca_v1.2$  es 59 aminoácidos más largo con respecto al extremo amino de  $Ca_v2.2$ , lo que a su vez podría proporcionarle una mayor estabilidad a la proteína aún en la quimera (Finkelstein *et al.*, 2013), desde el plegamiento de la proteína en el RE, así como durante la exportación a la membrana; 2) la identidad entre ambas secuencias es menor al 15%, lo que claramente puede indicar que el papel de cada segmento en su respectiva proteína ( $Ca_v1.2$  y  $Ca_v2.2$ ) es diferente a pesar de tener una localización similar.

Por otro lado, la localización de la subunidad  $Ca_v\alpha 1$  de los CCDV en la membrana plasmática está fuertemente influenciada por las subunidades  $Ca_v\beta$ , esto por medio de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre ambas subunidades. Dicho mecanismo sugiere la existencia de señales de retención en el retículo endoplásmico (RE) presentes en las asas intracelulares de las subunidades  $Ca_v\alpha 1$ , las cuales son enmascaradas por la subunidad  $Ca_v\beta$  tras la interacción entre ambas subunidades; como resultado, más subunidades  $Ca_v\alpha$  pueden llegar a membrana y tener efectos esenciales en la célula, observándose como un aumento en la densidad de corriente de calcio y afectando la excitabilidad celular. A pesar de que existen secuencias consenso que funcionan como

señales de retención en el RE (KDEL, KKXX Y XXAA, siendo X cualquier aminoácido; Stornaiuolo *et al.*, 2002) no han sido determinadas con claridad para las subunidades  $Ca_v\alpha 1$  de los CCDV.

Con respecto a este último punto, Altier *et al.* (2011) evaluaron la existencia de señales de retención en el RE en las asas intracelulares de las subunidades  $Ca_v1.2$  y  $Ca_v2.2$ . Los resultados mostraron que no existen tales señales en el extremo amino de  $Ca_v1.2$ , pero no se menciona nada con respecto al extremo amino de  $Ca_v2.2$ . Por otro lado, Cornet *et al.* (2002) han descrito que la región amino terminal del canal  $Ca_v2.1$  contiene señales de retención en RE, lo cual contrasta con lo observado en  $Ca_v1.2$ .

Recopilando los datos mencionados anteriormente, y considerando la posibilidad de que en la región amino de la quimera NG12B se encuentre una o varias señales de retención en RE aún no detectadas, se sugiere que la quimera NG12B pudiera encontrarse en las siguientes situaciones: 1) puede estar procesando con un plegamiento “anormal”; 2) la existencia de señales de retención en RE quedan expuestas tras el plegamiento anormal y por lo tanto no pueden ser enmascaradas aún tras asegurarse una interacción con las subunidades  $Ca_v\beta s$  (Stephens *et al.*, 2000); 3) o bien existe la posibilidad de que la proteína quimérica, aun llegando a la membrana plasmática, tenga una función atrofiada debido a la nueva arquitectura del canal, lo cual impide su activación o el flujo de calcio a través de éste (Stotz *et al.*, 2004).

En el caso de las quimeras NG12bCa y NG12BCb, las cuales fueron registradas al mismo tiempo que la quimera NG12B, tampoco mostraron tener corrientes, y a pesar de que la razón por la cual mostraron ser no funcionales puede ser atribuida al efecto de la sustitución del extremo amino, es necesario resaltar los siguientes puntos en los cuales el extremo carboxilo pudo potenciar el fenómeno observado.

El extremo carboxilo terminal de los CCDV participa en la regulación funcional sinérgicamente con otras proteínas o de manera individual. La interacción con otras proteínas ejerce diferentes efectos, debido a que: 1) posee sitios de unión a la calmodulina (CaM) (Zamponi, 2003), lo cual ejerce un papel importante en la inactivación dependiente de calcio (CDI, por sus siglas en inglés); 2) posee sitios de fosforilación donde proteínas cinasas, como PKA, PKG (Hell *et al.*, 1994) y PKC regulan la actividad de los CCDV, aumentándola (Yang y Tsien, 1993; Swartz *et al.*, 1993), o disminuyéndola (Doerner *et al.*, 1990; Diverse-Pierluissi y Dunlap, 1993); además, 3) constituye un

elemento importante en la interacción  $Ca_v\alpha$  y  $Ca_v\beta$ , participando en el gating del canal y particularmente controlando, o regulando, la inactivación dependiente de voltaje (VDI, por sus siglas en inglés) (Raybaud *et al.*, 2007; Buraei y Yang, 2010).

De manera aislada se ha mostrado que posee señales de retención en el RE, como lo muestra Altier *et al.* (2011), quienes observaron que la señal de retención RE está contenida la región proximal del carboxilo terminal, dentro de los primeros 70-90 aminoácidos. Sin embargo, Fang y Colecraft (2011) lograron obtener corrientes iónicas del 60% (9 de 15) de las quimeras que contenían el terminal carboxilo sustituido (ggggc, gcggc, ccggc, entre otras).

En datos obtenidos en nuestro laboratorio (Aguilar-Vazquez, 2015), un canal quimérico en donde se sustituyó simultáneamente el asa I-II y el extremo carboxilo de la subunidad  $Ca_v\alpha 2.2$  en la subunidad  $Ca_v\alpha 3.1$ , denominada, CRG12Ba, no mostró corrientes iónicas detectables aún en presencia de subunidades  $\beta$ ; sin embargo, otra quimera similar, CRG12Bb sí presentó corrientes iónicas, aunque solo en presencia de la subunidad  $\beta 2a$ . La única diferencia entre ambas quimeras fue la presencia de 5 aminoácidos localizados en el asa 6 del dominio IV (presentes en CRG12Ba y ausentes en CRG12Bb). Dichos aminoácidos forman el motivo VAVIM al cual se le ha atribuido un papel importante en la inactivación dependiente de voltaje en los canales HVA.

Aguilar-Vazquez, (2015), sugiere que el motivo VAVIM forma un alfa hélice que estructuralmente permite un plegamiento particular, el cual a su vez permite esconder o exponer señales de retención en el retículo endoplásmico. El primer caso surge de manera nativa en los CCDV, pero no así en la proteína quimérica generada, sugiriendo que la ausencia de corrientes iónicas se debió a un mal plegamiento del canal o a su retención en el RE. Dicho resultado sugiere que el motivo VAVIM puede participar en otras funciones como en un mal plegamiento del canal, así como en su retención en el RE, además de su participación en la inactivación dependiente de voltaje.

Resumiendo, la sustitución de los extremos amino y carboxilo terminales generaron tal impacto en las proteínas quiméricas que no se observaron corrientes iónicas, y dichos resultados pudieran sugerir un mecanismo sinérgico en la retención en el RE, entre otras posibilidades.

Para finalizar, se ha descrito mucho acerca de cómo es que la subunidad  $\text{Ca}_v\beta$  interacciona con el motivo AID de la subunidad  $\text{Ca}_v\alpha$ , de su capacidad de regular las propiedades electrofisiológicas del canal, así como de reclutar la subunidad del poro en la membrana y aumentar la densidad de corriente. Sin embargo, como lo demuestra Fang y Colecraft (2011) los efectos que pueden manifestar las subunidades  $\text{Ca}_v\beta$  sobre las subunidades  $\text{Ca}_v\alpha$  están relacionados con la combinación de interacciones entre estas subunidades, resultando por tanto en una regulación fuerte o no en las propiedades biofísicas de los canales. De manera adicional se ha encontrado que cada subunidad  $\text{Ca}_v\alpha 1$  posee distintos mecanismos de direccionamiento a membrana (Altier *et al.*, 2003) e integrando dicha información, una manera relativamente sencilla de entender los resultados obtenidos en este trabajo sería el implementar estrategias de marcaje de las proteínas de interés, tales como la adición de una etiqueta (HA, myc, FLAG, etc.) o la creación de proteínas de fusión para posteriormente emplear técnicas de inmunofluorescencia y determinar la localización de dichas proteínas.

## 9. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se generaron tres proteínas quiméricas entre las subunidades  $\text{Ca}_v\alpha 2.2$  y  $\text{Ca}_v\alpha 3.1$  de los CCDV, las cuales fueron: NG12B, NG12BCa y NG12BCb. Éstas se probaron por medio de registros electrofisiológicos usando la técnica de patch clamp, en la configuración de célula completa (whole cell).

Se demostró que las proteínas quiméricas generadas en este trabajo no son capaces de generar corrientes iónicas, por lo que se cree que dichas sustituciones afectaron la capacidad funcional del canal, y se resalta que el motivo VAVIM puede ejercer un efecto adicional al reportado por Raybaud *et al.*, 2007.

Se recomienda realizar otros experimentos que ayuden a esclarecer si los canales quiméricos se expresaron, o se plegaron, o funcionan de manera “normal”. Además, evaluar el verdadero papel que ejercieron las subunidades  $\beta$  utilizadas.

## 10. PERSPECTIVAS

Para poder esclarecer el nivel subcelular en el cual se encuentra las quimeras NG12B, NG12BCa y NG12BCb, así como otras quimeras previamente generadas por Aguilar-Vazquez, (2015), se propone la realización de proteínas de fusión entre las subunidades  $Ca_v\alpha_1$  quiméricas y algún péptido o proteína (tal como la etiqueta HA, 6xHis, proteínas fluorescentes, etc.), que por medio de técnicas de inmunofluorescencia y de microscopia confocal, ayuden a elucidar el resultado obtenido, esto con el fin de evaluar si el canal quimérico fue capaz de llegar a membrana. De manera similar, se podría evaluar la expresión de las proteínas quiméricas en presencia y ausencia de subunidades  $Ca_v\beta_s$ , y determinar si éstas alteran la localización celular de las subunidades  $Ca_v\alpha_1$  quiméricas.

Además, el uso de vectores policistrónicos ayudaría a aumentar la probabilidad de expresión de las subunidades que se deseen evaluar, siendo una increíble ventaja en comparación a las cotransfecciones realizadas.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. 2008. Internal Organization of the Cell. Cap. 10. en: *Molecular Biology of the Cell*. 5° Ed. Garland Science, Taylor & Francis Group. New York. USA. Pp. 617

Aguilar\_Vazquez, R. 2015. Contribución del carboxilo terminal de la subunidad  $\alpha 1$  del canal CaV2.2 en la regulación por las subunidades  $\beta$  de los canales de calcio de alto umbral. Tesis de licenciatura. Carrera de biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. 75 p

Arias, M.J.M.; Murbartián, J.; Vitko, I.; Lee, JH; Pérez-Reyes, E. 2005. Transfer of  $\beta$  subunit regulation from high to low voltage-gated Ca<sup>+2</sup> channels. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 579: 3907 – 3912

Arias, O.I.I. 2009. El Estudio de la Relación Estructura-Función de los Canales de Calcio Dependientes de Voltaje Cav3 (Conocidos Como Canales Tipo T o LVA). Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas. Instituto de Fisiología Celular. UNAM. México. 8 p.

Bae, J.; Suh, E.J.; Lee, C. 2010. Interaction of T-Type Calcium Channel CaV3.3 with the  $\beta$ -Subunit. *Molecules and cells*. 30(3): 185 – 191.

Barbado, M.; Fablet, K.; Ronjat, M.; De Waard, M. 2009. Gene regulation by voltage-dependent calcium channels. *Biochemical Biophysics Acta*. 1793 (6): 1- 10

Bidaud, I.; Mezghrani, A.; Swayne, L. A.; Monteil, A.; Lory, P. 2006. Voltage-gated calcium channels in genetic diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1763: 1169 - 1174

Buraei, Z. y Yang, J. 2010. The  $\beta$  subunit of voltage-gated Ca<sup>+2</sup> channels. *Physiology Rev*. 90: 1461 - 1506

Catterall, W.A. 2011. Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.3: a003947

Chen, H.; Puhl, H. L. 3ro, Niu, S.L.; Mitchell, D.C.; Ikeda, S.R. 2005. Expression of Rem2, an RGK family small GTPase, reduces N-type calcium current without affecting channel surface density. *The Journal of Neuroscience*. 25(42): 9762-72.

Cornet, V.; Bichet, D.; Sandoz, G.; Marty, I.; Brocard, J.; Bourinet, E.; Mori, Y.; Villaz, M.; De Waard, M. 2002. Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum. *The European journal of neuroscience*. 16(5): 883 – 95.

Davis, W. 2013. A Plasmid Editor 2.0.45. Software. Available in: <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>.

De Waard, M., Witcher, D.R., Pragnell, M., Liu, H., and Campbell, K.P. (1995). Properties of the  $\alpha 1b$  anchoring site in voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels. *The journal of biological chemistry*. 270: 12056-12064

Diverse-Pierluissi, M. y Dunlap, K. 1993. Distinct, convergent second messenger pathways modulate neuronal calcium currents. *Neuron*. 10(4): 753 – 760.

Doerner, D.; Abdel-Latif, M.; Rogers, T.B.; Alger, B.E. 1990. Protein kinase C-dependent and -independent effects of phorbol esters on hippocampal calcium channel current. *The journal of neuroscience*. 10(5): 1699 – 1706.

Feng-Qi Zhao\* and Aileen F Keating Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters *Curr Genomics*. 2007 Apr; 8(2): 113–128.

Fang, K.; Colecraft, H. M. 2013. Mechanism of auxiliary  $\beta$ -subunit-mediated membrane targeting of L-type ( $CaV1.2$ ) channels. *The journal of physiology*. 15;589(Pt 18): 4437-55

Finkelstein, A.V.; Bogatyreva, N.S.; Garbuzynskiy, S.O. 2013. Restrictions to protein folding determined by the protein size. *FEBS letters*. 587(13): 1884 – 1890.

González, G. G.; Miranda, L. E.; Contreras, G.; Neely, A.; Hidalgo, P. 2010. Swapping the I-II intracellular linker between L-type  $CaV1.2$  and R-type  $CaV2.3$  high-voltage gated calcium channels exchanges activation attributes. *Channels (Austin)* 4, 30 - 8

Guharay, F. y Sachs, F. 1984. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic skeletal muscle. *Journal of Physiology*. 352:685-701

Halestrap, A Meredith, D. The SLC16 gene family—from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond Pflugers Arch - *Eur J Physiol* (2004) 447: 619. doi:10.1007/s00424-003-1067-2

Halling DB, Aracena-Parks P, Hamilton SL. 2005. Regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels by calmodulin. *Science STKE*. (315): re15.

Hell, J.W.; Appleyard, S.M.; Yokoyama, C.T.; Warner, C.; Catterall, W.A. 1994. Differential phosphorylation of two size forms of the N-type calcium channel alpha 1 subunit which have different COOH termini. *The journal of biological chemistry*. 269(10):7390-6

Hernández, V. C. M. 2005. Corrientes de calcio a través de un canal mutante *leaner* expresado en un sistema heterólogo. Tesis de Doctorado en Ciencias Fisiológicas. Universidad de Colima. México. 3

Hille, B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3rd Ed., Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA

Latorre, R., López\_Barneo, J., Bezanilla, F., Llinás, R. 1996. *Biofísica y Fisiología Celular*. Secretariado de Publicaciones. Universidad de Sevilla. Capítulo 1, pág.: 5.

Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaria, P.; Kaiser, C.A.; Kreiger, M.; Scott, M.P.; Zipurski, S.L.; Darnell, J. 2005. *Molecular Cell Biology*, 5th ed., W. H. Freeman, 2004. [Biología celular y molecular. Editorial médica panamericana.

Jiménez, V.E.N. 2010. Construcción de ADNc mutante carente del extremo carboxilo de la subunidad  $\alpha_1$  de los canales de Ca<sup>+2</sup> dependientes de voltaje de bajo umbral tipo T, Ca<sub>v</sub>3.3. Tesis en Maestría en Ciencias en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental. Centro De Investigación y de Estudios Avanzados. IPN. México. 28 p.

Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessell, T. M.; Agud Aparicio, J. L. 2001. *Principios de neurociencia* (4a ed., 1a ed. en español.). Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España.

Koolman, J. y Röhm, K.H. 2004. *Bioquímica: Texto y Atlas*. Panamericana. Madrid. España. P. 217 -221

Lacinová L. 2005. Voltage-dependent calcium channels. *General Physiology and Biophysics*. 24:1-78

Liao, P., Zhang, H. Y. & Soong, T. W. 2009. Alternative splicing of voltage-gated calcium channels: from molecular biology to disease. *Pflugers Arch.* 458, 481-7.

Minor, D. L.; Van Petegem, F. 2006. The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation. *Biochemical Society Transactions.* 34 (5): 887 – 893

Pérez-Reyes, E. 2003. Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels. *Physiological Review.* 83 : 117 – 161

Pragnell, M.; De Waard, M.; Mori, Y.; Tanabe, T.; Snutch, T.P.; Campbell, K.P. 1994. Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature.* 368(6466): 67-70.

Raybaud, A.; Baspinar, E.E.; Dionne, F.; Dodier, Y.; Sauvé, R.; Parent, L. 2007. The Role of Distal S6 Hydrophobic Residues in the Voltage-dependent Gating of CaV2.3 Channels. *The journal of biological chemistry.* 282(38): 27944 – 27952.

Reed, S., Staley, E., Mayginnes, J., Pintel, D. and Tullis, G. (2006). Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *The journal virological methods* 138, 85-98.

Seidman E, Struhl K, Sheen J, Jessen T. (1997). Introduction of Plasmid DNA into cells. *Current protocols of molecular biology.* 37:1.8.1-1.8.10

Shistik, E.; Ivanina, T.; Puri, T.; Hosey, M.; Dascal, N. 1995. Ca<sup>2+</sup> current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *Journal of Physiology.* 15;489 ( Pt 1):55-62.

Staes, M., Talavera, K., Klugbauer, N., Prenen, J., Lacinova, L., Droogmans, G., Hofmann, F., and Nilius, B. 2001. The amino side of the C-terminus determines fast inactivation of the T-type calcium channel  $\alpha$ 1G. *The Journal of Physiology.* 530(pt -1) : 35–45

Stephens, G.J.; Page, K.M.; Bogdanov, Y.; Dolphin, A.C. 2000. The alpha1B Ca<sup>2+</sup> channel amino terminus contributes determinants for beta subunit-mediated voltage-dependent inactivation properties. *The journal of physiology*. 525 Pt 2:377-90

Stornaiuolo, M.; Lotti, L.V.; Borgese, N.; Torrisi, M.R.; Mottola, G.; Martire, G.; Bonatti, S. 2002. KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex. *Molecular biology of the cell*. 14(3): 889 - 902

Stotz, S.C.; Jarvis, S.E.; Zamponi, G.W. 2004. Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. *The journal of physiology*. 554(Pt 2):263-73.

Subramanyam, P.; Colecraft, H. M. 2014. Ion Channel Engineering: Perspectives and Strategies. *Journal of Molecular Biology*. disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.001>

Swartz, K.J.; Merritt, A.; Bean, B.P.; Lovinger, D.M. 1993. Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca<sup>2+</sup> channels and synaptic transmission. *Nature*. 361(6408): 165 – 168.

Tabassum, N.; Feroz, A. 2011. Ion channels and their modulation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 01 (01):20-25

Takahashi, M.; Seagar, M.J.; Jones, J.F.; Reber, B.F.; Catterall, W.A. 1987. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 84(15): 5478–5482.

Takahashi, S. X.; Miriyala, J.; Colecraft, H. M. 2004. Membrane-associated guanylate kinase-like properties of beta-subunits required for modulation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(18):7193-8.

Van Pettergem F1, Clark KA, Chatelain FC, Minor DL Jr. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature*. 2004 Jun 10; 429(6992): 671-5

Varadi, G.; Lory, P.; Schultz, D.; Varadi, M.; Schwartz, A. 1991. Acceleration of activation and inactivation by the beta subunit of the skeletal muscle calcium channel. *Nature*. 352(6331): 159-62.

Voet, D. y Voet, J.G. 2006. *Bioquímica*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. P. 755

Yang, J. y Tsien, R.W. 1993. Enhancement of N- and L-type calcium channel currents by protein kinase C in frog sympathetic neurons. *Neuron*. 10(2):127-36.

Zamponi, G.W. 2003. The L-type calcium channel C-terminus: sparking interest beyond its role in calcium-dependent inactivation. *The journal of physiology*. 552(Pt 2):333.

Zamponi, G. W. 2005. *Voltage-Gated Calcium Channels*. Kluwer Academic / Plenum Publishers. New York. USA. P. 1