

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

---



***“Rol funcional de los dominios sensores de voltaje I y III de  
CaV1.1 sobre las corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo L y los transitorios de  
Ca<sup>2+</sup> en fibras musculares adultas de ratón”.***

**David Gabriel Terraza Olivares**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN FISIOLOGÍA**

**Directora: Prof. Dra. Mariana Casas Atala**

**2020**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por el candidato**

**DAVID GABRIEL TERRAZA OLIVARES**

**Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Fisiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 12 de Julio de 2020.**

**Prof. Dra. Mariana Casas Atala  
Directora de Tesis**

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr. Diego Varela Lekanda**

**Prof. Dr. Elías Leiva Salcedo**

**Prof. Dr. Mauricio Henríquez Luna  
Presidente Comisión**

A mis padres, Angélica y Carlos  
A mis hermanos, Paola y Felipe  
A mi amada compañera, Claudia  
A María Ignacia, mi pequeña curiosa y aventurera

## **Agradecimientos**

Gracias, de corazón a mi tutora y amiga, Mariana, que ha sido inspiración y compañía en tantos momentos difíciles por los que atravesé a lo largo de este trabajo, ha sido un privilegio poder contar con tu guía y ayuda.

Gracias a mis amigos y compañeros de laboratorio, con ustedes he descubierto la pasión y el compromiso con la investigación, sin dejar de lado la alegría y la amistad.

Gracias a mis amigos y familiares a quienes he robado horas de compañía, en especial a mis abuelos, gracias por comprender y siempre estar ahí.

Y por sobre todo y con todo mi amor, gracias Claudia por tu apoyo incondicional y no dejarme bajar los brazos en el camino, por estar siempre ahí con nuestra hija María Ignacia a quien le agradezco haber llegado a revolucionar mi vida.

Gracias a todos, los quiero de corazón.

# ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>7</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>8</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>11</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>13</b>
Canal de Ca <sup>2+</sup> CaV1.1 .....	13
Rol de los dominios sensores de voltaje .....	15
Liberación transitoria de Ca <sup>2+</sup> .....	17
<b>Hipótesis</b> .....	<b>19</b>
<b>Objetivo General</b> .....	<b>19</b>
<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>20</b>
Tamaño muestral y grupos experimentales .....	20
Electroporación del músculo in vivo .....	21
Mutantes de subunidad $\alpha 1s$ .....	22
Voltage-Clamp de Célula Completa con aislación por grasa de silicona .....	23
Medición de la liberación transitoria de Ca <sup>2+</sup> .....	25
Método de análisis de datos: Corriente de Ca <sup>2+</sup> tipo L y Transitorios de Ca <sup>2+</sup> ....	26
Análisis estadísticos.....	27
<b>Resultados</b> .....	<b>28</b>
Electroporación de fibras musculares adultas con variantes WT y mutadas para los dominios sensores de voltaje de subunidad $\alpha 1s$ de CaV1.1.....	28
Medición de corrientes de Ca <sup>2+</sup> tipo L en fibras musculares electroporadas que expresan CaV1.1 $\alpha 1s$ mutante para los distintos dominios sensores de voltaje....	29

Activación de las corrientes de Ca <sup>2+</sup> tipo L .....	34
Liberación transitoria de Ca <sup>2+</sup> .....	34
Constante de tiempo de los decaimientos de fluorescencia .....	40
<b>Discusión .....</b>	<b>41</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>48</b>
Anexo 1: Preparación de fibras musculares adultas aisladas (músculo flexor corto de los dedos de ratón) .....	48
Anexo 2: Materiales Electrofisiología .....	48
A) Setup de Electrofisiología .....	48
B) Soluciones .....	49
Anexo 3: Protocolo de análisis de datos de corrientes de Ca <sup>2+</sup> de tipo L .....	49
Anexo 4: Protocolo de analisis de liberación transitoria de Ca <sup>2+</sup> .....	50
Anexo 5: Registros representativos corrientes de Ca <sup>2+</sup> tipo L .....	52
Anexo 6: Curvas IV de cada fibra estudiada agrupada por condición.....	53
Anexo 7: Análisis de las corrientes positivas encontradas al final de los pulsos de comando, Curvas IV.....	54
<b>Bibliografía.....</b>	<b>55</b>

## Abreviaturas

CaV1.1 = Canal de calcio dependiente de voltaje tipo L (DHPR)

RYR1 = Receptor de rianodina tipo 1

Ca<sup>2+</sup> = Ion calcio

VSD = Dominio sensor de voltaje (del inglés "*voltage sensing domain*")

mVSDI = Variante mutante para el dominio sensor de voltaje I de la subunidad  $\alpha 1s$

mVSDIII = Variante mutante para el dominio sensor de voltaje III de la subunidad  $\alpha 1s$

FDB = Músculo flexor corto de los dedos

ICBM = Instituto de ciencias biomédicas

CEMC = Centro de estudios del ejercicio, metabolismo y cáncer

GFP = Proteína fluorescente verde (del inglés "*Green fluorescent protein*")

WT = Variante silvestre (del inglés "*wild type*")

SERCA= Bomba de Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplasmático - ATPasa

## Resumen

El canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L  $\text{CaV1.1}$  es un canal iónico gatillado por voltaje, que se expresa principalmente en músculo esquelético y su función más estudiada es la relativa a su participación en el proceso de excitación-contracción muscular. Su funcionamiento se basa en el cambio conformacional que sufre ante cambios en el potencial de membrana, de forma similar a lo que ocurre con otros canales gatillados por voltaje, como los canales de  $\text{K}^+$ , con los que comparte algunas características. A diferencia de los canales de  $\text{K}^+$  gatillados por voltaje, la subunidad  $\alpha_1$  de  $\text{CaV1.1}$  es un heterotetrámero formado por cuatro dominios (I - IV) denominados dominios sensores de voltaje. Se postula que aminoácidos con carga positiva ubicados en estos dominios, en particular en los segmentos S4 de cada dominio, serían los responsables de los cambios conformacionales que sufre el canal ante las variaciones en el potencial de membrana, no obstante, a la fecha se desconoce cómo estos dominios participan ya sea de manera individual o en conjunto en los procesos en los que está involucrado  $\text{CaV1.1}$ . Es por esto, que resulta relevante dilucidar los mecanismos por los cuales el canal  $\text{CaV1.1}$  es capaz de responder a estímulos despolarizantes que terminarán en contracción muscular, apertura del poro del canal y expresión diferenciada de genes entre otras consecuencias de su activación.

En este estudio se realizó el análisis funcional de los dominios sensores de voltaje I y III de la subunidad  $\alpha_1$ s del canal  $\text{CaV1.1}$  de manera individual, utilizando un modelo de expresión de proteínas transgénicas mediante la técnica de electroporación de músculo esquelético *in vivo* en ratón C57BL/6 (músculo flexor corto de los dedos (FDB)), transfectando un plasmidio con la secuencia que codifica para la subunidad



$\alpha 1s$  con un reemplazo de los aminoácidos que se postulan como responsables de la sensibilidad a cambios en el potencial de membrana, de los dominios sensores de voltaje I y III, reemplazándolos por glutaminas. Se realizó el análisis funcional mediante la medición y registro de corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo L y la liberación intracelular transitoria de  $Ca^{2+}$  utilizando la técnica del *voltage clamp* con aislación por silicona asociada a microscopia de fluorescencia.

Los resultados muestran un aumento significativo en la amplitud de la corriente de  $Ca^{2+}$  para la condición mVSDIII en el pulso a potencial 20mV en comparación al control que expresa la variante WT de la subunidad  $\alpha 1s$  ( $p < 0,05$ ). Mientras que la neutralización de cargas en el S4 del VSDI no tendría impacto en la amplitud de la corriente observada. El análisis de los datos de la dependencia de voltaje de la corriente mediante un ajuste a una función de Boltzmann muestra una conductancia máxima significativamente mayor en la condición mVSDIII ( $p < 0,05$ ). Para la liberación transitoria de  $Ca^{2+}$ , se observa que la condición mVSDI tiende a presentar valores ligeramente mayores a la condición control, sin embargo, estas diferencias no alcanzan significancia estadística.

Con estos antecedentes podemos sugerir que el método de expresión de proteínas transgénicas es útil para estudiar la función del canal de  $Ca^{2+}$   $CaV1.1$ . En cuanto a las mutaciones estudiadas, la neutralización de cargas en el segmento S4 del VSDIII genera un aumento significativo en la conductancia de  $Ca^{2+}$  a través del canal ( $p < 0,05$ ), lo que podría sugerir un rol limitador de la corriente para este dominio, o que tal vez la neutralización de cargas en el segmento S4 produce cambios en la estructura tridimensional del poro, aumentando su tamaño, disminuyendo la resistencia y con ello

aumentando su conductancia, pese a ello, este dominio no tendría participación en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo, por lo que el vínculo funcional entre CaV1.1 y RYR1 no sería dependiente de los cambios conformacionales derivados del movimiento del segmento S4 del VSD III. La neutralización de cargas en el segmento S4 del VSDI no tendría impacto sobre los procesos estudiados al no encontrar diferencias significativas entre los resultados obtenidos comparado a la condición control. Se hace necesario complementar estos resultados con futuras investigaciones en un modelo similar o en cultivos de miotubos que carecen del gen para CaV1.1, pudiendo agregar el análisis de la participación de los VSDII y VSDIV.

## Abstract

The L type  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\text{CaV1.1}$  is a voltage-gated channel, mainly expressed in skeletal muscle, where its most studied function is the one related to its participation in the excitation-contraction coupling. Its functioning depends on conformational changes that occur in response to variations in membrane potential, similarly to other voltage-gated channels like  $\text{K}^+$  channels, conversely to  $\text{K}^+$  channels, the alpha subunit of  $\text{CaV1.1}$  is a heterotetramer composed by four domains (I - IV), named voltage-sensing domains (VSD). Positive charged amino-acids located in these domains, mainly those located in S4 segment of each VSD, are postulated to be responsible of conformational changes in the  $\text{CaV1.1}$  structure in response to changes in membrane potential, however, is not well known to date, how these domains participates individually or in group in the different process that  $\text{CaV1.1}$  participate. It is important to clarify the mechanism by  $\text{CaV1.1}$  is responding to depolarizing stimulus that can end in muscle contraction, different gene expression, and other consequences of its activation.

This study analyzed the function of the voltage-sensing domains (VSDs) I and III, of  $\alpha_1$ s subunit of  $\text{CaV1.1}$  individually, using a model of transgenic protein expression, using in vivo muscle electroporation of *flexor digitorum brevis* (FDB) of C57BL/6 male mice. Transfecting the  $\text{CaV1.1}$  gene with a change in the amino acids that are thought to be responsible for sensing changes in the membrane potential of VSD I and III of  $\alpha_1$ s subunit, replacing it by glutamines. The functional analysis was performed through the measurement and registration of L type calcium currents and the calcium transients release with whole-cell voltage-clamp with silicone gap technique and fluorescent microscopy.

Results show an increase in the  $\text{Ca}^{2+}$  current amplitude in mVSDIII mutant, at pulse 20mV against control WT  $\alpha 1s$  ( $p < 0,05$ ). Charge neutralization in S4 segment of VSDI did not affect the current amplitude. analyzing the voltage dependence of the current through Boltzmann function fitting shows a significative higher current conductance in mVSDIII mutant than in control ( $p < 0,05$ ). Depolarization induced  $\text{Ca}^{2+}$  release is slightly higher in mVSDI transfected fibers, but data did not reach statistical significance.

With these results, we can suggest that the transgenic protein expression method is useful to study the function of  $\text{CaV}1.1$   $\text{Ca}^{2+}$  channel. The neutralization of charged amino-acids in the S4 segment of VSDIII produces an increase in the maximum conductance of  $\text{Ca}^{2+}$  through this channel ( $p < 0,05$ ), this might suggest a current limiting role for this domain, or that perhaps the neutralization of charges in the S4 segment produces changes in the three-dimensional structure of the pore, increasing its size, decreasing resistance and then, increasing its conductance. Despite it, this domain would not have participation in the transient  $\text{Ca}^{2+}$  release, so the functional link between  $\text{CaV}1.1$  and RYR1 does not depend on conformational changes derived from the movement of VSD III S4 segment. The neutralization of charges in the S4 segment in VSDI have no impact on the studied processes, as no significant differences were found between the results of mutated versus control condition. It is necessary to complement these results with further research in this model or others, like myotubes cultures without  $\text{CaV}1.1$  gene, maybe adding the analysis of the role of VSDII and VSDIV.

## Introducción

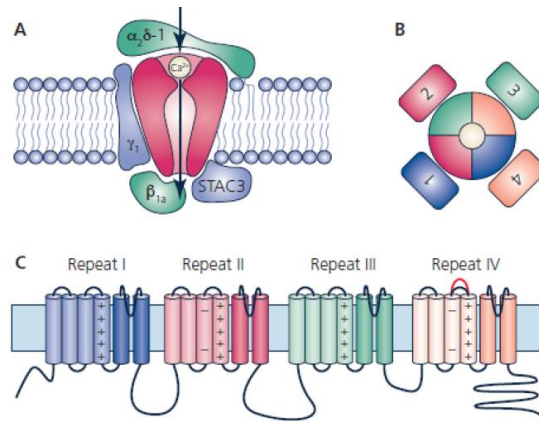
La señalización celular depende de mecanismos que sean capaces de recibir y registrar diversos estímulos y responder de manera adecuada a ellos. En el caso de las señales eléctricas, las estructuras celulares responsables de este proceso son los canales iónicos gatillados por voltaje, estos responden a cambios en el potencial de membrana modificando su estado conformacional. La respuesta puede ser variable en función de la diferencia de potencial a la que se vea sometido, característica llamada dependencia de potencial. La dependencia de la activación de un canal frente a cambios en el potencial de la membrana depende del movimiento de residuos de aminoácidos cargados, ubicados en los segmentos transmembrana que forman parte de su estructura (Catterall, 2010). Fisiológicamente, el movimiento de estos segmentos transmembrana se produce por la interacción entre la carga eléctrica de estos residuos y el campo eléctrico que se genera a través de la membrana producto de la diferencia de potencial entre sus caras intra y extra celular, por ejemplo, como consecuencia del potencial de acción.

### Canal de $\text{Ca}^{2+}$ CaV1.1

Dentro de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  gatillados por voltaje encontramos al canal de  $\text{Ca}^{2+}$  CaV1.1, también conocido como receptor de dihidropiridinas (DHPR) o canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L (Reuter, 1983; Rios & Brum, 1987). Este canal se expresa principalmente en el músculo esquelético y es el encargado de gatillar procesos tan importantes como el acoplamiento excitación contracción y la excitación transcripción (Araya et al., 2003; Casas et al., 2010; Jorquera et al., 2013; Rios & Brum, 1987). El canal CaV1.1 está formado por cuatro subunidades proteicas: Alfa 1 ( $\alpha_1s$ ), Beta ( $\beta$ ), Gama ( $\gamma$ ) y Alfa 2

Delta ( $\alpha 2\delta$ ) (Figura 1). La subunidad Alfa 1 ( $\alpha 1s$ ), es la responsable de formar el poro del canal y posee los aminoácidos cargados que le otorgan la capacidad sensora de voltaje. Está compuesta por cuatro dominios similares no-homólogos (I – IV) denominados VSD (*voltage-sensing domain*). Cada dominio presenta un segmento transmembrana sensor de voltaje (hélices S1 a S4) y un segmento formador del poro (hélices S5-S6 más el *loop* que las une). Los segmentos S4 poseen al menos cuatro cargas positivas dadas por la presencia de residuos de aminoácidos arginina y lisina. Se cree que en estos dominios cargados descansa la función sensora de voltaje, ya que las cargas positivas le permitirían al canal responder a modificaciones en el potencial de membrana alterando, como consecuencia, su estado funcional. (Campiglio & Flucher, 2017; Campiglio Marta & Flucher Bernhard E., 2015; Catterall, 2000; FELIX, 2005; Held et al., 2016; Tuluc et al., 2009). En cuanto a los segmentos S1 a S3, estos poseen residuos con carga negativa altamente conservados en los distintos tipos de canales gatillados por voltaje (Palovcak et al., 2014). Investigaciones respecto a los mecanismos de activación de los canales iónicos gatillados por voltaje han arrojado evidencia respecto a la función atribuible a estos segmentos, los que actuarían como contra-cargas capaces de formar interacciones electrostáticas con las cargas positivas del segmento S4, interacciones que serían fundamentales para la maduración y plegado de la proteína, así como también para su estabilidad en el estado de reposo y el movimiento hacia la cara extracelular del segmento S4 frente a cambios en el potencial de membrana (Groome & Bayless-Edwards, 2020).

En condiciones fisiológicas, el canal CaV1.1 no es capaz de generar una corriente iónica por su poro debido a la corta duración del estímulo despolarizante generado por el potencial de acción (2ms) en el musculo esquelético (se requieren despolarizaciones mayores a 100ms para ver una corriente macroscópica de Ca<sup>2+</sup> a través del Cav1.1) (Tuluc et al., 2009). Pese a ello, en condiciones experimentales, pueden generarse corrientes de Ca<sup>2+</sup>, denominada corrientes de tipo L (L por “larga” duración), útiles para estudiar el funcionamiento de este canal (C. Collet et al., 2003; DiFranco et al., 2011).



**Figura 1: Estructura de CaV1.1** A) Organización de sus 4 subunidades principales, subunidad formadora de poro  $\alpha 1$ , subunidades auxiliares  $\alpha 2\delta$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y la proteína STAC3. B) Organización de la subunidad  $\alpha 1$ , en una estructura pseudotetramérica con un poro central rodeado de 4 dominios sensores de voltaje. C) La subunidad  $\alpha 1$  se compone de 4 segmentos transmembrana cada uno de ellos con 6 hélices transmembrana de las cuales la hélice 4 forma el sensor de voltaje primario, las hélices 5 y 6 más el loop que las une forman el poro del canal. Extraído de Flucher & Tuluc, 2017.

## Rol de los dominios sensores de voltaje

Una serie de investigaciones de los últimos años han intentado dilucidar la función individual de los distintos VSDs de los canales de la familia CaV1. Tuluc en el 2009 estudió variantes de *splicing* de CaV1.1 en cultivos de miotubos humanos, reportando que la eliminación del exón 29 de CaV1.1 (lo que modifica la estructura del *loop* entre

los segmentos S3 y S4, acortándolo en 19 aminoácidos) genera un desplazamiento hacia potenciales más negativos de la curva de dependencia de voltaje de la activación del canal, ocurriendo a potenciales menos despolarizados que su variante completa (Tuluc et al., 2009). El mismo grupo en el 2016 postula que la cinética de activación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de  $\text{CaV1.1}$  estaría controlada por el VSD I mientras que el VSD IV estaría vinculado con la sensibilidad al voltaje mediante la función del *loop* entre los segmentos S3 y S4 (Tuluc et al., 2016). Por otro lado Pantazis en el 2014 determinó, mediante técnicas de *voltage-clamp* y fluorometría, que los distintos VSDs del canal  $\text{CaV1.2}$  (expresado principalmente en músculo cardíaco, donde la función de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  es imprescindible para su rol fisiológico en el acoplamiento excitación contracción del cardiomiocito), responden en forma diferencial a la despolarización de membrana. En este sentido, los autores observaron que la cinética de activación de los dominios I, II y III es rápida, mientras que la cinética de activación del dominio IV es mucho más lenta, por lo que plantean que este dominio podría no ser necesario para la apertura del canal. Estos autores concluyen que, los dominios II y III son los principales encargados de la apertura del canal, ya que su activación precede a la aparición de la corriente, función en la que el dominio I tiene una menor participación debido a que su activación es posterior a la estabilización de la corriente iónica (Pantazis et al., 2014).

García en 1997 llevó a cabo experimentos de anulación de cargas individuales en los S4 de los distintos VSDs de  $\text{CaV1.1}$ , a través de la expresión de canales mutantes en cultivos de miotubos disgénicos, tratando de describir el rol de los segmentos S4 en la activación del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Sus resultados mostraron que al reemplazar los



residuos individuales con carga positiva por glutaminas (neutralización de carga) o por glutamato (inversión de carga) se alteraban algunas de sus propiedades siendo las mutaciones en los dominios I y III las que producían cambios significativos. La neutralización de carga en el dominio I produjo un desplazamiento del  $V_{0,5}$  a potenciales más positivos con respecto al  $V_{0,5}$  del control, mientras que la inversión de carga aumentaba este efecto. En cuanto al dominio III la neutralización de carga produjo efectos diferenciados, llevando el  $V_{0,5}$  a potenciales más o menos despolarizados dependiendo del aminoácido reemplazado. Además, observaron que estas mutaciones producían un aumento en la constante de tiempo de la activación de la corriente y modificaban la dependencia de potencial de la conductancia (García et al., 1997). Estos antecedentes sugieren que los VSDs I y III estarían implicados en la dependencia a potencial de CaV1.1 y que cambios en las cargas eléctricas de los distintos segmentos S4, podrían alterar su movilidad y con ello la dependencia de voltaje, así como también la capacidad de permitir el paso de una corriente iónica a través de CaV1.1.

### Liberación transitoria de $Ca^{2+}$

En cuanto a la liberación transitoria de  $Ca^{2+}$ , se postula que la región de CaV1.1 involucrada en el control de la apertura del canal receptor de rianodina tipo 1 (RYR1) sería el *loop* citosólico entre los VSDs II y III, donde una secuencia de 30 aminoácidos (desde el 734 al 764) le entrega las características estructurales fundamentales que posibilitan la interacción entre CaV1.1 y RYR1, (Fill & Copello, 2002; Kugler et al., 2004; Lanner et al., 2010), Efremov en el 2015, estudió la estructura y arquitectura de RYR1 y estableció que el sitio de interacción más probable de RYR1 con CaV1.1 es

una secuencia repetida de 110 aminoácidos organizada en dos tándems, donde cada uno se pliega de manera diferenciada estableciendo dos dominios, de los cuales el dominio III - IV está posicionado en la parte citoplasmática de RYR1 permitiendo el acercamiento espacial con CaV1.1 facilitando y posibilitando su interacción (Efremov et al., 2015). De acuerdo a lo anterior, se esperaría que la alteración del movimiento del VSDIII, producto de la modificación o eliminación de las cargas positivas en el segmento S4, pueda tener un impacto sobre la activación y apertura de RYR1, lo que aún no ha sido estudiado.

Actualmente se desconoce la participación diferencial de los distintos VSDs de CaV1.1 en la activación del poro del canal, en la activación del canal receptor de rianodina en fibras musculares adultas y en el acoplamiento excitación-transcripción. En este estudio se analizaron los efectos de la neutralización de cargas positivas de los segmentos S4 de los dominios VSDI y VSDIII de CaV1.1, sobre las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo L y la liberación transitoria de  $Ca^{2+}$  a través de RYR1 en fibras musculares aisladas de ratones adultos, con el objetivo de conocer su participación en estos procesos.

## Hipótesis

La neutralización de las cargas positivas de los dominios sensores de voltaje I y III de CaV1.1 expresado en fibras musculares adultas, modificarán la función de CaV1.1 alterando la dependencia de voltaje de la activación de la corriente de Ca<sup>2+</sup> y la activación de la liberación transitoria de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo sarcoplasmático.

## Objetivo General

Determinar el efecto de la expresión de CaV1.1 mutantes (con neutralización de las cargas positivas de los segmentos S4) de los VSD I y III, sobre las corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo L y liberación transitoria de Ca<sup>2+</sup> intracelular inducida por despolarización en fibras musculares adultas.

## Objetivos Específicos

1. Medir corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo L en fibras musculares que expresen el CaV1.1 mutante para los dominios sensores de voltaje I y III
2. Medir la liberación transitoria de Ca<sup>2+</sup> intracelular inducida por despolarización en fibras musculares que expresen CaV1.1 mutante para los dominios sensores de voltaje I y III

## Materiales y métodos

La presente investigación fue realizada en el laboratorio de fisiología celular del músculo a cargo de la Dra. Mariana Casas y del Dr. Enrique Jaimovich. El laboratorio pertenece al Programa de Fisiología y Biofísica del ICBM y al Centro de Estudios de Ejercicio, Metabolismo y Cáncer (CEMC) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Los procedimientos y el manejo de modelos biológicos se realizaron de acuerdo al libro de protocolos de bioseguridad y bioética. Este proyecto se encuentra adjunto al Proyecto Fondecyt 1151293, titulado "*Excitation-metabolism coupling in skeletal muscle; basic mechanism and their alteration in obesity and aging*" cuyo investigador responsable es el Dr. Enrique Jaimovich con la debida aprobación del comité de bioética sobre investigación en animales de la facultad de medicina de la Universidad de Chile.

### Tamaño muestral y grupos experimentales

En este estudio se utilizaron 24 ratones macho C57BL/6 de entre 6 a 7 semanas de edad. Para calcular el tamaño muestral se utilizó el análisis de potencia estadística mediante el uso del software G\*Power 3.1. De acuerdo a trabajos recientes con mutaciones de CaV1.1 se propone un tamaño muestral de 50 unidades experimentales por condición (fibras musculares adultas aisladas) (Fuster et al., 2017). Alcanzando así una potencia estadística de un 75% con un error alfa de 0,05. Pese a ello, por problemas técnicos con los equipos de electrofisiología no se pudo alcanzar esta cantidad.

Durante la fase de análisis de datos se debieron excluir registros de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  por no cumplir criterios de calidad, principalmente debido a la presencia de una corriente positiva al final de los pulsos de comando, la que era de igual o mayor magnitud a la corriente estudiada haciendo imposible determinar si los valores encontrados correspondían efectivamente a la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. Producto de esta revisión quedaron 6 fibras musculares adultas para la condición control (electroporadas con la variante WT de  $\text{CaV1.1}$ ), 3 fibras musculares para la condición mutada mVSDI (provenientes de 2 ratones) y 3 fibras musculares para la condición mutada mVSDIII (provenientes de 2 ratones). Se agregan además el registro de 7 fibras musculares no electroporadas como control adicional.

Para la liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizaron 18 fibras para la condición control (electroporadas con la variante WT de  $\text{CaV1.1}$ ), 16 fibras musculares para la condición mutada mVSDI (provenientes de 3 ratones) y 23 fibras musculares para la condición mutada mVSDIII (provenientes de 5 ratones).

### Electroporación del músculo *in vivo*

Se utilizaron ratones C57BL/6 de 6 a 7 semanas de edad en los que se indujo la expresión de las variantes mutadas de  $\text{CaV1.1}$  mediante la técnica de electroporación de músculo esquelético *in vivo* descrita por Di Franco (DiFranco et al., 2009). Los ratones fueron anestesiados mediante la inhalación de isofluorano utilizando una cámara cerrada. A continuación, se les inyectó 10  $\mu\text{L}$  de solución de hialuronidasa 2 mg/ml en la región donde se ubica el *FDB*. Luego de la inyección se deja descansar al animal en su jaula por una hora, para luego volver a anestesiarlo por inhalación de isofluorano. Una vez anestesiado, se inyecta entre 10 a 20  $\mu\text{L}$  de solución de plasmidio

que contenga al menos 20 µg de DNA plasmidial, inyectando el plasmidio que codifica para la variante WT en la pata izquierda del animal y las variantes mutadas en la pata derecha. Una vez inyectado el DNA a transfectar, se deja descansar al ratón por 15 minutos en su jaula, pasado este tiempo se vuelve a anestesiarse para proceder con la electroporación. Con el animal anestesiado se inmoviliza la pata a electroporar, luego se insertan en la pata 2 electrodos paralelos, uno ubicado bajo la piel de la base de los dedos y el otro ubicado bajo la piel del talón, estos electrodos se conectarán al estimulador el que entregará 20 pulsos de 20 ms de duración con una frecuencia de 1 Hz, entregando un campo eléctrico de 100 V/cm. Este procedimiento se repetirá en la otra pata luego de lo cual el animal será regresado a su jaula para recuperarse de la anestesia. La obtención de las fibras musculares aisladas se llevará a cabo 21 días después de la electroporación con el objeto de permitir la máxima expresión de las proteínas transfectadas. Para obtener las fibras musculares aisladas se sigue el protocolo descrito por Povreau (Anexo 1), en síntesis, los ratones se sacrifican mediante dislocación cervical, luego se extraen los músculos FDB de cada pata mediante disección, estos serán sometidos a tratamiento con solución de colagenasa tipo 2 por 60 minutos, luego de los cuales se inicia el proceso de disociación mecánica por aspiración y expulsión a través de pipetas de diámetro decreciente, obteniendo así cientos de fibras musculares aisladas (Pouvreau et al., 2007).

### Mutantes de subunidad $\alpha 1s$

Para llevar a cabo el estudio funcional de los dominios sensores de voltaje I y III de la subunidad  $\alpha 1s$  se utilizarán mutantes de segmento S4, libres de carga lo que se obtendrá al reemplazar cada uno de los aminoácidos cargados (argininas y lisinas) por

glutaminas, de acuerdo a las mutaciones habituales de dominios S4 de otros canales activados por voltaje. Así entonces se generarán 2 mutantes principales, donde cada uno de ellos tendrá sólo un dominio sensor de voltaje alterado, esto se logrará utilizando un plasmidio que posee la secuencia de CaV1.1 humano, bajo el control de un promotor de citomegalovirus (pCMV6-AN-TurboGFP CACNA1S). Este plasmidio será utilizado en la electroporación de músculos *in vivo* con la información genética que codifica para la proteína mutante. Para identificar la correcta transfección, el plasmidio cuenta con una secuencia en el extremo amino-terminal que codifica para la proteína fluorescente verde (GFP), la que al ser estimulada con láser de 488nm de longitud de onda, emite fluorescencia en el rango de 505nm a 560nm, pudiendo ser confirmada su expresión y determinada su ubicación subcelular por medio de microscopia de fluorescencia.

La construcción de estos mutantes se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Diego Varela en el contexto de su colaboración con nuestro laboratorio.

### Voltage-Clamp de Célula Completa con aislación por grasa de silicona

La técnica de *voltage-clamp* con aislación de la fibra muscular por grasa de silicona consiste en el uso de un *setup* de electrofisiología (Anexo 2), con el que se logra el *voltage-clamp* de célula completa de una célula muscular adulta. La aislación con grasa de silicona permite estudiar el comportamiento de un segmento pequeño de la fibra muscular al cubrir con grasa de silicona la mayor parte de la célula, dejándola aislada del medio externo.

Para realizar la estimulación y registro se utiliza un microelectrodo de boro-silicato, el que atravesará la fina capa de silicona y luego penetrará la membrana celular

completando la configuración base del experimento (Figura 2) (Pouvreau et al., 2007). Las soluciones a utilizar aparecen detalladas en los anexos de este escrito (Anexo 2). El protocolo de estimulación para el registro de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se describe a continuación: La célula se mantiene en condiciones de potencial controlado a  $-80\text{mV}$ , a partir de este se inicia la estimulación con un pre pulso hiperpolarizante de  $-20\text{mV}$  y  $500\text{ms}$  de duración, a continuación, se estimula con un pulso de comando de  $500\text{ms}$  y a potenciales que van desde los  $-40\text{mV}$  a los  $+80\text{mV}$ . El tiempo de reposo entre cada estímulo será de 20 segundos permitiendo así el restablecimiento de la condición de apertura/activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para evaluar la dependencia de voltaje se utilizan pulsos de comando que van desde potenciales hiperpolarizados cercanos al potencial de reposo, hasta potenciales muy despolarizados realizando así un barrido de potenciales de pulso que permita poder describir el comportamiento del canal estudiado, en la literatura se describen protocolos similares con incrementos de  $10\text{mV}$  por pulso con buenos resultados con respecto al registro de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. La utilización de un pre pulso hiperpolarizante de  $-20\text{mV}$  tiene como objetivo el registro de la corriente lineal capacitiva, corriente que será escalada para cada pulso de comando y luego restada de los registros compensando así esta corriente.





**Figura 2: Voltage-Clamp con aislación por grasa de silicona.** Se observa la configuración final del experimento, donde el capilar de boro-silicato atraviesa tanto la fina capa de silicona como la membrana de la fibra muscular estudiada, la que presenta su extremo libre sin cobertura de silicona. Imagen propia.

### Medición de la liberación transitoria de $\text{Ca}^{2+}$

Para medir la liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizó Rhod2-AM, sonda que ha sido empleada previamente para analizar el comportamiento de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Belmonte & Morad, 2008; Del Nido et al., 1998). Las células se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$  en la sala), a una concentración de  $5\mu\text{M}$  de Rhod2-AM (*ThermoFisher*) en el medio, permitiendo el ingreso del marcador a la célula. Pasado este tiempo, se realiza el procedimiento de aislación por grasa de silicona y se reemplaza el medio por solución externa mediante 3 lavados.

El protocolo de estimulación eléctrica en la configuración de *voltage clamp* de célula completa para la medición de las corrientes transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  corresponde a 15 pulsos despolarizantes de 50ms de duración, desde  $-100\text{mV}$  a  $40\text{mV}$ . Al igual que el protocolo de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L, se busca realizar un barrido de potenciales que permita describir el comportamiento de la liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  en respuesta al estímulo despolarizante en las distintas condiciones.

## Método de análisis de datos: Corriente de Ca<sup>2+</sup> tipo L y Transitorios de Ca<sup>2+</sup>

Para el registro de datos se utilizará el software Clampex 9.2, desde el cual se generan los pulsos de comando y se obtienen los registros de corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo L, estos serán analizados posteriormente en el software Origin 2018 siguiendo el protocolo de análisis de datos detallado en anexo 3, describiendo los resultados mediante los parámetros obtenidos al realizar el ajuste de Boltzmann de las curvas de intensidad de corriente *versus* voltaje (I/V) mediante la siguiente ecuación:

$$y = \frac{(x - vrev) \times gmax}{1 + e^{(x-v0,5)/k}}$$

donde  $y$  es la corriente máxima durante el potencial de comando ( $x$ ),  $gmax$  es la conductancia máxima,  $vrev$  es el potencial de reversión,  $V0,5$  corresponde al potencial de mitad de corriente máxima y  $k$  corresponde a la constante de Boltzmann o el factor de pendiente. Pudiendo así describir la dependencia de voltaje y comparar fibras que expresan la variante WT con las fibras que expresan las variantes mutadas de la subunidad  $\alpha 1s$ .

Para los datos de liberación transitoria de Ca<sup>2+</sup>, estos se obtuvieron de acuerdo al procedimiento descrito por Kutchukian (Kutchukian et al., 2017), brevemente: se utilizó un microscopio confocal Pascal5, con un objetivo de inmersión 63x (f1.4) asociado a un estimulador láser LSM5, equipo que está conectado a los instrumentos necesarios para mantener la configuración de *voltage clamp*. Para la detección de Ca<sup>2+</sup> se utilizó la sonda fluorescente Rhod-2 AM la que se estimulará con láser de 543nm recolectando la fluorescencia sobre 580nm, mediante escaneos lineales de la región estudiada de 1.54ms de duración durante el protocolo de estimulación. Los

incrementos transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  se van a expresar como la variación de fluorescencia con respecto a la fluorescencia basal en unidades  $F/F_0$ , donde  $F$  es la fluorescencia registrada post evento y  $F_0$  la fluorescencia basal. Estos datos serán analizados según protocolo (Anexo 4) y se obtendrán los valores *peak* de fluorescencia para cada pulso despolarizante, valores que luego serán presentados en graficas de  $\Delta F/F_0$  versus Potencial, curvas sobre las que se aplicará un ajuste de Boltzmann para 2 estados con el fin de describir la fluorescencia máxima ( $A_2$ ), el potencial de mitad de fluorescencia máxima ( $V_{0,5}$ ) y el factor de pendiente ( $k$ ), según la siguiente formula:

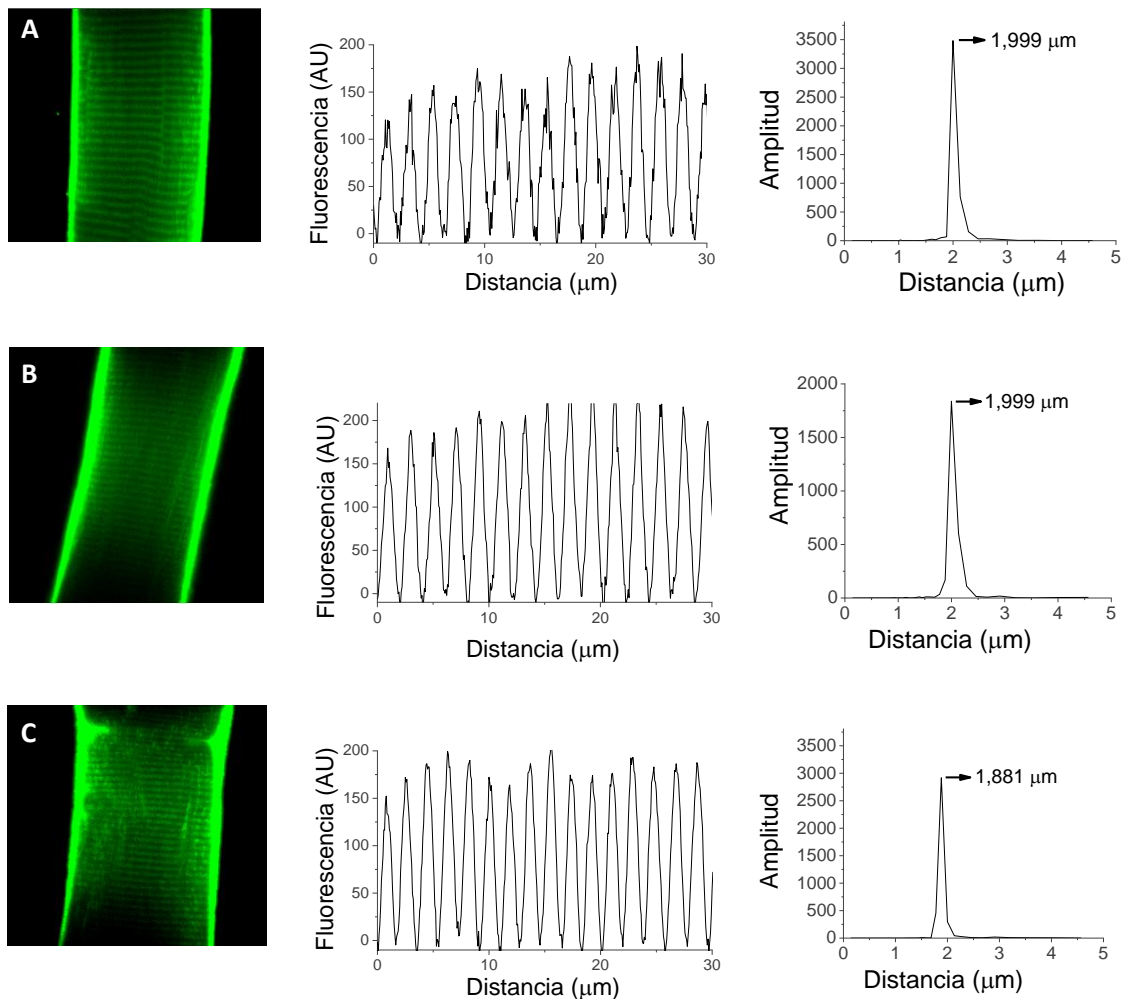
$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-V_{0,5})/k}} + A_2$$

### Análisis estadísticos

Los valores se reportan como medias  $\pm$  error estándar o medianas, mínimos y máximos según se indique. Los análisis estadísticos de los datos se realizaron con el software IBM SPSS Statistics 26 usando una prueba de Kruskal-Wallis y un test *post hoc* de Bonferroni para determinar diferencias entre las condiciones versus control electroporado WT, ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

### Electroporación de fibras musculares adultas con variantes WT y mutadas para los dominios sensores de voltaje de subunidad $\alpha 1s$ de CaV1.1



**Figura 3: Confirmación de electroporación.** La expresión de  $\alpha 1s$  WT y mutantes VSDI y III de CaV1.1 presenta una localización acorde con la esperada para los túbulos T. A la izquierda, se presentan imágenes representativas con aumento de 63x de una fibra muscular adulta aislada, al centro su respectivo perfil de fluorescencia y a la derecha análisis de densidad espectral (transformación de Fourier). A: electroporada con la variante WT de  $\alpha 1s$  de CaV1.1, B: electroporada con la variante mutada en VSDI de  $\alpha 1s$  de CaV1.1 y C: electroporada con la variante mutada en VSDIII de  $\alpha 1s$  de CaV1.1.

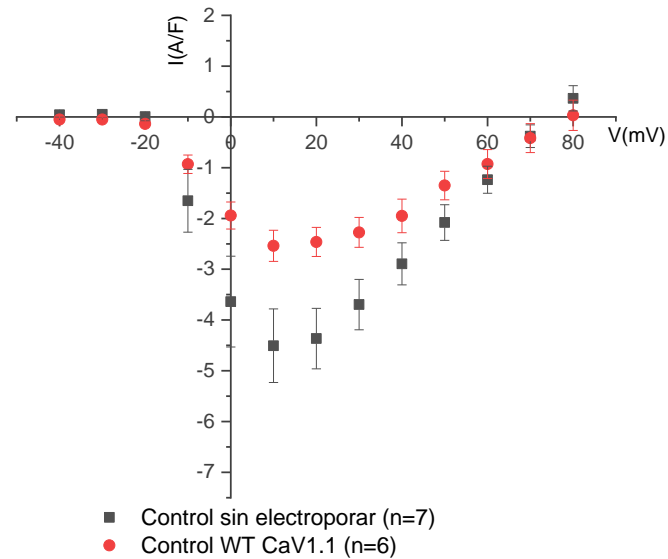
Como confirmación de electroporación, se realizó el registro de imágenes con fluorescencia verde en respuesta a la estimulación de cada fibra con láser de Argón a 488nm. De este análisis se obtuvieron las imágenes representativas mostradas en la figura 3. De acuerdo al análisis del espectro de potencia derivado de la transformación de Fourier de los perfiles de fluorescencia se obtiene que la distancia entre los peaks de fluorescencia es aproximadamente 2.0  $\mu\text{m}$ , distancia acorde a lo esperado para los túbulos T en músculo estriado (DiFranco et al., 2005; Hong & Shaw, 2017). Esto sugiere que las proteínas mutadas transfectadas se ubicarían en estas estructuras. Cabe mencionar que para cada una de las fibras estudiadas se realiza la confirmación de electroporación mediante la estimulación laser y se almacena la imagen fluorescente obtenida.

#### Medición de corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ tipo L en fibras musculares electroporadas que expresan $\text{CaV1.1 } \alpha 1\text{s}$ mutante para los distintos dominios sensores de voltaje.

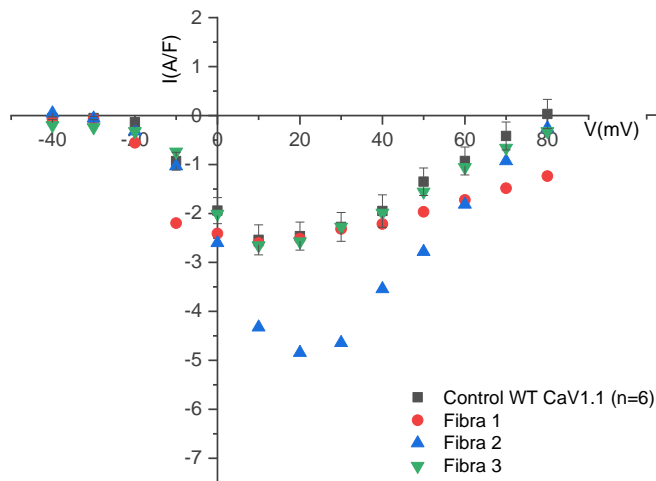
En los experimentos de medición de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, observamos la presencia de una corriente de aparición tardía (Anexo 5, C y D), presente en todos los registros, esta corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  corresponde a la primera corriente registrada en cada experimento y es similar a lo presentado por otros autores que utilizan la misma técnica (C. Collet et al., 2003; Claude Collet et al., 2004, 2004; DiFranco Marino et al., 2011; Jorquera et al., 2013; Kutchukian et al., 2017; Weiss et al., 2010). Los datos sugieren que la electroporación y expresión de variantes mutantes del canal  $\text{CaV1.1}$  no interfieren con la obtención de registros de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , similar a lo publicado por otros autores (DiFranco et al., 2011). Las corrientes máximas obtenidas son acordes a lo reportado en la literatura para corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de  $\text{CaV1.1}$ , las que

alcanzan su *peak* en el rango de potenciales que van desde 10mV a 30mV (Claude Collet et al., 2004; Jorquera et al., 2013).

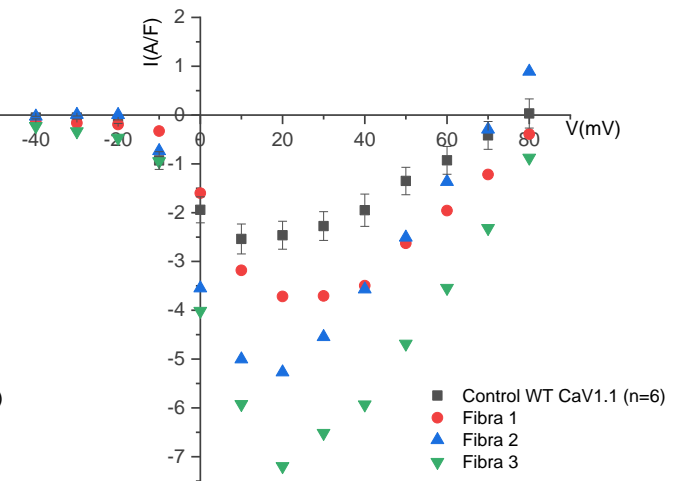
**A** Corriente de calcio a través de CaV1.1 (I/V) Control sin electroporar vs CaV1.1 WT



**B** Corriente de Ca<sup>2+</sup> WT vs mVSDI



**C** Corriente de Ca<sup>2+</sup> WT vs mVSDIII



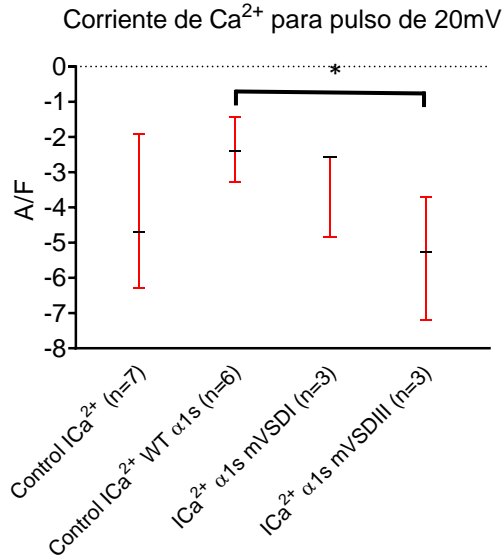
**Figura 4. Curvas I/V de Corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo L. Promedios de *peaks* de corrientes evocadas por los potenciales de comando desde -40 a 80 mV. Control *versus* Condición. Medias  $\pm$  ES. A) Curva I/V Control sin electroporar *versus* Control electroporado WT. B) Curva I/V Control electroporado *versus* mVSDI. C) Curva I/V Control electroporado *versus* mVSDIII.**

En la figura 4 se observan las curvas de corriente *versus* potencial (curva I/V) (Medias  $\pm$  ES). Se muestra que en (A) las corrientes máximas de la condición control electroporado WT, si bien se observan menores a la condición control sin electroporar, esta diferencia no alcanza significancia estadística (Tabla 1). En (B) y (C) se observa que las corrientes máximas para cada pulso de comando serían levemente mayores en la condición mutada que en la condición control electroporado WT desde los -20 mV. Se observa en (C) que para la condición mVSDIII existe una mayor corriente de Ca<sup>2+</sup> con respecto a la condición control electroporado WT, diferencia significativa para el potencial 20 mV ( $p < 0,05$ ) (Figura 5). El detalle de los datos presentados se encuentra en la tabla 1.

**Tabla 1. Resumen de Corrientes de calcio tipo L para cada condición estudiada. Valores en A/F (Mediana, Mínimo, Máximo)**

Potencial de comando (mV)	Control ICa <sub>2+</sub> (sin electroporar) (n=7)			Control ICa <sub>2+</sub> (electroporada con WT $\alpha$ 1s)(n=6)			ICa <sub>2+</sub> $\alpha$ 1s mVSDI (n=3)			ICa <sub>2+</sub> $\alpha$ 1s mVSDIII (n=3)		
	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max
-40	0,081	-0,142	0,210	-0,034	-0,148	0,025	-0,063	-0,199	0,048	-0,143	-0,229	-0,028
-30	0,076	-0,234	0,263	-0,059	-0,152	0,042	-0,071	-0,242	-0,058	-0,166	-0,337	0,007
-20	0,117	-0,321	0,212	-0,146	-0,256	-0,038	-0,323	-0,557	-0,319	-0,194	-0,469	0,006
-10	-1,622	-4,573	-0,039	-0,871	-1,715	-0,361	-1,034	-2,198	-0,741	-0,736	-0,950	-0,329
0	-3,395	-6,666	-0,524	-1,896	-2,950	-1,094	-2,409	-2,601	-2,009	-3,547	-4,016	-1,600
10	-3,928	-7,002	-1,470	-2,656	-3,254	-1,565	-2,655	-4,324	-2,604	-5,002	-5,923	-3,182
20	-4,704	-6,280	-1,923	-2,398	-3,289	-1,420	-2,573	-4,842	-2,514	-5,269	-7,196	-3,716 *
30	-4,152	-4,874	-1,690	-2,168	-3,190	-1,257	-2,316	-4,642	-2,276	-4,545	-6,517	-3,707
40	-3,193	-4,262	-1,227	-1,756	-2,986	-0,880	-2,217	-3,542	-1,988	-3,568	-5,934	-3,495
50	-2,131	-3,600	-0,753	-1,354	-2,253	-0,446	-1,967	-2,781	-1,556	-2,629	-4,687	-2,507
60	-1,301	-2,473	-0,316	-0,944	-2,023	-0,082	-1,723	-1,814	-1,056	-1,959	-3,546	-1,366
70	-0,168	-1,447	0,295	-0,379	-1,584	0,280	-0,928	-1,484	-0,662	-1,219	-2,318	-0,294
80	0,581	-0,517	1,080	0,312	-1,257	0,623	-0,324	-1,238	-0,256	-0,390	-0,876	0,891

\*Diferencia estadísticamente significativa de mVSDIII con respecto a control electroporado WT. Kruskal-Wallis más test post hoc de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5: Corriente de Ca<sup>2+</sup> a potencial 20 mV:** Contraste de hipótesis sobre las diferencias observadas en las corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo L. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto a control electroporado WT. Kruskal-Wallis más test post hoc de Bonferroni (p<0,05).

Para describir las propiedades de las corrientes de Ca<sup>2+</sup> evocadas por los potenciales de comando y su dependencia de voltaje se realiza el ajuste de Boltzmann a las curvas de corriente *versus* potencial, resultados que se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2. Propiedades de las corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo L según los parámetros de Boltzmann. (Mediana, Mínimo, Máximo).**

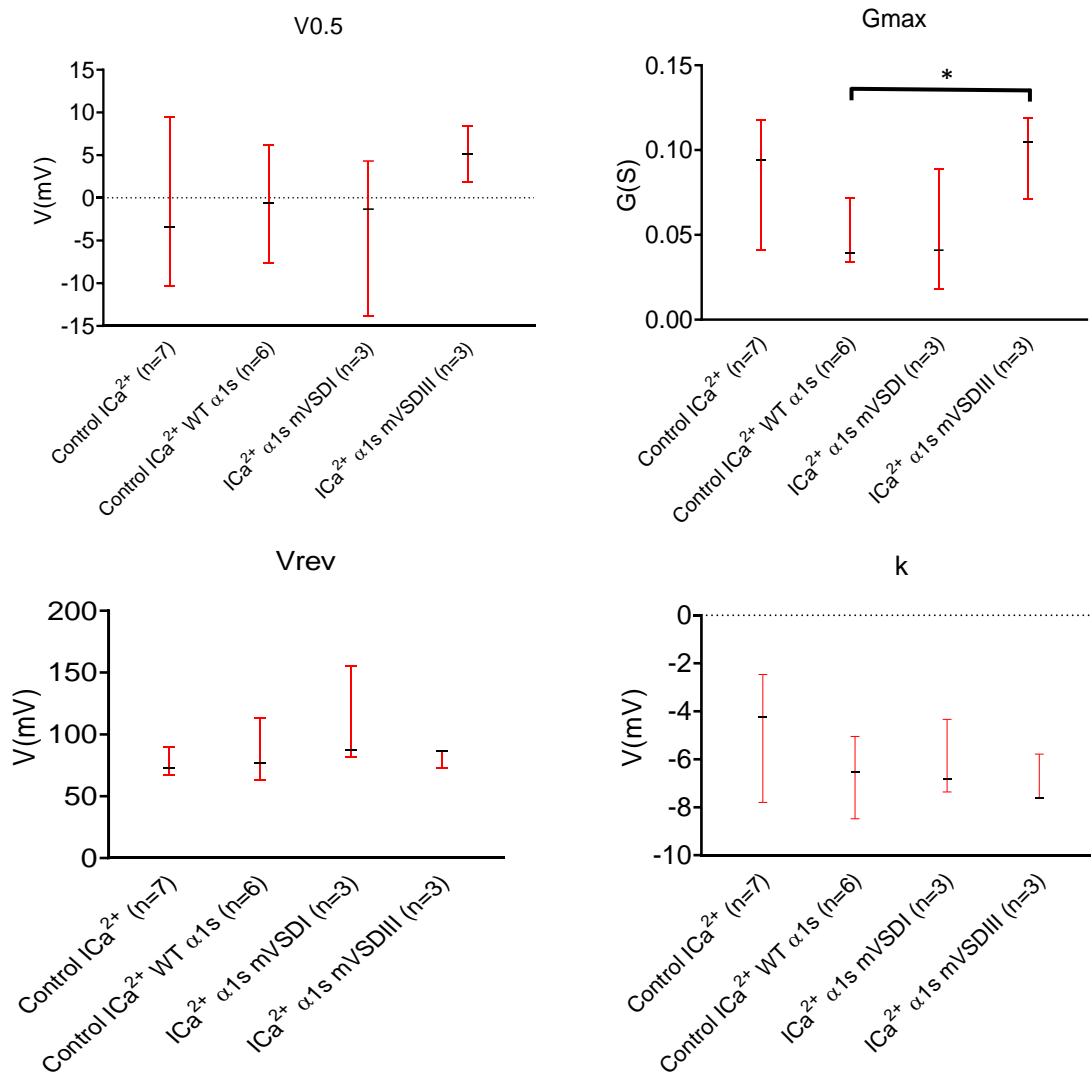
Parámetro	Control ICa <sup>2+</sup> (sin electroporar) (n=7)			Control ICa <sup>2+</sup> (electroporada con WT α1s)(n=6)			ICa <sup>2+</sup> α1s mVSDI (n=3)			ICa <sup>2+</sup> α1s mVSDIII (n=3)		
	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max
V <sub>0,5</sub> (mV)	-3,395	-10,344	9,467	-0,590	-7,622	6,164	-1,311	-13,857	4,312	5,149	1,847	8,370
k (mV)	-4,248	-7,801	-2,465	-6,540	-8,478	-5,052	-6,816	-7,361	-4,337	-7,633	-7,680	-5,787
G <sub>max</sub> (S)	0,094	0,041	0,118	0,039	0,034	0,072	0,041	0,018	0,089	0,105	0,071	0,119 *
V <sub>rev</sub> (mV)	72,522	66,770	89,618	76,915	63,146	112,935	87,171	81,376	155,664	86,839	72,805	88,924

\*Diferencia estadísticamente significativa con respecto a control electroporado WT. Kruskal-Wallis más test post hoc de Bonferroni (p<0,05).

No se observa una diferencia significativa entre la condición control no electroporado y el control electroporado con la variante WT de CaV1.1 α1s. La principal diferencia se encuentra en la conductancia máxima (G<sub>max</sub>), siendo mayor en la condición mVSDIII



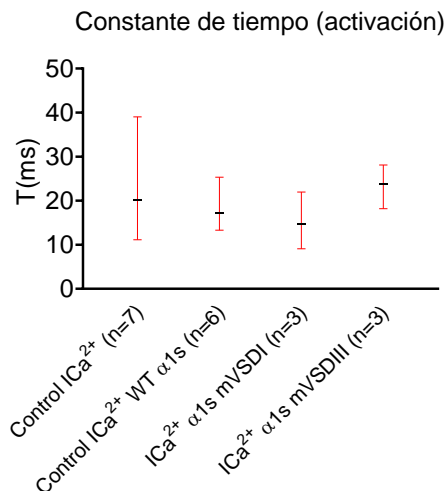
que en el control electroporado con la variante WT ( $p < 0,05$ ). Destaca que el potencial de reversión ( $V_{rev}$ ) no presenta diferencias entre las condiciones y está en el rango reportado en la literatura para registros de corrientes de  $Ca^{2+}$  (DiFranco et al., 2011; Jorquera et al., 2013; Kugler et al., 2004). En cuanto al potencial de mitad de corriente máxima ( $V_{0,5}$ ) y el factor de pendiente ( $k$ ), tampoco existirían diferencias significativas entre las condiciones (Figura 6).



**Figura 6. Dependencia de voltaje según ajuste de Boltzmann. (Medianas, Mínimos y Máximos).** Se muestra la caracterización de los registros de corrientes mediante los parámetros que entrega el ajuste de Boltzmann para cada condición estudiada. \*Diferencia estadísticamente significativa con respecto a control electroporado WT. Kruskal-Wallis más test post hoc de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

## Activación de las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ tipo L

Con el fin de describir la cinética de activación de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , se realizó un análisis mediante un ajuste exponencial de la fase de inicio de corriente para los pulsos a potencial de 20mV. Se utiliza el pulso de comando que lleva el potencial de membrana a 20mV en consideración a que es el pulso al cual el 80% de las fibras alcanza su corriente máxima. En la figura 7 se presentan las medianas, mínimos y máximos de las constantes de tiempo de los registros de cada condición. No existe diferencia en el tiempo de activación del canal entre las condiciones analizadas.

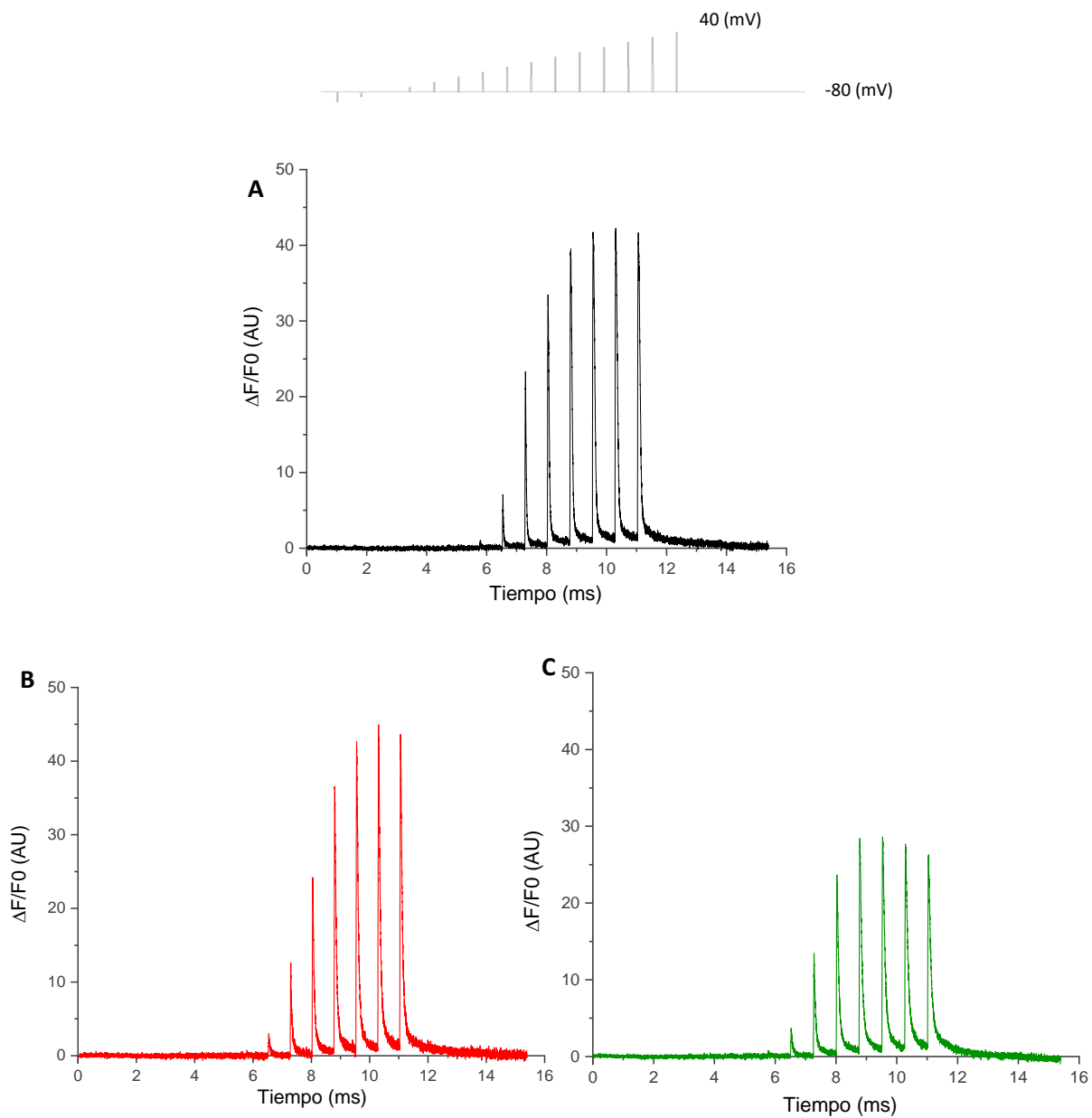


**Figura 7. Constante de tiempo de activación de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L. (Medianas, Mínimos y Máximos).** Se muestra la caracterización de las constantes de tiempo a potencial de 20mV, para cada condición estudiada.

## Liberación transitoria de $\text{Ca}^{2+}$

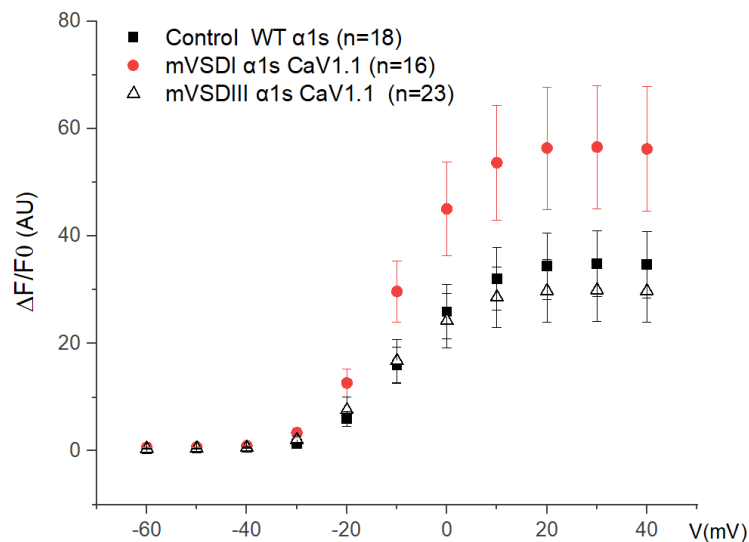
La liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por despolarización se estudió mediante el uso de la sonda fluorescente Rhod2-AM, sonda que presenta una afinidad a  $\text{Ca}^{2+}$  levemente menor a Fluo4-AM ( $K_d$  Rhod2 = 570nM *versus*  $K_d$  Fluo4=335 nM), el que ha sido utilizado en otros trabajos de nuestro laboratorio. Se eligió esta sonda en

consideración a la necesidad de obtener un registro de fluorescencia a una longitud de onda distinta a la emitida por el reportero GFP utilizado como marcador de transfección. Los resultados muestran que Rhod2-AM es útil para registrar las variaciones de concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. En las tres condiciones estudiadas se observa la existencia de un aumento transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  ante los estímulos despolarizantes del protocolo de estimulación tal como se ve en la figura 8.



**Figura 8. Liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$ , representativas de las distintas condiciones analizadas (fibra única).** Se muestran liberaciones transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  evocadas por los distintos pulsos de comando **A:** Arriba, se observa el protocolo de estimulación eléctrica con los distintos pulsos de comando (-100 hasta +40 mV). Abajo, liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  de una fibra control electroporada con el plasmidio WT de  $\alpha 1s$ . **B:** se observa el registro de una fibra control electroporada mVSDI. **C:** corresponde al registro en la condición mVSDIII.

Una de las principales funciones de CaV1.1 es la de controlar la liberación transitoria de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo sarcoplásmico a través de RYR1. Esta función se le ha atribuido al *loop* citoplasmático que une los dominios sensores de voltaje II y III (Kugler et al., 2004). La figura 9 muestra que tanto las variantes mutadas como control presentan liberación transitoria de Ca<sup>2+</sup>. Se observa además que el comportamiento de estos transitorios en las tres condiciones es cualitativamente similar, presentando una fase de ascenso rápido, levemente mayor en el mutante mVSDI y alcanzando su máximo a potenciales similares, además se observa un aumento en la fluorescencia máxima evocada en la condición mVSDI, sin embargo, estas diferencias no alcanzan significancia estadística, datos que se resumen en la tabla 3.



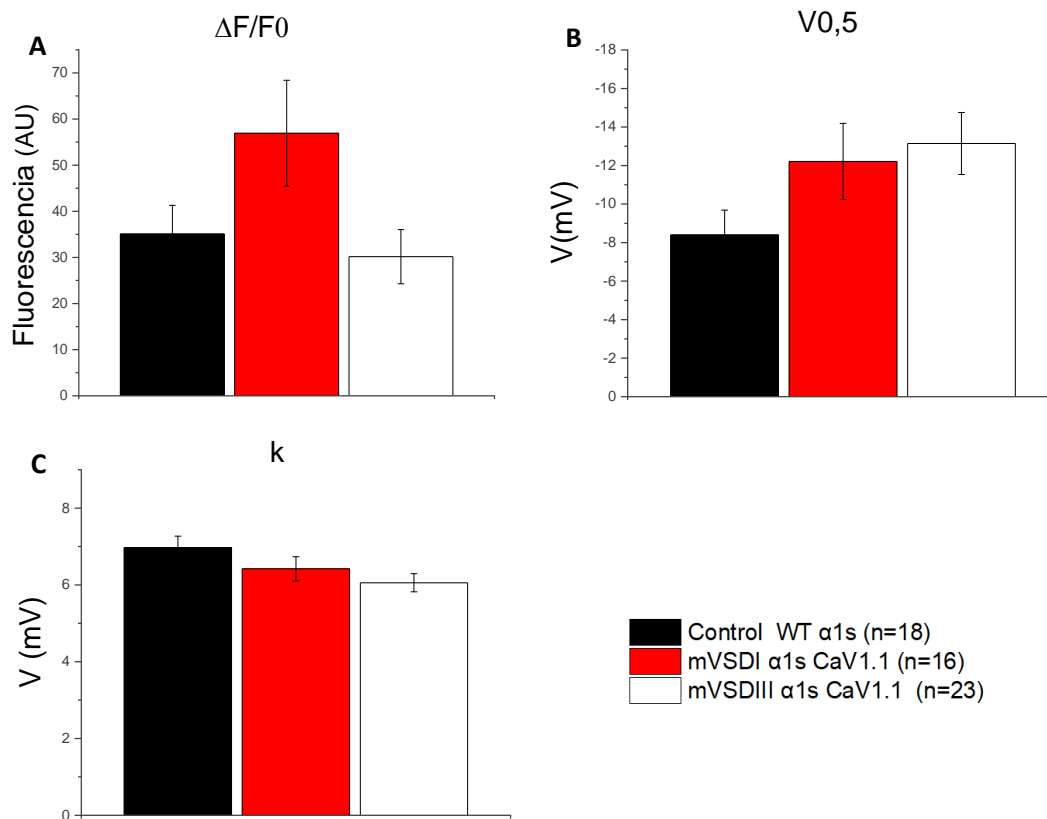
**Figura 9. Liberación transitoria de Ca<sup>2+</sup> versus potencial.** Promedio de fluorescencia para cada pulso de comando en las distintas condiciones estudiadas. Medias ± ES. Se observa la representación de los valores medios de  $\Delta F/F_0$  que se registran a cada potencial.

**Tabla 3. Resumen de liberación transitoria de calcio para cada condición estudiada (Medias  $\pm$  ES)**

Potencial de comando (mV)	Control WT $\alpha$ 1s (n=18) (AU)			mVSDI $\alpha$ 1s CaV1.1 (n=16) (AU)			mVSDIII $\alpha$ 1s CaV1.1 (n=23) (AU)		
	Media	$\pm$	ES	Media	$\pm$	ES	Media	$\pm$	ES
-60	0,4	$\pm$	0,05	0,69	$\pm$	0,06	0,435	$\pm$	0,042
-50	0,5	$\pm$	0,07	0,74	$\pm$	0,09	0,493	$\pm$	0,055
-40	0,6	$\pm$	0,09	0,98	$\pm$	0,13	0,633	$\pm$	0,096
-30	1,3	$\pm$	0,32	3,39	$\pm$	0,89	2,106	$\pm$	0,678
-20	6,0	$\pm$	1,42	12,67	$\pm$	2,63	7,663	$\pm$	2,460
-10	16,0	$\pm$	3,36	29,72	$\pm$	5,74	16,793	$\pm$	4,034
0	25,9	$\pm$	5,06	45,11	$\pm$	8,78	24,298	$\pm$	5,099
10	32,1	$\pm$	5,87	53,71	$\pm$	10,70	28,658	$\pm$	5,651
20	34,4	$\pm$	6,16	56,42	$\pm$	11,39	29,838	$\pm$	5,799
30	34,9	$\pm$	6,19	56,60	$\pm$	11,46	30,005	$\pm$	5,838
40	34,7	$\pm$	6,22	56,29	$\pm$	11,56	29,811	$\pm$	5,829

Peaks medios de fluorescencia para cada potencial de comando en las distintas condiciones estudiadas (AU).

Para conocer en mayor detalle las características de estos transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$ , la curva de fluorescencia *peak versus* potencial se ajustó a la función de Boltzmann para 2 estados, lo que nos entrega información respecto a la fluorescencia máxima, el potencial al cual se alcanza la mitad de la fluorescencia máxima y la pendiente de la fase de ascenso rápido. Los registros no muestran la existencia de diferencias significativas entre las condiciones, datos que se muestran en la tabla 4 y la figura 10.

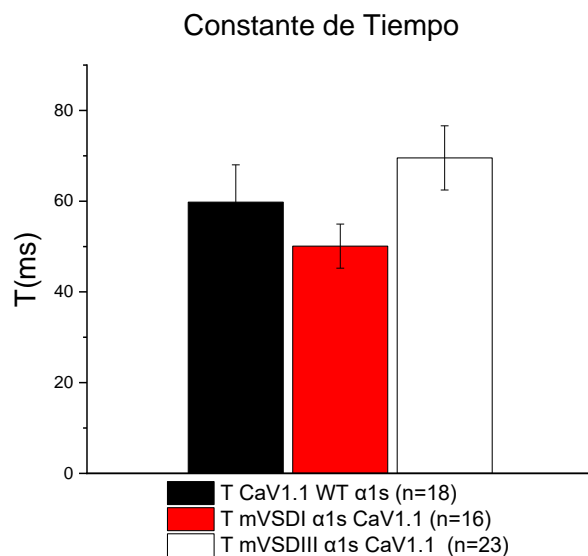


**Figura 10. Parámetros del ajuste de Boltzmann de los registros de liberación transitoria de  $Ca^{2+}$  versus potencial. Medias  $\pm$  ES. A) Fluorescencia máxima (AU) B) Potencial de mitad de fluorescencia máxima (mV). C) Factor de pendiente (mV).**

**Tabla 4. Parámetros de Boltzmann para liberación transitoria de calcio para cada condición estudiada (Medias  $\pm$  ES)**

Parámetro	Control WT $\alpha 1s$ (n=18) (AU)		mVSDI $\alpha 1s$ CaV1.1 (n=16) (AU)		mVSDIII $\alpha 1s$ CaV1.1 (n=23) (AU)	
	Media	ES	Media	ES	Media	ES
$\Delta F/F_0$ (AU)	35,08	$\pm$ 6,22	56,92	$\pm$ 11,49	30,16	$\pm$ 5,87
$V_{0,5}$ (mV)	-8,39	$\pm$ 1,29	-12,21	$\pm$ 1,98	-13,14	$\pm$ 1,61
k (mV)	6,97	$\pm$ 0,30	6,42	$\pm$ 0,31	6,06	$\pm$ 0,23

## Constante de tiempo de los decaimientos de fluorescencia



**Figura 11. Constante de tiempo del decaimiento de fluorescencia para las condiciones estudiadas. Medias  $\pm$  ES.**

Para definir si la modificación de los residuos cargados del segmento S4 de VSDI y VSDIII tiene algún impacto sobre la cinética de las liberaciones transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$  se realizó el análisis de los decaimientos de fluorescencia mediante el ajuste exponencial de la fase de decaimiento de fluorescencia de la liberación evocada por el último pulso de comando, obteniendo así la constante de tiempo del decaimiento, datos presentados en la figura 11. No se observan diferencias significativas entre las condiciones mutadas y el control electroporado WT. Esto refleja que no habría alteración en el proceso de recaptación de  $\text{Ca}^{2+}$  por SERCA.



## Discusión

La contribución de los distintos VSD en la dependencia a voltaje de los procesos gatillados por el Cav1.1, como son la apertura del canal CaV1.1 y la liberación transitoria de Ca<sup>2+</sup> desde retículo está aún en debate. Se han propuesto modelos que buscan esclarecer los mecanismos por los cuales estos procesos se llevan a cabo, siendo la neutralización de cargas mediante mutaciones dirigidas uno de ellos. La literatura actual sugiere que los distintos VSD tienen participación diferenciada en estos procesos, siendo el VSDIII el presunto responsable de la apertura y el VSDI el responsable de la dependencia a voltaje del canal CaV1.1. Pese a ello, aún no existe certeza sobre su función en fibras musculares adultas.

En esta investigación se utilizó la expresión de formas mutadas de Cav1.1 en fibras musculares adultas, con el objetivo de indagar los mecanismos por los cuales CaV1.1 actúa como sensor de voltaje además de ser el responsable de la activación de RYR1. Las mutaciones fueron hechas sobre las cargas positivas de los segmentos S4 de VSDI y VSDIII de la subunidad  $\alpha_1s$  de manera de neutralizarlas, producto del reemplazo de los aminoácidos arginina y lisina por glutaminas. La expresión de estos mutantes se realizó por electroporación de los plasmidios correspondientes. La principal ventaja de este método corresponde a su simplicidad y a su baja invasividad, siendo casi inocuo para los animales. Di Franco, observó que utilizando su protocolo de electroporación no se altera la destinación subcelular de la proteína objetivo ni sus características electrofisiológicas como canal de Ca<sup>2+</sup> o sensor de voltaje, reportando que las corrientes máximas, así como la dependencia de voltaje de las fibras

electroporadas con GFP- $\alpha$ 1s CaV1.1 no difieren de las fibras controles sin electroporar (DiFranco Marino et al., 2011).

Para el análisis de la liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizó Rhod2-AM como sonda marcadora de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la que ha sido utilizada con el mismo objetivo en trabajos previos (Belmonte & Morad, 2008; Del Nido et al., 1998). Rhod2 exhibe un gran aumento en su fluorescencia al unirse a  $\text{Ca}^{2+}$  llegando hasta 100 veces la fluorescencia de su estado libre (Del Nido et al., 1998). Las características propias de esta sonda hacen que sea útil para la detección de incrementos transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en fibras musculares (Vergara et al., 1991). La variante AM tiene la capacidad de permear pasivamente a través de la membrana celular facilitando su utilización en este tipo de experimentos (Takahashi et al., 1999). El uso de este marcador en particular se debe a la necesidad de diferenciar la fluorescencia verde del marcador GFP (asociado a la secuencia modificada de CaV1.1 la que permite confirmar la correcta electroporación y transfección), de la fluorescencia roja propia de la unión del marcador Rhod-2 al ion  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma, permitiendo observar la dinámica de liberación de este catión en respuesta a la estimulación por despolarización de membrana (Belmonte & Morad, 2008).

Los resultados obtenidos confirman la utilidad del método de expresión de proteínas transgénicas como herramienta para el análisis funcional del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  CaV1.1. Observando una correcta transfección, expresión y ubicación subcelular de las proteínas estudiadas, similar a lo planteado en la literatura acerca de la expresión de Cav1.1 transgénico (DiFranco et al., 2009; Fuster et al., 2017; Pantazis et al., 2014).

Las fibras que expresan las variantes mutadas de los VSD mantienen las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y liberaciones transitorias de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L para la condición mVSDIII se manifiestan diferentes a la condición control (electroporado WT), siendo de mayor amplitud en los potenciales donde usualmente se alcanzan las máximas corrientes iónicas en este canal. Esto resulta importante ya que otros autores (Pantazis et al., 2014) proponen que este dominio y el VSDII estarían encargados de la apertura del poro de  $\text{CaV1.1}$ , permitiendo así el paso de esta corriente. Los presentes resultados muestran que el dominio VSDIII podría estar limitando las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  las que ante la neutralización de sus cargas se manifiestan de mayor amplitud. De acuerdo a las características del modelo experimental utilizado, el aumento en la magnitud de la corriente se podría explicar por dos mecanismos: El primer mecanismo probable es debido a un aumento de la cantidad de canales funcionales. En el 2011 Di Franco mostró que la expresión de  $\alpha 1s$   $\text{CaV1.1}$  transgénica en fibras musculares ocurre por un reemplazo de las proteínas nativas, sugiriendo que el mecanismo por el cual se expresa la proteína en fibras transfectadas corresponde a la sobreexpresión del mutante y una regulación a la baja, de la expresión de la variante nativa (DiFranco Marino et al., 2011). Fuster en el 2017 usando el mismo plasmidio de  $\alpha 1s$   $\text{CaV1.1}$  utilizado en la presente investigación, menciona que cerca del 50% de los canales endógenos fueron reemplazados por los mutantes transfectados (Fuster et al., 2017). Esta información muestra que es poco probable que el aumento de la magnitud de la corriente, observado en la condición mVSDIII, se deba a un aumento en número de los canales funcionales. Pese a ello, y para contrastar esa hipótesis, se podría realizar, en futuras investigaciones, el análisis densitométrico de las proteínas mediante *western blot*, comparando proteínas

mutadas con las nativas en un modelo donde se logre la expresión diferenciada de estas, pudiendo ser, por ejemplo, miotubos disgénicos para CaV1.1 que se les induzca la expresión de la variante nativa de  $\alpha_1$ s CaV1.1. *versus* otro grupo donde se induzca la expresión de las variantes mutadas, así entonces podríamos esclarecer si la mutación mVSDIII induce una mayor expresión de canales funcionales pudiendo explicar el aumento de la corriente. El segundo mecanismo probable tiene que ver con el aumento de la conductancia del canal, la que se muestra aumentada significativamente en la condición mVSDIII *versus* control electroporado con la variante WT. Esto podría ser explicado por cambios en el tamaño del poro en el estado activado producto de la neutralización de las cargas del segmento S4. Para canales de K<sup>+</sup> un aumento de 1Å en el tamaño del poro del canal se traduce en una disminución de la energía requerida para poner un ion en su interior de 28 Kcal/mol (Naranjo et al., 2016), disminuyendo su resistencia y con ello aumentando su conductancia. Es probable que la neutralización de cargas lleve a una modificación de la estructura del poro del canal aumentando su tamaño, al perder las interacciones entre residuos cargados que estabilizan su estructura, siendo esta una causa probable del aumento de la conductancia observado en este estudio. La modificación del dominio VSDI no produjo cambios significativos en la amplitud de la corriente ni en los parámetros de Boltzmann, no obstante, las variaciones en la amplitud de corriente y en los parámetros de Boltzmann observados en los resultados muestran que las cargas neutralizadas en mVSDI podrían ser importantes para la función del canal.

En cuanto a la liberación transitoria de Ca<sup>2+</sup> por medio de RYR1 los resultados muestran que no habría una diferencia en el comportamiento de estos transitorios en

ninguna de las condiciones analizadas. Se postula que el segmento de CaV1.1 responsable de la activación de RYR1 sería el loop citosólico entre los VSDII y VSDIII, esto lleva a sospechar que alteraciones en las cargas positivas de VSDIII podrían alterar la movilidad del *loop* modificando su comportamiento habitual y con ello la activación del canal RYR1. Sin embargo, no se evidenciaron cambios ni en la liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  ni en las constantes de tiempo de los decaimientos de fluorescencia. Este decaimiento corresponde a la manifestación del accionar de SERCA, bomba que se encarga de recaptar el  $\text{Ca}^{2+}$  liberado hacia el citoplasma, participando de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático.

Es importante recordar que en cada fibra muscular cohabitan canales mutados con canales nativos distribuyéndose en un 50% para cada tipo aproximadamente (Fuster et al., 2017), por lo que estos procedimientos entregan solo un acercamiento a la descripción del rol de los VSD I y VSD III de  $\alpha 1s$  de CaV1.1 sin ser una respuesta definitiva al respecto. Además, es importante considerar que existen otras proteínas que interactúan con CaV1.1, interacciones que se han descrito como parte funcional del canal y de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L.

Se hace necesaria la realización de nuevas investigaciones con el fin de describir de mejor manera la funcionalidad de estos dominios. Una proyección especialmente interesante sería el estudio de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y la liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  en las siguientes condiciones: Cultivos de miotubos disgénicos para CaV1.1 en los que se induzca la expresión de mutantes con neutralización de cargas para cada uno de los cuatro VSD de manera individual, lo que permitiría conocer en detalle cómo se comporta la corriente y la liberación transitoria en condiciones donde solo se

expresen la variante mutada del canal CaV1.1. Fibras musculares adultas donde se induzca la expresión de mutantes con neutralización de cargas para cada uno de los cuatro VSD de manera individual completando y complementando los resultados de esta investigación y además, resulta especialmente interesante la posibilidad de inducir la expresión en fibras musculares adultas de un mutante donde se neutralicen las cargas de todos sus dominios sensores de voltaje, pudiendo estimar la cantidad de canales nativos que persisten y así contrastar las características de la corriente de Ca<sup>2+</sup> tipo L con aquellas obtenidas de canales con sus VSD modificados. Entregando información valiosa y detallada respecto al funcionamiento de CaV1.1.

Una de las variables confundentes que más llamó la atención durante la realización de esta investigación, es la relativa a la aparición de corrientes positivas al final de los pulsos de comando, fenómeno que condicionó la cantidad de registros analizados, ya que estos no permitían establecer conclusiones respecto a las corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo L, al ser de igual o mayor amplitud a estas. Estas corrientes fueron analizadas y se observó que algunas de ellas presentaban un comportamiento acorde a una conductancia dependiente de potencial con una fase de activación, una corriente *peak* y un potencial de reversión (Anexo 7). Cabe la posibilidad de que sean un hallazgo nuevo en relación a cómo se comporta el canal cuando las cargas de sus VSD han sido neutralizadas, o tal vez, sean corrientes de potasio no controladas por problemas con las soluciones y/o los bloqueadores de canales de potasio utilizados (TEA y 4AP), situación que deberá ser analizada y estudiada a futuro.

## Conclusiones

Los datos aquí presentados entregan la primera evidencia experimental en fibras musculares adultas, a los modelos teóricos existentes respecto al rol de los VSDs en CaV1.1.

Los resultados no muestran evidencia de que la neutralización de cargas del segmento S4 del VSD I tenga participación sobre la magnitud de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , sobre la dependencia de voltaje de su activación ni sobre la liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo. Sin embargo, sugieren que el dominio VSD III tendría un rol regulador de la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$ , y que pese a presentar corrientes de mayor magnitud a la condición control, este dominio no tendría participación en la liberación transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el retículo por lo que el vínculo funcional entre CaV1.1 y RYR1 no sería dependiente de los cambios conformacionales derivados del movimiento del segmento S4 del VSD III.

## Anexos

### Anexo 1: Preparación de fibras musculares adultas aisladas (músculo flexor corto de los dedos de ratón)

Las fibras musculares utilizadas corresponden a fibras aisladas de músculo flexor corto de los dedos de ratón C57, las que son obtenidas por tratamiento enzimático (colagenasa) del músculo completo extraído de cadáver de ratón, este músculo es incubado a 37°C por 60 min en una solución que contiene colagenasa tipo dos, posteriormente este es lavado y almacenado a 4°C por hasta 24 horas antes de ser disociado. En el caso particular de este laboratorio, los músculos son obtenidos el mismo día del experimento y las fibras se aíslan al término del tratamiento con colagenasa mediante la técnica de disociación por aspiración y expulsión a través de pipetas de diámetro decreciente, obteniendo así decenas de fibras aptas para estudio a partir de un único músculo. (Pouvreau et al., 2007)

### Anexo 2: Materiales Electrofisiología

#### A) Setup de Electrofisiología

- Microscopio invertido (Microscopio confocal LSM Pascal 5)
- Micromanipulador MP225 para el control del desplazamiento del microelectrodo
- Amplificador Axopatch 200B
- Microelectrodos de boro-silicato
- Cámara experimental: Placa de cultivo
- Cable tierra



## B) Soluciones

Para la realización del experimento de registro de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , mediante el uso de la técnica del *voltage clamp*, se requiere la preparación y utilización de 2 soluciones que permitirán el desarrollo del experimento. (Jorquera et al., 2013)

- Solución interna: 140 mM de Glutamato de  $\text{K}^+$ , 5 mM  $\text{Na}_2\text{ATP}$ , 5mM fosfocreatina, 5,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM Glucosa, 10 mM HEPES. A un pH de 7,2.
- Solución externa: 140mM Tetraetilamonio, 2,5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM HEPES, 1-2  $\mu\text{M}$  Tetrodotoxina, 1 mM 4-aminopiridina. A un pH de 7,2.

### Anexo 3: Protocolo de análisis de datos de corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ de tipo L

Los datos de potencial de membrana y corrientes fueron grabados a temperatura ambiente utilizando el modelo de patch-clamp de célula completa con aislación por grasa de silicona. Los datos obtenidos se analizan en el software clampfit 11 y Origin 2018, realizando los siguientes ajustes. Se normalizará los valores de intensidad de corriente de cada protocolo con la resta a todo el registro del promedio de intensidades de los primeros 20.000 puntos del registro (correspondiente al segmento previo al pre pulso hiperpolarizante). A continuación, se realizará la sustracción de la corriente capacitiva no lineal, la que corresponde al movimiento de carga intramembrana producido por el prepulso hiperpolarizante, la que se calcula mediante el método descrito por Szentesi (Szentesi et al., 1997). Esta corriente será escalada a cada pulso

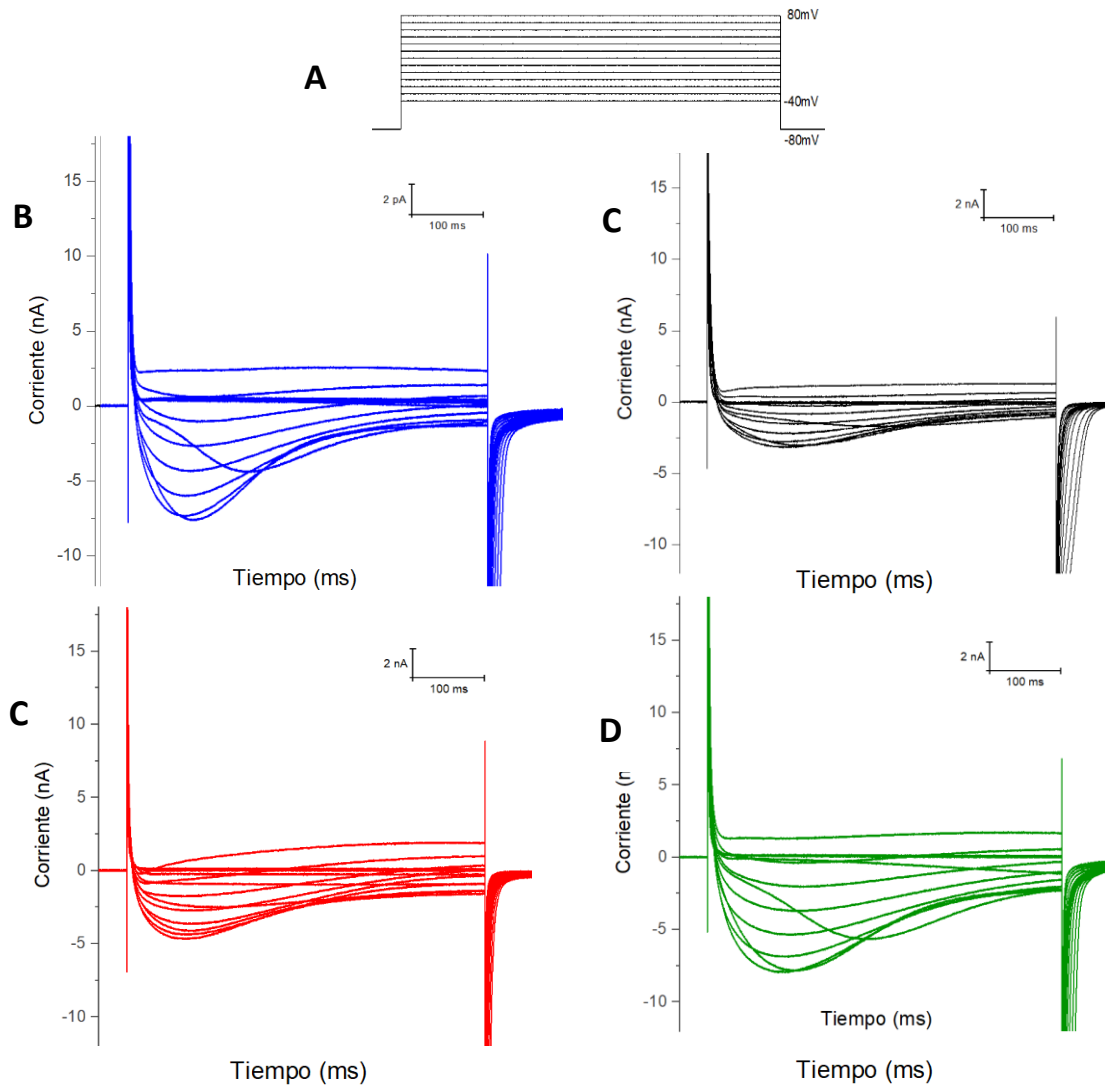
de comando del experimento y se le restará de igual manera a los datos de intensidad de corriente de cada pulso para obtener la corriente máxima. Luego se normalizarán las corrientes de acuerdo a la capacitancia que presenta el extremo libre de cada célula (el segmento que se encuentra fuera de la silicona) para poder realizar las comparaciones. La capacitancia será igual al valor de la integral del segmento inicial de los datos generados durante la fase inicial o final del pre pulso hiperpolarizante donde se observa el comportamiento capacitivo de la membrana. Una vez se cuenta con los datos de corriente máxima del pulso de comando estos serán normalizados según la capacitancia, obteniendo datos finales en pA/pF (pico amperes dividido por pico faradios). Los que serán utilizados para la confección de una curva Intensidad *versus* diferencia de potencial o curva I/V la que será sometida al ajuste de Boltzmann con el que se observará la dependencia de voltaje a través de sus distintos parámetros. Permitiendo así comparar 2 células independiente del tamaño/área fuera del sello de silicona.

#### Anexo 4: Protocolo de análisis de liberación transitoria de Ca<sup>2+</sup>

Los datos de fluorescencia obtenidos del registro lineal de 1.54 ms sobre la superficie libre de la fibra muscular se almacenan en formato LSM con el software controlador del microscopio confocal. Estos datos son luego analizados mediante el uso del software de análisis de imágenes ImageJ, realizando una conversión de los datos brutos de fluorescencia a una gráfica de fluorescencia *versus* tiempo, la que se exporta a Origin 2018. Donde se realiza un ajuste de los datos para obtener un registro de fluorescencia total *versus* fluorescencia basal (F/F<sub>0</sub>) *versus* tiempo, registro del cual

se obtiene el peak de fluorescencia para cada pulso despolarizante, datos que serán graficados contra el potencial para obtener así la grafica  $\Delta F/F_0$  versus potencial. Estos datos serán ajustados mediante la ecuación de Boltzmann para 2 estados, lo que permite describir el comportamiento de la liberación transitoria de  $Ca^{2+}$  en las distintas condiciones y así compararlas en las distintas fibras musculares. Como análisis adicional se realiza el ajuste exponencial a la fase de decaimiento de fluorescencia durante el último pulso de comando. Esto con el fin de describir posibles alteraciones en la recaptación de  $Ca^{2+}$  producto de las mutaciones efectuadas en CaV1.1.

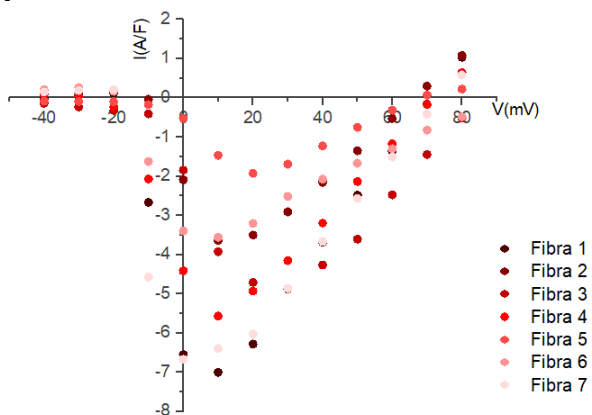
## Anexo 5: Registros representativos corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ tipo L



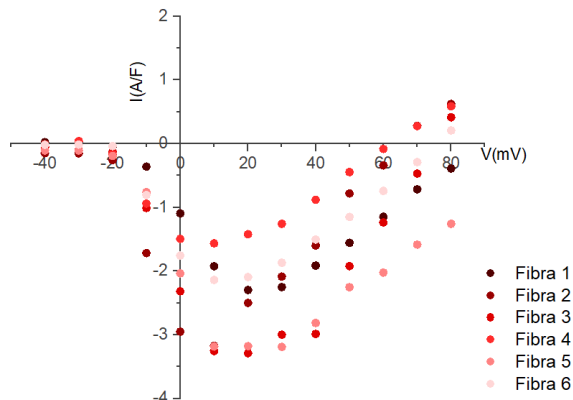
**Corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  Tipo L, representativas de las distintas condiciones analizadas (fibra única).** En la figura se muestran corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L superpuestas, cada una representa la corriente evocada por los distintos pulsos de comando (A) (-40 a +80mV). B: se observa el registro de una fibra control electroporada con la variante WT. C: registro corresponde a una fibra control sin electroporar. D: corresponde al registro en la condición mutada para el dominio sensor de voltage VSDI de la subunidad  $\alpha 1s$ . E: es el registro de la condición mutante para el dominio sensor de voltaje VSDIII de la subunidad  $\alpha 1s$ . Se aprecia en B y C la aparición de una corriente de entrada tardía, característica de este tipo de experimento.

## Anexo 6: Curvas IV de cada fibra estudiada agrupada por condición.

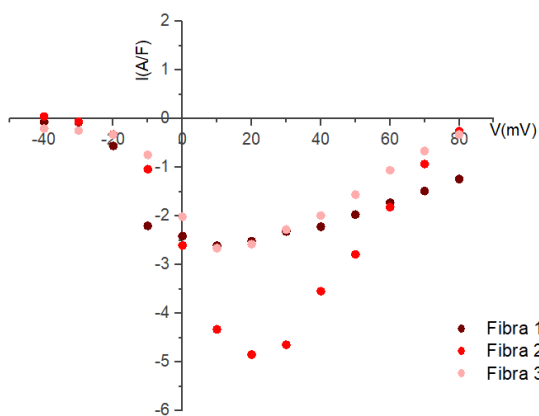
**A** Curvas IV Control sin electroporar



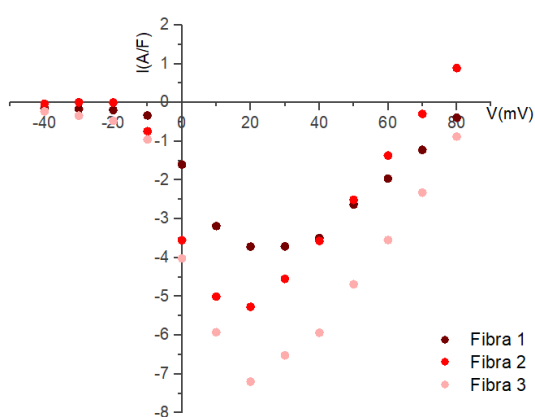
**B** Curvas IV Control electroporado WT  $\alpha 1s$  CaV1.1



**C** Curvas IV mVSDI  $\alpha 1s$  CaV1.1

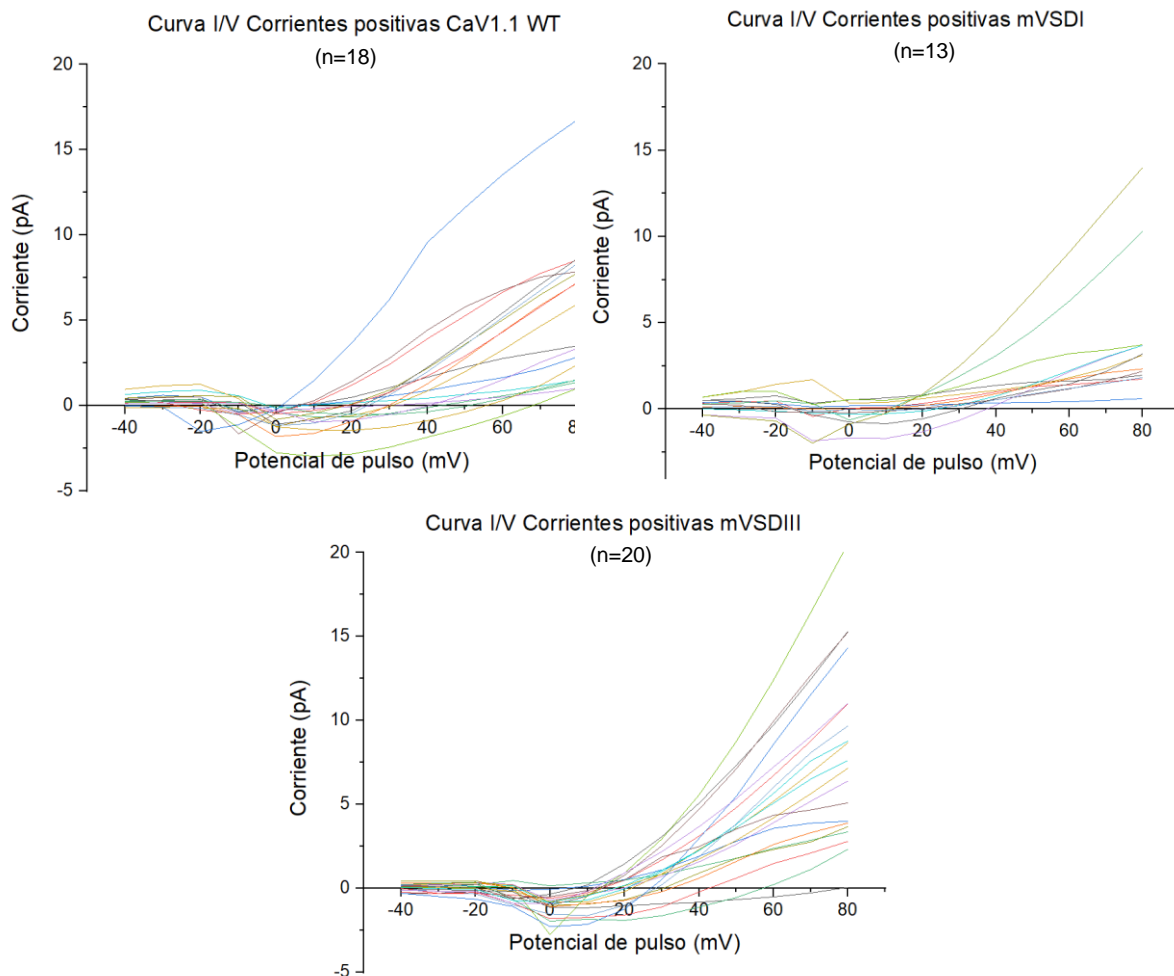


**D** Curvas IV mVSDIII  $\alpha 1s$  CaV1.1



**Curvas IV para cada condición:** En la figura se muestran las curvas IV agrupadas por condición. A: curvas IV para control sin electroporar, B: curvas IV para control electroporado WT  $\alpha 1s$  CaV1.1, C: curvas IV para condición mVSDI  $\alpha 1s$  CaV1.1 y D: curvas IV para condición mVSDIII  $\alpha 1s$  CaV1.1.

## Anexo 7: Análisis de las corrientes positivas encontradas al final de los pulsos de comando, Curvas IV.



**Corrientes positivas observadas al final de los pulsos de comando.** Se observa que la mayor parte de los registros en las tres condiciones (Control WT, mVSDI y mVSDIII), presentan estas corrientes positivas. Llama la atención el comportamiento de estas, las que en algunos casos se asemejan a corrientes dependientes de potencial, con una fase de activación, una conductancia máxima y un potencial de reversión.

## Bibliografía

- Araya, R., Liberona, J. L., Cárdenas, J. C., Riveros, N., Estrada, M., Powell, J. A., Carrasco, M. A., & Jaimovich, E. (2003). Dihydropyridine Receptors as Voltage Sensors for a Depolarization-evoked, IP3R-mediated, Slow Calcium Signal in Skeletal Muscle Cells. *Journal of General Physiology*, 121(1), 3-16. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028671>
- Belmonte, S., & Morad, M. (2008). 'Pressure–flow'-triggered intracellular Ca<sup>2+</sup> transients in rat cardiac myocytes: Possible mechanisms and role of mitochondria. *The Journal of Physiology*, 586(5), 1379-1397. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.149294>
- Campiglio, M., & Flucher, B. E. (2017). STAC3 stably interacts through its C1 domain with CaV1.1 in skeletal muscle triads. *Scientific Reports*, 7, 41003. <https://doi.org/10.1038/srep41003>
- Campiglio Marta, & Flucher Bernhard E. (2015). The Role of Auxiliary Subunits for the Functional Diversity of Voltage-Gated Calcium Channels. *Journal of Cellular Physiology*, 230(9), 2019-2031. <https://doi.org/10.1002/jcp.24998>
- Casas, M., Figueroa, R., Jorquera, G., Escobar, M., Molgó, J., & Jaimovich, E. (2010). IP3 -dependent, post-tetanic calcium transients induced by electrostimulation of adult skeletal muscle fibers. *The Journal of General Physiology*, 136(4), 455-467. <https://doi.org/10.1085/jgp.200910397>
- Catterall, W. A. (2000). Structure and Regulation of Voltage-Gated Ca<sup>2+</sup> Channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), 521-555. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.521>

- Catterall, W. A. (2010). Ion Channel Voltage Sensors: Structure, Function, and Pathophysiology. *Neuron*, 67(6), 915-928. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.021>
- Collet, C., Csernoch, L., & Jacquemond, V. (2003). Intramembrane Charge Movement and L-Type Calcium Current in Skeletal Muscle Fibers Isolated from Control and mdx Mice. *Biophysical Journal*, 84(1), 251-265. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74846-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74846-2)
- Collet, Claude, Pouvreau, S., Csernoch, L., Allard, B., & Jacquemond, V. (2004). Calcium Signaling in Isolated Skeletal Muscle Fibers Investigated Under «Silicone Voltage-Clamp» Conditions. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 40(2), 225-236. <https://doi.org/10.1385/CBB:40:2:225>
- Del Nido, P. J., Glynn, P., Buenaventura, P., Salama, G., & Koretsky, A. P. (1998). Fluorescence measurement of calcium transients in perfused rabbit heart using rhod 2. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 274(2), H728-H741. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.274.2.H728>
- DiFranco, M., Capote, J., & Vergara, J. L. (2005). Optical Imaging and Functional Characterization of the Transverse Tubular System of Mammalian Muscle Fibers using the Potentiometric Indicator di-8-ANEPPS. *The Journal of membrane biology*, 208, 141-153. <https://doi.org/10.1007/s00232-005-0825-9>
- DiFranco, M., Quinonez, M., Capote, J., & Vergara, J. (2009). DNA Transfection of Mammalian Skeletal Muscles using In Vivo Electroporation. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 32, e1520-e1520. <https://doi.org/10.3791/1520>
- DiFranco, M., Tran, P., Quiñonez, M., & Vergara, J. L. (2011). Functional expression of transgenic  $\alpha$ 1sDHPR channels in adult mammalian skeletal muscle fibres:



- Transgenic calcium currents in skeletal muscle. *The Journal of Physiology*, 589(6), 1421-1442. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.202804>
- DiFranco Marino, Tran Philip, Quiñonez Marbella, & Vergara Julio L. (2011). Functional expression of transgenic  $\alpha 1$ sDHPR channels in adult mammalian skeletal muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 589(6), 1421-1442. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.202804>
- Efremov, R. G., Leitner, A., Aebersold, R., & Raunser, S. (2015). Architecture and conformational switch mechanism of the ryanodine receptor. *Nature*, 517(7532), 39-43. <https://doi.org/10.1038/nature13916>
- FELIX, R. (2005). Molecular Regulation of Voltage-Gated  $Ca^{2+}$  Channels. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 25(2), 57-71. <https://doi.org/10.1081/RRS-200068102>
- Fill, M., & Copello, J. A. (2002). Ryanodine Receptor Calcium Release Channels. *Physiological Reviews*, 82(4), 893-922. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2002>
- Flucher, B. E., & Tuluc, P. (2017). How and why are calcium currents curtailed in the skeletal muscle voltage-gated calcium channels? *The Journal of Physiology*, 595(5), 1451-1463. <https://doi.org/10.1113/JP273423>
- Fuster, C., Perrot, J., Berthier, C., Jacquemond, V., & Allard, B. (2017). Elevated resting  $H^{+}$  current in the R1239H type 1 hypokalaemic periodic paralysis mutated  $Ca^{2+}$  channel. *The Journal of Physiology*, 595(20), 6417-6428. <https://doi.org/10.1113/JP274638>

- García, J., Nakai, J., Imoto, K., & Beam, K. G. (1997). Role of S4 segments and the leucine heptad motif in the activation of an L-type calcium channel. *Biophysical Journal*, 72(6), 2515-2523.
- Groome, J. R., & Bayless-Edwards, L. (2020). Roles for Countercharge in the Voltage Sensor Domain of Ion Channels. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00160>
- Held, K., Voets, T., & Vriens, J. (2016). Signature and Pathophysiology of Non-canonical Pores in Voltage-Dependent Cation Channels. En *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology Vol. 170* (pp. 67-99). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/112\\_2015\\_5003](https://doi.org/10.1007/112_2015_5003)
- Hong, T., & Shaw, R. M. (2017). Cardiac T-Tubule Microanatomy and Function. *Physiological Reviews*, 97(1), 227-252. <https://doi.org/10.1152/physrev.00037.2015>
- Jorquera, G., Altamirano, F., Contreras-Ferrat, A., Almarza, G., Buvinic, S., Jacquemond, V., Jaimovich, E., & Casas, M. (2013). Cav1.1 controls frequency-dependent events regulating adult skeletal muscle plasticity. *Journal of Cell Science*, 126(5), 1189. <https://doi.org/10.1242/jcs.116855>
- Kugler, G., Weiss, R. G., Flucher, B. E., & Grabner, M. (2004). Structural Requirements of the Dihydropyridine Receptor  $\alpha_{1S}$  II-III Loop for Skeletal-type Excitation-Contraction Coupling. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4721-4728. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307538200>
- Kutchukian, C., Szentesi, P., Allard, B., Trochet, D., Beuvin, M., Berthier, C., Tourneur, Y., Guicheney, P., Csernoch, L., Bitoun, M., & Jacquemond, V. (2017). Impaired excitation-contraction coupling in muscle fibres from the dynamin2R465W

- mouse model of centronuclear myopathy. *The Journal of Physiology*, 595(24), 7369-7382. <https://doi.org/10.1113/JP274990>
- Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D., & Hamilton, S. L. (2010). Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003996>
- Monteleone, S., Lieb, A., Pinggera, A., Negro, G., Fuchs, J. E., Hofer, F., Striessnig, J., Tuluc, P., & Liedl, K. R. (2017). Mechanisms Responsible for  $\omega$ -Pore Currents in Cav Calcium Channel Voltage-Sensing Domains. *Biophysical Journal*, 113(7), 1485-1495. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.08.010>
- Naranjo, D., Moldenhauer, H., Pincuntureo, M., & Díaz-Franulic, I. (2016). Pore size matters for potassium channel conductance. *The Journal of General Physiology*, 148(4), 277-291. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611625>
- Palovcak, E., Delemotte, L., Klein, M. L., & Carnevale, V. (2014). Evolutionary imprint of activation: The design principles of VSDs. *The Journal of General Physiology*, 143(2), 145-156. <https://doi.org/10.1085/jgp.201311103>
- Pantazis, A., Savalli, N., Sigg, D., Neely, A., & Olcese, R. (2014). Functional heterogeneity of the four voltage sensors of a human L-type calcium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(51), 18381-18386. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411127112>
- Pouvreau, S., Collet, C., Allard, B., & Jacquemond, V. (2007). Whole-Cell Voltage Clamp on Skeletal Muscle Fibers With the Silicone-Clamp Technique. En *Patch-Clamp Methods and Protocols* (pp. 185-194). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-529-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-529-9_12)

- Reuter, H. (1983). Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature*, 301(5901), 569-574. <https://doi.org/10.1038/301569a0>
- Rios, E., & Brum, G. (1987). Involvement of dihydropyridine receptors in excitation–contraction coupling in skeletal muscle. *Nature*, 325(6106), 717-720. <https://doi.org/10.1038/325717a0>
- Szentesi, P., Jacquemond, V., Kovács, L., & Csernoch, L. (1997). Intramembrane charge movement and sarcoplasmic calcium release in enzymatically isolated mammalian skeletal muscle fibres. *The Journal of Physiology*, 505(2), 371-384. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.371bb.x>
- Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J. D., & Herman, B. (1999). Measurement of Intracellular Calcium. *Physiological Reviews*, 79(4), 1089-1125. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1089>
- Tuluc, P., Benedetti, B., Coste de Bagneaux, P., Grabner, M., & Flucher, B. E. (2016). Two distinct voltage-sensing domains control voltage sensitivity and kinetics of current activation in CaV1.1 calcium channels. *The Journal of General Physiology*, 147(6), 437-449. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611568>
- Tuluc, P., Molenda, N., Schlick, B., Obermair, G. J., Flucher, B. E., & Jurkat-Rott, K. (2009). A CaV1.1 Ca<sup>2+</sup> Channel Splice Variant with High Conductance and Voltage-Sensitivity Alters EC Coupling in Developing Skeletal Muscle. *Biophysical Journal*, 96(1), 35-44. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.09.027>
- Vergara, J., DiFranco, M., Compagnon, D., & Suarez-Isla, B. A. (1991). Imaging of calcium transients in skeletal muscle fibers. *Biophysical Journal*, 59(1), 12-24.
- Weiss, N., Legrand, C., Pouvreau, S., Bichraoui, H., Allard, B., Zamponi, G. W., De Waard, M., & Jacquemond, V. (2010). In vivo expression of G-protein  $\beta 1\gamma 2$

dimer in adult mouse skeletal muscle alters L-type calcium current and excitation–contraction coupling. *The Journal of Physiology*, 588(Pt 15), 2945-2960. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.191593>