

UCH-FC
DOC. B.M.C.N
A 853
C. 1

**Regulación del tráfico e incorporación a la membrana
plasmática de la subunidad $Ca_v1.2$ del canal de calcio
dependiente de voltaje tipo L.**

Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular Y
Neurociencias

Facultad De Ciencias

Por

Rodrigo Marco Astete Altamirano

Octubre 2009

Director de Tesis Dr: Alan Neely Delgueil



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

RODRIGO M. ASTETE ALTAMIRANO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 20 de Agosto de 2009.

Director de Tesis:
Dr Alan Neely


.....

Co-Director de Tesis
Dra. Patricia Hidalgo

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Cecilia Vergara

C. Vergara
.....

Dra. Cecilia Hidalgo

C. Hidalgo
.....

Dr. Ariel Orellana

.....

Dr. David Naranjo

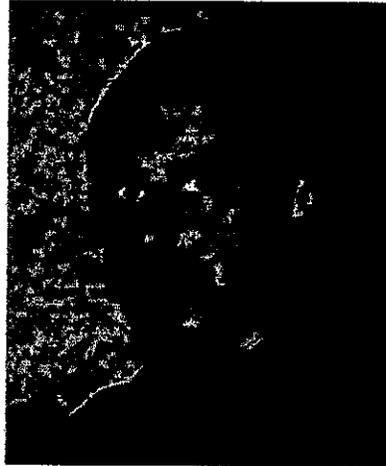
D. Naranjo
.....





El presente trabajo es el resultado de un proceso de aprendizaje y de una experiencia que me ha permitido conocer y comprender mejor a mi familia y a mi madre. Este es un trabajo que he realizado con mucho amor y dedicación, y que espero que sea de utilidad para todos los que lo lean. Me gustaría agradecer a mi familia y a mi madre por su apoyo y comprensión durante todo este proceso. También quiero agradecer a mi profesor por su guía y orientación. Este trabajo es un homenaje a mi familia y a mi madre, y a todos los que me han ayudado y apoyado en mi vida.

Dedicado a mi familia y a mi madre.



Comencé mis estudios de pregrado el año 1994 en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Ciencias de la Educación (UPLACED) en Valparaíso en la carrera de Pedagogía en Biología cambiándome al año siguiente a la carrera de Bioquímica en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso entre los años 1995 hasta el 2000, obteniendo la Licenciatura en Ciencias el año 1999 como mejor egresado y el título profesional Bioquímico el año 2000 defendiendo la tesis "*Hipoxia hipobárica aguda produce oxidación de membranas de eritrocitos humanos*" desarrollada en el laboratorio de Fisiología de Altura con la Dra. Gloria Celedón en la Universidad de Valparaíso. El año 2001 comencé una Maestría en Ciencias con mención en Neurociencias de la Universidad de Valparaíso desarrollando mi tesis de grado de Magíster con el Dr. Esteban Aliaga en "*Un modelo de degeneración retinal agudo inducida por luz y regulación de bFGF en la retina de ratas*" Luego, ingresé al Doctorado en Ciencia con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias en la Universidad de Chile, desarrollando mi tesis con el Dr. Alan Neely en la Universidad de Valparaíso.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco profundamente la dirección y apoyo del Dr. Alan Neely y de los oportunos consejos de la Dra. Patricia Hidalgo, sin los cuales no habría podido realizarse esta tesis. Agradezco también los sabios consejos del Dr. David Naranjo, la Dra. Ana María Cárdenas y del Dr. Agustín Martínez. Agradezco también la formación y la paciencia de la comisión y el apoyo de mis compañeros de laboratorio: Vivian, Silvina, Tania, Katherine, Christian, Giovanni, Vicky y Gustavo.



INDICE DE MATERIAS



INDICE DE MATERIAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUCCIÓN.....	1
1. <i>Biogénesis de canales de iones.....</i>	2
2. <i>Regulación de la localización de canales de iones en la superficie celular por proteínas accesorias.....</i>	6
3. <i>Estructura y función de canales de calcio dependiente de voltaje.</i>	9
4. <i>Localización y tráfico de canales de calcio dependientes de voltaje.</i>	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
1. <i>Biología molecular.</i>	21
1.1. <i>Cultivo de bacterias y obtención de células competentes.....</i>	21
1.2. <i>Transformación de células competentes con ADN plasmidial.</i>	22
1.3. <i>Obtención y purificación de plásmidos de DNA.</i>	23
1.4 <i>Transcripción in vitro.....</i>	23
1.5. <i>Construcción de mutantes, quimeras y mutagénesis sitio dirigida.</i>	25

2.	<i>Preparación de ovocitos de Xenopus laevis.</i>	28
3.	<i>Protocolo Cut Open Voltage-Clamp (COVC).</i>	29
4.	<i>Separación de membranas totales desde ovocitos.</i>	33
5.	<i>Fraccionamiento subcelular.</i>	33
6.	<i>Medición quimioluminiscente en ovocitos únicos.</i>	36
7.	<i>Análisis estadístico.</i>	37
	RESULTADOS	40
1.	<i>Regulación de la inserción de $Ca_v\alpha_1$ por la subunidad β.</i>	40
	1.1. <i>Efectos de la subunidad β del canal de calcio en la inserción en MP de $Ca_v1.2$.</i>	40
	1.2. <i>Determinación del efecto de $Ca_v\beta_{2a}$ en la localización subcelular de $Ca_v1.2HA$ en ovocitos de Xenopus.</i>	47
	1.3. <i>Destrucción del sitio principal de unión de la subunidad β no impide la expresión de canales funcionales.</i>	52
2.	<i>Regulación en la inserción en MP de $Ca_v\alpha_1$ por el amino terminal.</i>	54
	2.1. <i>Determinación del curso temporal en la inserción en MP del mutante $\Delta N60Ca_v1.2$.</i>	55
	2.2. <i>Efectos de la destrucción de la interacción $\alpha_1-\beta$ a través del AID en la inserción en la MP del mutante $\Delta N60Ca_v1.2$.</i>	58
	2.3. <i>La eliminación de gran parte del amino terminal de $Ca_v1.2$, restaura la dependencia de $Ca_v\beta$ para la expresión de canales funcionales en la membrana plasmática.</i>	61
3.	<i>Capacidad reguladora del lazo I-II.</i>	65
	3.1. <i>Medición de densidades de corriente de la quimera del canal de potasio tipo Shaker con el lazo I-II de $Ca_v1.2$.</i>	66
	3.2. <i>Efectos de la subunidad $Ca_v\beta_{2a}$ sobre canales no funcionalmente relacionados expresados en ovocitos de Xenopus.</i>	69
	DISCUSIÓN.	72
1.	<i>Determinantes de la expresión y tráfico hacia la superficie de la subunidad $Ca_v\alpha_{1C}$ de los canales de calcio dependientes de voltaje.</i>	72
2.	<i>Papel del amino terminal en la función y tráfico del canal de calcio tipo L.</i>	76



3.	<i>Diferencias entre la medición electrofisiológica y quimioluminiscente.</i>	79
4.	<i>Ca_vβ participa en el tráfico de Ca_v1.2.</i>	80
5.	<i>Ca_vβ participa en la endocitosis de proteínas de membrana.</i>	81
	CONCLUSIONES.	84
	BIBLIOGRAFÍA.	85



LISTA DE FIGURAS



Figura 1. Esquema del tráfico de proteínas hacia la membrana plasmática.....	5
Figura 2. Esquema de los canales de calcio dependientes de voltaje.....	11
Figura 3. Esquema del canal de calcio dependiente de voltaje $Ca_v1.2$	27
Figura 4. Diagrama esquemático de la cámara de registro y la electrónica en COVC y medición de Q_{ON}	32
Figura 5. Cámara para la detección de quimioluminiscencia en ovocitos únicos.	38
Figura 6. Controles de detección de canales en la superficie de ovocitos.....	39
Figura 7. Correlación entre los registros de Q_{ON} en COVC y medición de canales en superficie con quimioluminiscencia.....	44
Figura 8. $Ca_v\beta$ aumenta la inserción de canales en la MP.....	45
Figura 9. Co-inyección de $Ca_v\beta_{2a}$ no aumenta la expresión de proteína $Ca_v1.2HA$	46
Figura 10. Efecto de $Ca_v\beta_{2a}$ en la distribución de $Ca_v1.2HA$ en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> 12, 48 y 96 h post-inyección.	50
Figura 11. $Ca_v\beta_{2a}$ desplaza a $Ca_v1.2HA$ hacia la MP.	51
Figura 12. Deleción del motivo AID suprime el efecto de $Ca_v\beta$ en la aparición de canales funcionales en la MP.	53
Figura 13. Eliminación de los primeros 60 aminoácidos del amino terminal de $Ca_v1.2$ no provoca cambios en la incorporación en la MP en presencia de $Ca_v\beta$	57
Figura 14. Eliminación de residuo crítico en la interacción con $Ca_v\beta$ no interfiere con la incorporación de canales funcionales en la MP.....	60
Figura 15. Eliminación de los primeros 132 aminoácidos del amino terminal de $Ca_v1.2$ vuelve al canal completamente dependiente de $Ca_v\beta_{2a}$ para su expresión en MP.....	63
Figura 16. Eliminación de la interacción α_1 - β revierte la dependencia absoluta en la incorporación de $\Delta N132Ca_v1.2$ en la MP.....	64
Figura 17. Curva de valoración de $Ca_v\beta_{2a}$ sobre Shaker lazo I-II _C	68
Figura 18. Incorporación del lazo I-II de $Ca_v1.2$ en <i>Shaker</i> impide su incorporación en la MP.....	70
Figura 19. La subunidad β disminuye la densidad de corriente de ovocitos expresando <i>Shaker</i>	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Efectos de las deleciones del amino terminal y de los mutantes en el motivo AID sobre las corrientes de compuertas.....	59
--	----



LISTA DE ABREVIATURAS



AID	Motivo de unión de la subunidad alfa
CCDV	Canales de calcio dependientes de voltaje
COVC	Cut Open Voltage-Clamp
cRNA	Ácido ribonucleico codificante
CT	Carboxilo terminal
DNA	Ácido desoxyribonucleico
GK	Dominio Guanilato Kinasa
MP	Membrana plasmática
NT	Amino terminal
Q_{ON}	Corriente de compuerta
RE	Retículo endoplasmático
SH3	Dominio de homología a Src tipo 3
URL	Unidad Relativa de Luminiscencia

RESUMEN

Los canales de iones regulan la excitabilidad y homeostasis de iones de las células y su abundancia y localización en zonas especializadas de la membrana está estrechamente regulada. Esta tesis investiga la regulación de la incorporación de la subunidad formadora del poro de un subtipo de los canales de calcio dependientes de voltaje ($Ca_v1.2$) a la membrana plasmática (MP) con la subunidad accesoria $Ca_v\beta$ utilizando ovocitos de *Xenopus laevis* como sistema de expresión heteróloga. Combinando métodos bioquímicos y electrofisiológicos y desarrollando un nuevo método de quimioluminiscencia para ovocito único, se establece que la incorporación de $Ca_v1.2$ a la MP no depende exclusivamente de la co-expresión de $Ca_v\beta$, sino que depende de determinantes del amino terminal en $Ca_v1.2$. Al eliminar los primeros 60 aminoácidos de $Ca_v1.2$, la incorporación de canales funcionales se vuelve independiente de $Ca_v\beta_{2a}$ aún después de eliminar el sitio de unión α_1 - β ubicado en el lazo I-II (AID). $Ca_v\beta_{2a}$ vuelve a aumentar la expresión de canales funcionales cuando son 132 los aminoácidos eliminados del amino terminal. La destrucción del sitio AID en este mutante anula su dependencia de $Ca_v\beta_{2a}$. Por otra parte, la regulación de la expresión por $Ca_v\beta_{2a}$ puede ser transferida a otro canal, aunque solo de manera parcial, incorporando el lazo I-II a su carboxilo terminal. De los resultados de esta tesis, concluimos que al menos tres elementos confluyen en la regulación del tráfico y la expresión en superficie de $Ca_v1.2$, estos son: el amino terminal y el lazo I-II de $Ca_v1.2$, y $Ca_v\beta$.

ABSTRACT

Ion channels regulate excitability and ion homeostasis of cells and their localization in specialized membrane areas and abundance are tightly controlled. This dissertation investigates the regulation by the $\text{Ca}_v\beta$ subunit of the incorporation to the plasma membrane (PM) of the pore-forming subunit of voltage-dependent calcium channels (subtype $\text{Ca}_v1.2$) of using of *Xenopus laevis* oocytes as a heterologous expression system. Combining electrophysiological and biochemical techniques and developing a new single oocyte chemiluminescence method, this work shows that incorporation of $\text{Ca}_v1.2$ to the MP does not depend exclusively on the co-expression of $\text{Ca}_v\beta$ but additional determinants encoded in $\text{Ca}_v1.2$ amino terminus come into play. Deleting the first 60 amino acids of $\text{Ca}_v1.2$, renders the incorporation of functional channels independent of $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ even after deleting the α_1 - β binding site located in the loop I-II (AID). $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ again increase the expression of channels when the first 132 amino acids of $\text{Ca}_v1.2$ are removed. Destruction of the AID site in this mutant abolishes its dependence on $\text{Ca}_v\beta_{2a}$. Moreover, the regulation of expression by $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ can be transferred to another channel, although only partially, by adding loop I-II at its carboxy-terminus. From these results, we conclude that at least three elements converge in the regulation of trafficking and surface expression of $\text{Ca}_v1.2$, these are the amino terminal the loop I-II of $\text{Ca}_v1.2$ and $\text{Ca}_v\beta$.

INTRODUCCIÓN

La biogénesis y el tráfico de proteínas es un tema que se aborda de manera frecuente en el estudio de los canales de iones, debido a que estas proteínas integrales de membrana regulan la excitabilidad y homeostasis de iones tanto en células excitables como en no excitables. Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) no son la excepción. La regulación funcional de estas proteínas determina la función celular, siendo un factor importante la regulación en la expresión y el número de canales funcionales en la membrana plasmática (MP). En esta tesis abordamos la regulación en la incorporación del canal de calcio tipo L o $Ca_v1.2$, un subtipo de CCDV que posee un papel importante a nivel neuronal en la liberación de neurotransmisores, como también en la contractilidad del músculo cardíaco, y en el músculo liso.

Comenzaremos esta introducción con una breve revisión de la biogénesis de los canales de iones en general para finalmente abordar aspectos funcionales y estructurales en el tráfico de CCDV.

1. Biogénesis de canales de iones.

La inserción y permanencia de canales de iones en la membrana plasmática depende de su salida del retículo endoplasmático (RE), de su destino apropiado (targeting) y de la tasa de recambio en la membrana plasmática (MP). La salida de las proteínas desde el RE funciona como un punto de "control de calidad" donde se verifica el correcto plegamiento y ensamblaje de las subunidades respectivas. En general, proteínas con dominios transmembrana (TM) deben pasar por múltiples puntos de control antes de alcanzar la membrana plasmática (MP). En términos prácticos, se distingue tanto un control de calidad primario, que reconoce el plegamiento nativo de las proteínas, de uno secundario, más específico para cada proteína y se relaciona con una salida selectiva del RE (Ellgaard y Helenius, 2003). Estos mecanismos de control secundario operan a través de señales de retención o bien de recuperación hacia el RE (retrógradas) que estarían ocluidas cuando la proteína alcanza su plegamiento nativo o cuando se ensamblan con otras subunidades. Una falla en este proceso expone estas señales que son reconocidas por proteínas chaperonas en el RE (BiP, calnexina, calreticulina, PDI, etc.) o por las proteínas formadoras de la estructura del coatómero COPI o el receptor de KDEL en el caso de las señales de recuperación (Stornaiuolo y col., 2003; Ellgaard y Helenius, 2003). También existen señales específicas o anterógradas que promueven la salida de proteínas de membrana como las formadoras de canales de iones desde el RE pero que no parecen estar relacionadas con el

plegamiento o ensamblaje de subunidades (Ma y col., 2001). Los estados de fosforilación de la proteína pueden también ser determinantes en la salida del RE por retención retrógrada (O'Kelly y col., 2002; Scott y col., 2001). Los canales de iones, pueden tener requerimientos adicionales como el asociarse con proteínas de anclaje o adaptadoras para asegurar su llegada a la membrana plasmática. Este es el caso de la proteína adaptadora AKAP79 la cual facilita el tráfico de Cav1.2 (Plata y col., 2004; O'Kelly y col., 2002). Estos puntos de control suelen tener un rol relevante para garantizar la composición y estequiometría de subunidades de los canales que llegan a la superficie de la célula. El ejemplo mejor conocido es el del canal de potasio sensible a ATP (Kir6.1 y 6.2), que forma un octámero de estequiometría 4:4 con el receptor de sulfonil urea (SUR1/2A/2B). Si el canal no oligomeriza con el receptor las subunidades dejan expuesta una señal de retención y nunca abandonan el RE (Zerangue y col., 1999). Estas señales han sido identificadas como motivos de retención frecuentes en proteínas receptores y son de naturaleza básica; por ejemplo, dos residuos de lisinas (KKXX), o residuos de arginina (RXR) como es el caso del ejemplo anterior, y en los receptores NMDA, GABA y canales hERG. En estos casos la heteromultimerización de subunidades enmascara las señales de retención/recuperación expuestas en las formas monoméricas (Margeta-Mitrovic y col., 2000; Standley y col., 2000; Phartiyal y col., 2008). También se han identificado secuencias del tipo "ácidas" en algunos canales de iones; por ejemplo el motivo con residuos de aspartato (EDE) en el canal de K⁺ TASK-3 (Zuzarte y col., 2007). Motivos sin carga también pueden constituir

señales de retención/recuperación, como el motivo CVLF en el carboxilo terminal de un variante de corte-empalme del canal de K^+ hSlo (Zarei y col., 2004). Otros casos de motivos sin carga han sido identificados en el amino terminal del receptor purinérgico P2X6. Esta señal convierte a P2X6 en la única isoforma incapaz de formar receptores homoméricos funcionales ya que quedan retenidos en el RE (Ormond y col., 2006). Las señales de retención no están confinadas al amino o carboxilo terminal de las proteínas de membrana. Elementos en el poro del canal de potasio del tipo Kv1 sensibles a α -dendrotoxina también son capaces de retener esta proteína en el RE (Manganas y col., 2001). Otro ejemplo de esto se encuentra en el receptor AMPA, el cual requiere la integridad del sitio de unión a glutamato y del poro para plegarse correctamente y salir del RE (Grunwald y Kaplan, 2003). El mal plegamiento (misfolding) de una proteína puede ser, por si sola, una señal de retención (control de calidad primario) no requiriendo de una secuencia específica, como es el caso de proteínas con plegamiento sensible a la temperatura (Berson y col., 2000). El exceso de chaperonas en el RE también puede afectar la expresión de proteínas sintetizadas (Deutsch, 2003). Finalmente, otro mecanismo de control es la expresión de isoformas truncadas de la proteína que altera la expresión de la isoforma de largo completo como se ha investigado en Cav2.2 (Page y col., 2004).

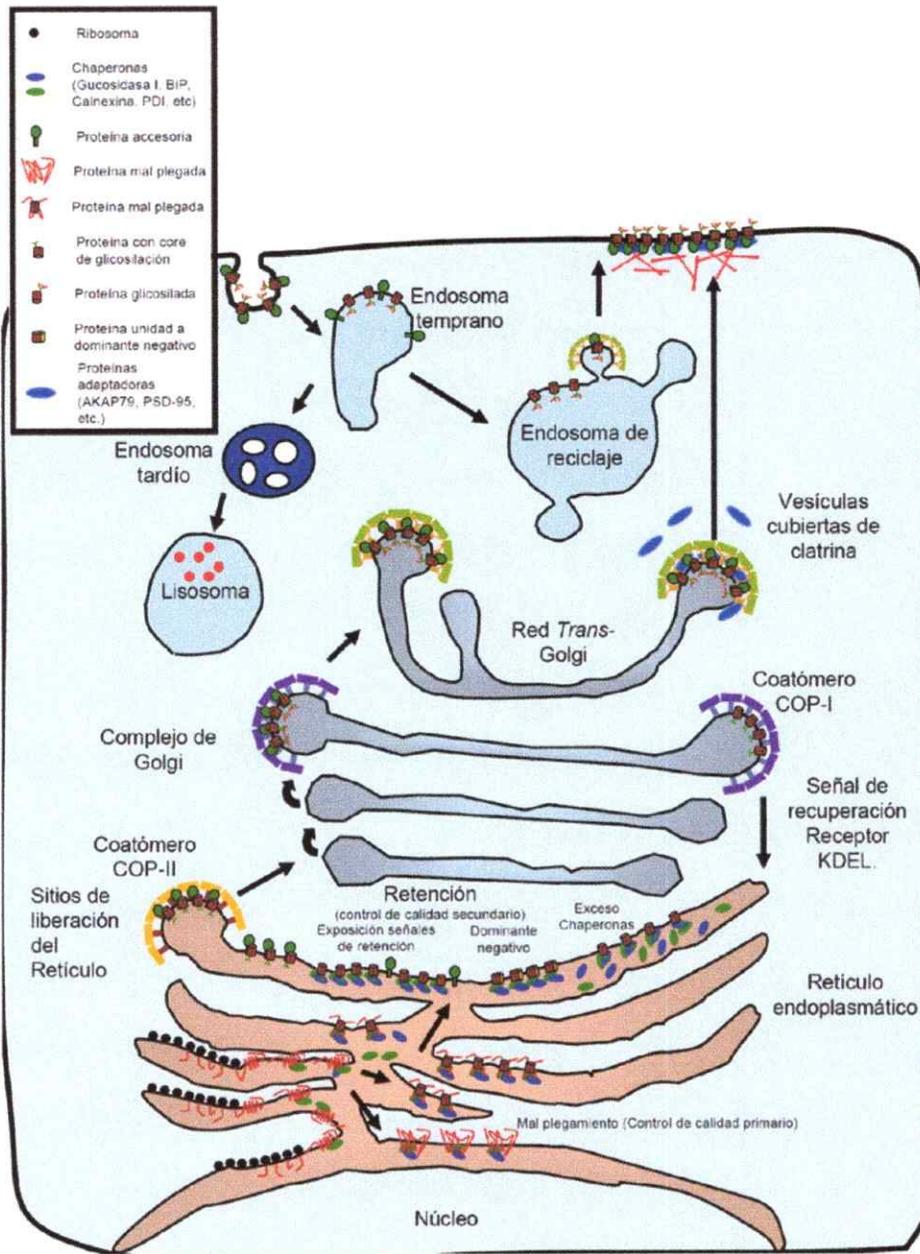


Figura 1. Esquema del tráfico de proteínas hacia la membrana plasmática

2. Regulación de la localización de canales de iones en la superficie celular por proteínas accesorias.

La funcionalidad y homeostasis iónica requiere de una localización selectiva de cada tipo de canal en la superficie celular, variando en diversos tipos celulares. En las células epiteliales del ducto colector cortical renal por ejemplo, la expresión asimétrica de canales de potasio rectificadores de entrada con distintas propiedades biofísicas ya sea en la membrana apical o basolateral determinar que el potasio sea transportado al lumen del túbulo renal en concierto con la demanda de homeostasis del potasio (Giebisch, 1998).

La destinación final de los canales de iones puede ser regulada por la composición de subunidades que lo conforman. Por ejemplo, los receptores GABA_A se pueden ubicar en la membrana sináptica o extra-sináptica dependiendo de si contienen la subunidad γ_2 o β_3 y se distribuyen de manera difusa y lejos de la sinapsis. Dentro de los receptores de GABA extrasinápticos, los que contienen la subunidad α_5 tienden a agruparse en tanto que los que contienen la subunidad δ aparecen como poblaciones difusas. Los receptores GABA_A que contienen α_5 y δ son considerados los principales receptores que median la inhibición tónica. En esta distribución subcelular la presencia de proteínas adaptadoras son claves ya que se unen a dominios proteicos particulares en las subunidades de estas combinaciones de receptores GABA_A (Jacob y col., 2008).

La familia de proteínas MAGUK (Guanilato Kinasa asociadas a la membrana) son un tipo de estas proteínas adaptadoras que regulan la función, localización y tráfico de muchos canales de iones. Las MAGUK se caracterizan por poseer dominios estructurales característicos como los del tipo PDZ, (PSD-95/ Disc-Large/ Zona occludens-1) un dominio de homología a Src 3 (SH3), y un dominio guanilato kinasa catalíticamente inactivo (GK). Estos dominios interactúan con otras proteínas y ayudan el ensamblaje de complejos macromoleculares de señalización y transporte (Funke y col., 2005). Proteínas MAGUK de la familia de PSD-95, tales como PSD-95, SAP-97, SAP-102 y PSD-93 se unen a la subunidad NR2 de los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDAR) por medio del motivo de reconocimiento en el carboxilo terminal del dominio PDZ, siendo importante en el recambio de subunidades del receptor, su agrupación y localización precisa durante el desarrollo (Lau y Zukin, 2007). Miembros de la familia de proteínas PSD-95 también son determinantes claves en la destinación sináptica de los receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-e-metil-4-isoxazole propiónico) asegurando una mayor densidad en la membrana postsináptica y garantizando la eficacia en la respuesta al glutamato liberado desde terminales presinápticos (Beique y Andrade, 2003; Beique y col., 2006; Elias y col., 2006). Estas proteínas PSD-95 no interactúan directamente con AMPAR, sino que lo hacen a través de Stargazin y otros miembros de la familia de proteínas TARP que poseen un motivo de unión al dominio PDZ en su carboxilo terminal (Chen y col., 2000; Tomita y col., 2005). Estas

proteínas TARP, que además son las mismas subunidades γ (γ_3 , γ_4 y γ_8) de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV), fueron identificadas como subunidades auxiliares para AMPAR, uniéndose directamente a estos y promoviendo tanto su transporte a la superficie celular (Chen y col., 2000; Dakoji y col., 2003) como también modulando la función del receptor (Priel y col., 2005). Otras proteínas de la densidad postsináptica, tales como proteínas que interactúan con la kinasa C1 (PICK1) regulan distintos pasos en el tráfico y propiedades de AMPAR. En particular, interacciones de PICK1 con GluR2, regulados por la actividad de PKC y/o CaMKII, puede llevar a la disminución en la densidad de subunidades GluR2 en la superficie celular aumentando con esto la fuerza de la sinapsis en neuronas del hipocampo (Derkach y col., 2007).

Las proteínas MAGUK también pueden regular a canales de iones dependientes de voltaje. Un ejemplo es la proteína MAGUK DLG, la cual participa en la localización de canales *Shaker* en el sistema nervioso central y en la retina de *Drosophila*, donde el dominio GK de DLG estaría involucrado en el tráfico de estos canales (Ruiz-Canada y col., 2002).

La localización y agrupación de canales de potasio rectificador de entrada Kir2 también es regulada por miembros de la familia de proteínas MAGUK, en este caso PSD-95 y SAP-97. SAP97 por su parte es capaz de formar complejos multiproteicos con otra MAGUK, CASK la cual a su vez

interacciona con Veli y Mint1 y regula la destinación de estos canales a partes específicas de la MP (Leonoudakis y col., 2004).

La subunidad $Ca_v\beta$ de los CCDV también forma parte de la familia de proteínas MAGUK, y su papel en el tráfico lo discutiremos más adelante.

3. Estructura y función de canales de calcio dependiente de voltaje.

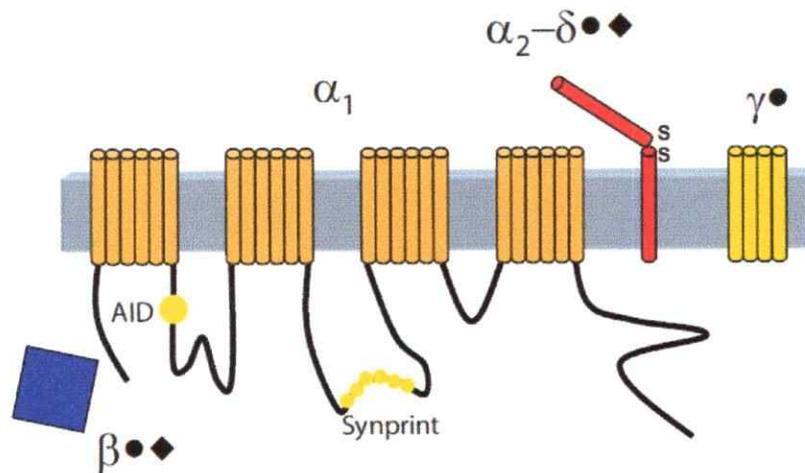
Los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) son una importante vía de entrada de calcio en diversos tipos de células acoplando por esta vía procesos dependientes de calcio a cambios en el potencial de membrana celular. Ejemplos típicos de este acoplamiento son la liberación de neurotransmisores y la contracción muscular. Los CCDV son proteínas multiméricas formados por una subunidad que conforma el poro conductor ($Ca_v\alpha_1$) y subunidades auxiliares: α_2 - δ , β y γ (figura 2). $Ca_v\alpha_1$ posee las características típicas de canales con compuerta de voltaje, esto es, cuatro repeticiones de un dominio de seis segmentos transmembrana (S1-S6) que incluyen un segmento S4 que funciona como sensor de voltaje, y una región formadora del poro. Existen 10 isoformas de $Ca_v\alpha_1$ ($Ca_v1.1$ - 1.4 , $Ca_v2.1$ - 2.3 , $Ca_v3.1$ - 3.3) dando origen a una gran diversidad funcional y farmacológica.

Las primeras investigaciones discriminaron dos tipos de corrientes iónicas clasificadas de acuerdo a sus propiedades de inactivación, las corrientes tipo L de larga duración, y las corrientes tipo T de duración transitoria. Registros electrofisiológicos en neuronas ganglionares de la raíz dorsal reveló otro tipo de corrientes denominadas de tipo N, sensible a ω -

conotoxina GVIA, cuya dependencia de voltaje y velocidad de inactivación son más negativa y rápida que los corrientes tipo L y a su vez más positiva y lenta que las corrientes tipo T.

Las corrientes tipo P y Q (P/Q), sensible a ω -agatoxina, fueron descritas en células de Purkinje y neuronas granulares del cerebelo, respectivamente. Ambas son los productos de expresión de un mismo gen y presentan propiedades farmacológicas distintas entre sí. Por último, corrientes tipo R fueron inicialmente descritas en neuronas granulares del cerebelo y no poseen un bloqueador específico (Catterall, 2000).

Experimentos de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* o en células HEK293 de los distintos genes que codifican las diferentes isoformas de $Ca_v\alpha_1$ permitieron establecer que tanto $Ca_v1.1$ (α_{1S}), $Ca_v1.2$ (α_{1C}) como $Ca_v1.3$ (α_{1D}) codifican canales de tipo L mientras que $Ca_v2.1$ (α_{1A}) codifica canales tipo P/Q, $Ca_v2.2$ (α_{1B}) de tipo N, y $Ca_v2.3$ (α_{1E}) a los de canal tipo R (residual). Los canales de calcio tipo T son codificados por la subfamilia $Ca_v3.1-3$ ($\alpha_{1G,H,I}$).



Canal ¹	Subunidad α_1 del canal de calcio ²	Subunidades auxiliares
Tipo-L	Ca _v 1.1, Ca _v 1.2, Ca _v 1.3, Ca _v 1.4	β_{1b} , β_{2a} , β_3 , β_4
Tipo-P/Q	Ca _v 2.1	$\alpha_2\text{-}\delta_{1,4}$
Tipo-N	Ca _v 2.2	$\gamma_{1,2}$
Tipo-R	Ca _v 2.3	
Tipo-T	Ca _v 3.1, Ca _v 3.2, Ca _v 3.3	

Proteínas que interactúan con canales de calcio (* involucradas en la regulación de α_1 , • involucradas en el tráfico de α_1)			
<u>Ca_vβ</u>	<u>N terminal Ca_vα₁</u>	<u>Lazo II-III Ca_vα₁</u>	<u>C terminal Ca_vα₁</u>
Ca _v α(1.x, 2.x)	Gβγ •	Sintaxina 1 •	Gβγ •
RGK ••		SNAP-25 •	14-3-3 •
	<u>Lazo I-II Ca_vα₁</u>	sinaptotagmina •	Mint1 •
	Subunidad β ••	arrestina •	CASK •
	Gβγ •		CaM ••

Figura 2. Esquema de los canales de calcio dependientes de voltaje.

Imagen modificada de Jarvis y Zamponi (Jarvis and Zamponi, 2007)

¹ Nomenclatura de acuerdo a Tsien y col (Tsien y col., 1988)

² Nomenclatura de acuerdo a Ertel y col (Ertel y col., 2000)

Los canales de calcio de alto umbral (L, N, P/Q y R) son proteínas multiméricas (figura 2) en la que subunidades auxiliares suelen participar modulando tanto el ensamblaje y expresión como la función del canal. Por ejemplo, $Ca_v\beta$ se une a un dominio de unión ubicado en el lazo citoplasmático que une el dominio I y II de $Ca_v\alpha_1$ y produce un aumento en la expresión funcional de $Ca_v\alpha_1$, presumiblemente facilitando la salida del RE del canal (Pragnell y col., 1994). En esta unión participa la secuencia consenso QQLEEDLXGYXXWITQXE, también conocida como AID (por alpha-interaction-domain), que esta contenida dentro del lazo mencionado. En la secuencia AID, se destaca un triptófano (W) crítico para la unión a $Ca_v\beta$ (De Waard y col., 1996; Berrou y col., 2002). La estructura cristalográfica del complejo $Ca_v\beta$ con el motivo AID, muestran que este último interacciona con un bolsillo hidrofóbico de $Ca_v\beta$ (Alpha Binding Pocket, ABP) conformado por residuos no contiguos en la secuencia (Van Petegem y col., 2004; Opatowsky y col., 2004; Chen y col., 2004). $Ca_v\beta$ también tiene la capacidad de modular la función del canal ya que es capaz de potenciar la corriente iónica sin afectar la densidad aparente de canales en la superficie según lo reportado por las corrientes de movimiento de carga al ser co-expresada con $Ca_v1.2$ en ovocitos de *Xenopus* (Neely y col., 1993). Además, la dependencia de voltaje de la activación de los canales se desplaza hacia voltaje hiperpolarizantes con la presencia de cualquier tipo de $Ca_v\beta$ (Singer y col., 1991). Estas subunidades también modulan el

proceso de inactivación y aunque la mayoría de los tipos de $Ca_v\beta$ hacen que este proceso sea más rápido y empiece a potenciales de membrana más negativos, existe un subtipo en particular ($Ca_v\beta_{2a}$) que hace más lento o inhibe la inactivación (Olcese y col., 1994; Dolphin, 2003a). La modulación de otros aspectos de la función también depende del tipo de $Ca_v\beta$. Por ejemplo, la modulación mediada por proteína G (la cual se une a un motivo específico en el lazo I-II) o la facilitación por prepulso (Canti y col., 2000) no se observan con $Ca_v\beta_{2a}$ pero sí con $Ca_v\beta_3$ o $Ca_v\beta_{1b}$, sugiriendo que la interacción entre $Ca_v\alpha_1$ y $Ca_v\beta$ involucra a más de un sitio.

4. Localización y tráfico de canales de calcio dependientes de voltaje.

Los diferentes tipos de CCDV muestran distintas distribuciones celulares y subcelulares con variados papeles fisiológicos. Esto se condice con la naturaleza altamente localizada de las señales de calcio en las neuronas. En estas células los canales de tipo L están localizados en el cuerpo celular y el flujo de Ca^{+2} a través de ellos gatilla la transcripción de genes específicos (Gomez-Ospina y col., 2006) en tanto que canales tipo N y P/Q están localizados en los terminales presinápticos donde su apertura promueve la liberación de neurotransmisores (Dunlap y col., 1995; Reid y col., 2003).

La subunidad $\alpha_2\text{-}\delta$ también parece tener un importante papel en la expresión en superficie de los CCDV (Shistik y col., 1995; Yasuda y col., 2004; Canti y col., 2005). En células HEK, la omisión de la subunidad $\alpha_2\text{-}\delta$ resulta en una

dramática reducción de las densidades de corriente de canales de tipo L, N y P/Q. Además, $\alpha_2\text{-}\delta$ y $\text{Cav}\beta$ parecen actuar de manera sinérgica para promover densidades de corriente mediada por estos subtipos de canales (Singer y col., 1991; Yamaguchi y col., 2000). Un papel para la subunidad $\alpha_2\text{-}\delta$ en la regulación de la expresión en superficie de CCDV se ha develado por observaciones desde una cepa mutante de ratón (*Ducky^{2b}*) en la cual la subunidad $\alpha_2\text{-}\delta$ está funcionalmente eliminada. En estos mutantes, se muestra una disminución en los registros de densidad de corriente para los canales de calcio tipo P/Q en neuronas aisladas. Un estudio reciente del laboratorio de Dolphin ha revelado que la presencia de un sitio de unión a iones metálicos con un motivo Von Willebrand en la subunidad $\alpha_2\text{-}\delta$ sería crucial para la expresión en superficie de canales tipo L, N y P/Q, sugiriendo que la expresión en superficie de estos canales es dependiente de iones metálicos (Canti y col., 2005). La subunidad $\alpha_2\text{-}\delta$ también influye en la destinación de canales del tipo P/Q a balsas lipídicas. Los mecanismos moleculares de estos procesos aún no se conocen. Una hipótesis es que aumentan la estabilidad del complejo heteromérico del canal de calcio (Jarvis y Zamponi, 2007).

El papel de la subunidad γ es menos conocido con respecto al tráfico del canal. Co-expresión en ovocitos de *Xenopus* sólo muestran sutiles efectos en la función o densidades de corriente. El efecto más notorio es visto con la subunidad γ_7 la cual suprime la función de canales de tipo N en células

COS7 y en ovocitos de *Xenopus*. Sin embargo la sobreexpresión en neuronas simpáticas no afecta a canales de tipo N pre-existentes, sugiriendo que el efecto es debido más al tráfico que a la regulación funcional (Jarvis y Zamponi, 2007).

Los CCDV por sí mismos poseen señales de destinación en los elementos citoplasmáticos, amino terminal, carboxilo terminal y lazos intracelulares. Tanto Cav2,1 como Cav2,2 contienen un sitio de interacción a proteínas sinápticas (*synprint*) en el lazo II-III que une a proteínas tales como syntaxina, SNAP-25 y sinaptotagmina (Jarvis y Zamponi, 2005). Esta asociación acopla a las vesículas sinápticas a fuentes de calcio extracelular, y sirve como un elemento regulatorio por el cual las proteínas sinápticas controlan la función de los canales de calcio. La unión de syntaxina al lazo II-III del canal juega un papel en la inhibición dependiente de voltaje, estabilizando la unión de la proteína G_{βγ} al canal (Jarvis y col., 2000; Dolphin, 2003b). Sinaptotagmina también se une al canal en esta región frente a despolarización en una manera dependiente de calcio (Sheng y Wyszynski, 1997). Otras regiones en el carboxilo terminal de Cav2,2 contienen sitios de interacción para las proteínas adaptadoras Mint-1 y CASK, las cuales son expresadas en el terminal nervioso presináptico (Maximov y Bezprozvanny, 2002). Estos sitios de interacción no están presentes en Cav2,1 (Mochida y col., 2003). Participando también de la liberación de neurotransmisor se encuentran los canales Cav2,3, los cuales no presentan ninguno de los dos elementos antes mencionados y sin

embargo presentan una marcada destinación subcelular (Kamp y col., 2005) sugiriendo la presencia de otros determinantes en la destinación de este canal de calcio.

Los canales $\text{Ca}_v1.2$ y $\text{Ca}_v1.3a$ (esta última es una isoforma con carboxilo terminal largo), contienen en su carboxilo terminal un motivo de unión a dominio PDZ. Esta asociación de $\text{Ca}_v1.2$ con proteínas que poseen dominios PDZ juega un papel importante en acoplar la fosforilación del factor de transcripción CREB (Weick y col., 2003). Sin embargo, un motivo poli-prolina adicional en $\text{Ca}_v1.3a$ permite que la proteína MAGUK Shank se una tanto por su dominio SH3 como por su dominio PDZ, favoreciendo la agrupación y localización apropiada de esta isoforma y además participando en la vía de señalización de pCREB (Zhang y col., 2005).

Poco se conoce sobre la remoción de los CCDV desde la MP. Algunos hallazgos muestran que la activación de receptores metabotrópicos en el sistema nervioso puede conllevar a la internalización de CCDV. Los canales $\text{Ca}_v2.2$ también poseen en el lazo II-III un sitio de unión para arrestina, proteína involucrada en el tráfico e internalización de proteínas de membrana, abriendo la posibilidad de un mecanismo común en la internalización de los CCDV, debido a que el sitio de unión es bastante conservado (63% de homología) (Puckerin y col., 2006).

La interacción de $\text{Ca}_v\beta$ con otras proteínas podría regular la disponibilidad del canal en la MP. Este es el caso de la interacción con dinamina, proteína motora involucrada en la fisión de membranas, cuyo reclutamiento por el dominio SH3 de $\text{Ca}_v\beta$ promueve la endocitosis de proteínas de membrana (Gonzalez-Gutierrez y col., 2007).

Los CCDV también pueden ser regulados a nivel funcional y en su expresión en superficie por proteínas G pequeñas de la familia RGK (Rem, Rem2, Rad, Gem/Kir). La familia RGK involucra a cuatro miembros, Rad, Gem, Rem y Rem2. Todas estas proteínas poseen el dominio conservado Ras-GTPasa pero difieren de las Ras GTPasas en tres aspectos. Primero, no poseen el motivo CAAX para la acilación lipídica que promueve la localización en la membrana. Segundo, tienen una baja actividad GTPasa intrínseca. Tercero, tienen un extenso amino terminal con un dominio de unión a la proteína adaptadora 14-3-3 y un extendido dominio carboxilo terminal que contiene sitios de unión para 14-3-3 y Ca^{2+} /calmodulina. Todos los miembros de la familia RGK tienen la capacidad de interactuar con $\text{Ca}_v\beta$, debido a esto Gem inhibe potentemente el tráfico de canales $\text{Ca}_v1.2$ a la superficie celular de células HEK293. Las evidencias sugieren que la distribución subcelular de Rad, Rem, Rem2 y Gem está regulada por proteínas 14-3-3 y calmodulina. Esto le confiere a las proteínas RGK la capacidad de regular de manera indirecta el tráfico de $\text{Ca}_v\alpha_1$ al secuestrar a $\text{Ca}_v\beta$. $\text{Ca}_v\beta$ puede unir simultáneamente a $\text{Ca}_v\alpha_1$ y a Rem y producir sus efectos, sugiriendo que la regulación por proteínas RGK puede no ser debida a un desacoplamiento

entre $\text{Ca}_v\alpha_1$ y $\text{Ca}_v\beta$, pero puede ser debido a alteraciones de las propiedades funcionales del complejo $\alpha_1\text{-}\beta$. Recientemente Bannister y col (Bannister y col., 2008) demostraron que Rem reduce el número de canales funcionales en la MP regulando de manera negativa el acoplamiento excitación-contracción en el músculo esquelético.

Un cúmulo de evidencias apuntan a que la unión con diferentes isoformas de $\text{Ca}_v\beta$ son factores claves en determinar la distribución subcelular de los CCDV (Witte mann y col., 2000). La visión prevalente indica que la unión de $\text{Ca}_v\beta$ al AID ocluiría señales de retención codificadas en el lazo I-II de $\text{Ca}_v\alpha_1$, ya que es posible transferir el lazo I-II a otra proteína de membrana y producir con esto su retención en el RE (Bichet y col., 2000). Aunque el AID es el único determinante en el tráfico de $\text{Ca}_v\alpha_1$ que ha sido identificado claramente, existen datos experimentales que sugieren que la integridad de AID no es un requisito absoluto. Por ejemplo, al sustituir un triptófano de la secuencia AID (W386) de $\text{Ca}_v2.3$ por alanina se suprime la interacción AID- β *in vitro* (De Waard y col., 1996) pero no la expresión de canales funcionales en ovocitos de *Xenopus* (Berrou y col., 2002) Otros trabajos muestran que una quimera entre la proteína CD8 con distintas secuencias de la proteína, tanto con el amino terminal, carboxilo terminal, el lazo III-IV o con el lazo I-II de $\text{Ca}_v2.1$, es retenida en distintos grados en el RE. Además, experimentos de *pull down* con péptidos de los segmentos antes mencionados de $\text{Ca}_v2.1$ unidos a GST indican una interacción entre ellos *in*

vitro (Cornet y col., 2002), especialmente entre el amino terminal y el lazo I-II. Trabajando con la subunidad $Ca_v1.2$, Wei y colaboradores (Wei y col., 1996) muestran que el amino terminal del canal tiene una participación en la inserción de canales en la MP. Eliminación de los primeros 40 a 120 aminoácidos del amino terminal ($\Delta N40$, $\Delta N60$, $\Delta N80$, $\Delta N100$ y $\Delta N120$) aumenta 5 a 8 veces, tanto las corrientes iónicas como las corrientes de compuerta, mostrando con esto un aumento de los canales funcionales en la MP comparado con el canal "wild-type" con amino terminal completo. Es importante recalcar que en estos experimentos no se co-expresó $Ca_v\beta$, por lo que los efectos son única y exclusivamente debido a la eliminación del amino terminal, y que en ninguno de los mutantes se afectó la cinética de activación, la carga movilizada, ni la eficiencia en el acoplamiento entre el movimiento de carga y la apertura del poro. Por lo tanto, estos mutantes se hacen insensibles a $Ca_v\beta$ en cuanto a la llegada a la MP. Esto implicaría que durante la síntesis del canal es posible que superficies complementarias interaccionen entre si de manera que $Ca_v1.2$ con el amino terminal completo requiera de $Ca_v\beta$ para ocluir determinantes de retención y que por lo tanto, los aminoácidos del 40-120 son capaces de hacerlo por si mismos favoreciendo con esto la inserción del canal en la membrana plasmática. Utilizando una isoforma de $Ca_v1.2$ (de amino terminal corto) de hipocampo el grupo de Soldatov (Kobrinisky y col., 2005) sugiere, en base al uso de quimeras del amino terminal con un dominio de homología a plecstrina (PH),

que el amino terminal puede actuar como un silenciador de la conductancia del canal y bloquearlo en la ausencia de $\text{Ca}_v\beta$. Al eliminar el amino terminal casi por completo y co-expresarlo con la subunidad $\alpha_2\text{-}\delta$ la destinación a MP no se vio afectada, mostrándose un canal funcional, confirmando que el anclaje del amino terminal a la MP produce expresión funcional y es independiente de $\text{Ca}_v\beta$.

Estos antecedentes nos llevaron a proponer la existencia de al menos tres elementos implicados en la expresión en superficie de $\text{Ca}_v1.2$. El amino terminal, el lazo I-II y el motivo AID contenido en este último de manera que durante el tráfico del canal, el reconocimiento de segmentos complementarios determina la salida del RE: $\text{Ca}_v\beta$ será capaz de ocluir determinantes de retención disminuyendo así el tiempo de permanencia en el RE. Estos determinantes de retención involucrarían una estructura tridimensional, más que secuencias de retención clásica, por lo que el plegamiento adecuado del amino terminal sería necesario para la interacción con otros elementos de la propia secuencia favoreciendo o entorpeciendo la salida del RE. Como hipótesis alternativa se propone que la salida de los canales en el RE es independiente de las interacciones entre distintos elementos, siendo solo la subunidad $\text{Ca}_v\beta$ necesaria para la expresión.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Biología molecular.

1.1. Cultivo de bacterias y obtención de células competentes.

Se utilizó la cepa bacteriana XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA USA) de acuerdo a sus características genéticas acordes para la amplificación de las secuencias clonadas en los vectores pAGA-2 (Wei y col., 1991) y pBluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, CA USA).

Los cultivos de bacterias se crecieron en medio líquido Luria-Bertani (LB) a 37°C con agitación orbital a 250 RPM en un agitador. Para cultivo en medio sólido se suplementó el LB con agar-agar al 1,5% (Sambrook y col 1989). Todos los medios y materiales fueron esterilizados a 121°C, 15 psi por 30 min.

Las transformaciones se llevaron a cabo en la cepa de bacterias XL1-Blue hechas competentes mediante el protocolo de cloruro de rubidio que es un refinamiento del método de fosfato de calcio (Sambrook y col., 1989). En este método se partió con una colonia de bacterias XL1-Blue aislada de cultivo en medio LB sólido sin antibiótico. Con esta colonia se inoculó una colonia 100 ml de medio LB incubándose con agitación a a 37°C por toda la noche. Este cultivo se diluyó 1:100 en 100 ml de medio líquido mínimo (SOB; Sambrook y col 1989) y se creció hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,5-0,6 unidades de

absorbancia a 550 nm (OD_{550n}). Los cultivos se sedimentaron a 4800 g por 15 min a 4°C, luego, se resuspendieron en 30 mM Acetato de potasio, 50 mM $MnCl_2$, 100 mM RbCl, 10 mM $CaCl_2$ 12%(p/v) de Glicerol, a pH 5.8 y se incubaron por 2 h en hielo. Se volvió a sedimentar y se resuspendió suavemente en 75 mM $CaCl_2$, 10 mM RbCl 12% (p/v) Glicerol 10 mM MOPS a pH 7.0. Luego de incubar en hielo por 90 min, las bacterias competentes se alicuotaron, y se congelaron en nitrógeno líquido almacenándose a -80°C. El nivel de competencia de las células obtenidas por este método es de 1×10^8 unidades formadoras de colonias por microgramo de plásmido pUC18 (Stratagene, La Jolla, CA USA). (CFU/ μ g ADN plasmidial)

1.2. Transformación de células competentes con ADN plasmidial.

Para transformar las bacterias competentes con ADN plasmidial estas fueron descongeladas en hielo por 10 min, luego se agregó la muestra de DNA (desde productos de ligación hasta 1ng de plásmido) y se incubó en hielo por 30 min. Las bacterias fueron sometidas a shock térmico en un baño seco a 42°C por 2 min, luego se dejaron en hielo por 2 min más. Las bacterias se incubaron durante 1 h a 37°C con medio SOC (Sambrook y col 1989). El cultivo fue transferido a placas con medio LB más ampicilina (50 μ g/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) y se incubaron a 37°C hasta 16 h.

1.3. Obtención y purificación de plásmidos de DNA.

El DNA se extrajo de un cultivo de bacterias transformadas con el plásmido de interés y se creció durante toda la noche (12-16 h) a 37°C con agitación. La extracción se realizó con preparaciones de columnas Mini, Midi o Maxi según las indicaciones del fabricante (Qiagen Inc., Chatsworth, CA USA).

1.4 Transcripción in vitro.

1.4.1. Linearización y purificación del DNA.

Los plásmidos se linearizaron con las enzimas de restricción Hind-III (canales de calcio y subunidad β) y Not-I (constructos del canal de potasio tipo Shaker) ubicados en el extremo 3' de la región a transcribir. Se digirieron entre 10-20 μ g de DNA en un volumen de 50 μ l por 4 horas a 37°C. El producto de la linearización se verificó en geles de agarosa al 1% teñidos con GelStar (Lonza Group Ltd. Switzerland). Un volumen de DNA se mezcló con 3 volúmenes de agua libre de nucleasas y 1/10 volúmenes de 5M NH_4OAc (libre de RNasa). A esta mezcla se le agregó 1 volumen de fenol-cloroformo alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) (Ambion Inc, Austin Tx), se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 16000 rpm, recuperándose la fracción superior, seguidos por dos lavados con 1 volumen de cloroformo (Sigma-Aldrich, St. Louis MO). Luego, el DNA linearizado fue precipitado con 1 volumen de isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) a -20°C por 1 h, centrifugándose a 16000 g por 30 min. El precipitado se lavó con etanol 70% dos veces y se resuspendió en 10 μ l de

agua libre de nucleasas para luego cuantificar su concentración por absorbancia a 260 nm (Sambrook y col 1989).

1.4.2. Síntesis de cRNA.

La transcripción *in vitro* se efectuó con el kit mMessage mMachine (Ambion Inc, Austin Tx) utilizando la RNA polimerasa T7 ya que los distintos clones están insertos en vector que contienen promotor T7. Para la síntesis de cRNA de canales de calcio se hizo una mezcla de reacción en el siguiente orden agua libre de nucleasas, 10 µl de NTP-CAP, 2 µl de tampón de transcripción 10X, 1 µg de DNA linearizado, 1 µl de GTP y 2 µl de la RNA polimerasa T7. La mezcla se incubó por 3 h a 22°C, luego se suplementó con 1 µl RNA polimerasa T7 Plus (Ambion Inc, Austin Tx) y 1 µl de GTP y se incubó por 1 h más a 22°C. Finalizado este tiempo se agregó a la mezcla 1 µl de GTP y se incubó 20 min a 37°C, En este punto se detuvo la síntesis, agregando la enzima DNasa Turbo que degrada el DNA linearizado en una incubación de 20 min a 37°C. Para canales de potasio y $Ca_v\beta$ se hizo la misma mezcla pero sin el µl de GTP. Esta mezcla se incubó por 2 h a 37°C, luego se detuvo la reacción por una digestión con DNasa Turbo por 20 min a 37°C. RNA sintetizado se purificó por extracción en phenol-cloroformo seguido de una precipitación alcohólica. Para esto la mezcla de la reacción se le agregan 115 µl de agua libre de nucleasas más 25 µl de NH_4OAc (libre de RNasa) para luego extraer con 1 volumen de fenol-cloroformo ácido (Ambion Inc, Austin Tx) y dos lavados con 1 volumen de cloroformo (Sigma-Aldrich, St. Louis MO). La fase acuosa se precipitó con 1

volumen de isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) a -20°C por 1 h, y se centrifugó luego a 16000 g por 30 min. El precipitado se lavó con etanol 70% dos veces. Finalmente el RNA se resuspendió en 20 μl de agua libre de nucleasas. La calidad del RNA se verificó en un gel al 1% de agarosa y por relación de absorbancias 260/280 nm entre 1,7-1,9 (Sambrook y col 1989). La concentración final se calculó a partir de la absorbancia a 260 nm donde 1 unidad de absorbancia equivale a 40 $\mu\text{g/ml}$ de RNA.

1.5. Construcción de mutantes, quimeras y mutagénesis sitio dirigida.

1.5.1. Preparación de las mutantes del lazo I-II de $\text{Ca}_v1.2$ y $\Delta\text{N132Ca}_v1.2$ y con epitopo Hemaglutinina (HA).

El clon del canal de calcio cardiaco (Va.33) fue obtenido desde librerías de cDNA de corazón de conejo (número de acceso GenBank™ X15539) y clonado en el plásmido pAGA-2 (Wei y col., 1991). Este vector, basado en el plásmido pGem-3 (Sanford y col., 1991), contiene la secuencia 5' no traducida del RNA-4 del virus del mosaico de alfalfa entre el promotor T7 y la región codificante para terminar con de 92 pares de bases de adenina para conformar un cola de poli(A).

Como fondo se utilizó un mutante de $\text{Ca}_v1.2$ que carece de los primeros 60 aminoácidos del amino terminal $\Delta\text{N60Ca}_v1.2$ en el vector pAGA-2 (Wei y col., 1996). A este se le insertó un epitopo anti-hemaglutinina (HA) en el lazo extracelular entre S5 y S6 del dominio II para dar origen a $\Delta\text{N60Ca}_v1.2\text{HA}$ por

PCR (Hidalgo y col., 2006). De manera similar se obtuvo $\Delta N60Ca_v1.2(W470S)$ donde el aminoácido triptófano en la posición 470 fue reemplazado por serina (W470S) y $\Delta N60Ca_v1.2(\Delta AID)$ que carece del motivo de 18 aminoácidos que une a $Ca_v\beta$ (AID) en el lazo I-II (Wei y col., 1996; Hidalgo y col., 2006) (figura 3). A partir de esto mutantes se generaron por subclonaje las distintas combinaciones empleadas esta tesis. Para generar $Ca_v1.2HA$ se subclonó entre los sitios de restricción Spe-I y Afl-II (New England Biolabs). Para generar $Ca_v1.2(\Delta AID)$ y $Ca_v1.2(W470S)$ se utilizaron los sitios de restricción Cla-I y Afl-II (New England Biolabs) y para $\Delta N132Ca_v1.2(W470S)$ se utilizaron los sitios de restricción Mfe-I y Afl-II (New England Biolabs). Todas las combinaciones de mutantes generados fueron confirmados por secuenciación.

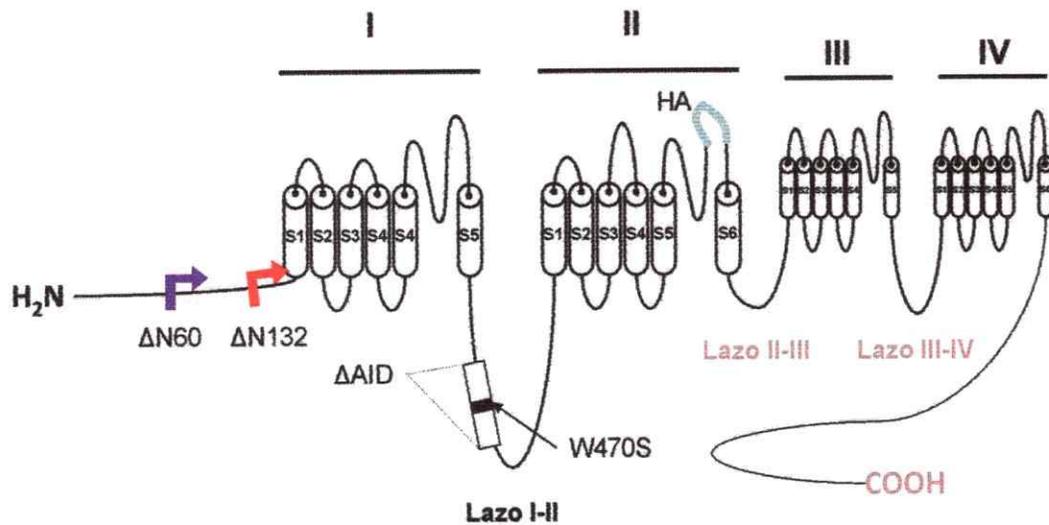


Figura 3. Esquema del canal de calcio dependiente de voltaje $Ca_v1.2$.

El esquema resume la estructura del canal conformada por 4 dominios (I-IV) cada uno con 6 segmentos transmembrana (S1-S6). Los dominios se encuentran unidos por lazos intracelulares. El amino terminal del canal silvestre ($Ca_v1.2$) fue mutado, delecionando los primeros 60 aminoácidos y 132 aminoácidos para generar dos mutantes $\Delta N60Ca_v1.2$ y $\Delta N132Ca_v1.2$, respectivamente. La proteína también fue mutada delecionando un segmento del lazo I-II el cual une a la proteína $Ca_v\beta$, el mutante $Ca_v1.2$ (ΔAID). En el mismo motivo AID se mutó un aminoácido triptófano esencial para la interacción con $Ca_v\beta$ por serina (W470S). También se utilizaron combinaciones de mutantes con un epítopo HA incorporado en el lazo extracelular que une los segmentos S5 y S6 del dominio II.

1.5.2. Incorporación del lazo I-II en el carboxilo terminal de Shaker.

Se utilizaron como base del constructo el clon de Shaker (Goldstein y Miller, 1993) en pBluescript SK+. La quimera entre Shaker y el lazo I-II_C se obtuvo subclonando el producto de PCR del lazo I-II de Δ N60Ca_v1.2 (cebador directo GCTAGCGAGTTTTCCAAAGAGAGGGAGAAGGCCAA, cebador inverso, GGCGGCCGCTCAAGATTCGGTCTCACTTGTGGGCATGCT) en los sitios Nhe-I y Not-I de pBluescript-Shaker. El sitio Nhe-I de pBluescript-Shaker fue introducido por mutagénesis sitio dirigida siguiendo las instrucciones del proveedor (Quickchange-Stratagene) con el oligonucleótido GGCCGTTAGTATCGACGCTAGCGTTTGACTACTGGTGC) antes del codón de término del clon de *Shaker*.

2. Preparación de ovocitos de *Xenopus laevis*.

Ranas adultas hembras fueron anestesiadas por inmersión en 0,5% (p/v) Etil-3-amino-benzoato metilsulfonato (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) durante 30 min. Uno o dos lóbulos de un ovario fueron removidos bajo condiciones estériles a través de una incisión abdominal de 10 a 12 mm. Los lóbulos son desmembrados manualmente en grupos de 5 a 10 ovocitos y luego defoliculados por digestión enzimática con colagenasa tipo 2 (436U/ml, Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ) en OR-2 (en mM: 82,5 NaCl, 2,5 KCl, 1 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7,6) a temperatura ambiente por 1h.

Luego de varios lavados con SOS (en mM: 100 NaCl, 1MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 2,5 KCl, 5 HEPES, pH 7,6), Ovocitos estado V y VI fueron seleccionados para inyección de cRNA con micropipetas de vidrio (WPI, Sarasota, FL. USA) utilizando un nano-inyector (Drummond Scientific Co). Cada ovocito se inyectó con un volumen de 50 nl de cRNA entre 0,05-1 µg/µl por ovocito. Los ovocitos fueron mantenidos en placas Petri a 18°C en SOS suplementado con antibiótico con agitación suave hasta 7 días. Al principio se utilizó Gentamicina (300 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) pero luego de verificar que mucho problemas de contaminación se debían a infección con *Pseudomonas fluorescens*, resistente a Gentamicina (Elsner y col., 2000) se cambió a Amikacina (300 µg/ml) (Lab Chile SA. Santiago. Chile).

3. Protocolo Cut Open Voltage-Clamp (COVC).

Los registros de corrientes macroscópicas se hicieron utilizando la técnica de Cut Oocyte voltaje-clamp o COVC (Tagliatela y col., 1992), utilizando un amplificador CA-1 (Dagan Corp., Minneapolis MN USA). Esta técnica de voltaje controlado en ovocito cortado permite aislar una fracción de la membrana del ovocito del *Xenopus* y registrar con gran resolución temporal y buen control espacial la corriente que fluye a través de ésta. Entre 20 a 25% de la membrana del ovocito queda aislada físicamente y eléctricamente por tres cámaras superpuestas. Las dos cámaras superiores tienen agujeros de 0,5 a 0,8 mm de diámetro donde se asienta el ovocito. La corriente de la membrana expuesta al

compartimiento superior se registra a través un circuito de voltaje controlado (P1 y P2, figura 4A). Para aislar eléctricamente este compartimento un segundo circuito (guarda) de voltaje controlado mantiene el voltaje igual al del compartimiento superior a través de GS1 y GS2. La fracción de membrana aislada por el agujero inferior (intracelular) es permeabilizada con un tratamiento breve con saponina al 0,1 % (p/v) en solución interna y así permitir acceso eléctrico y difusional con el citoplasma del ovocito. El voltaje en la cara intracelular de la zona expuesta al compartimiento de registro es controlado por un tercer circuito (Vclamp) a través de I_c y un microelectrodo (TW150F-3. WPI, Sarasota, FL. USA) de 0,5 a 1,2 M Ω que contiene 2M tetraetilamonio-metanosulfonato, 50 mM NaCl y 10mM EGTA.

Para el registro de corrientes iónicas de canales de calcio se usó una solución interna que contiene en mM: 120 de NaMES, 10 EGTA y 10 HEPES, pH 7,3, y una solución externa que contiene en mM: 10 de Ba⁺² 100 NaMES, 10 EGTA y 10 HEPES pH 7,0 ajustado con ácido metanosulfónico (MES). Se utilizó el software pClamp7 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA. USA) para adquirir los datos de corrientes macroscópicas. En el caso de registros de corrientes iónicas de canales de potasio se usó una solución interna que contiene en mM: 110 KMes, 10 HEPES 2 MgCl₂, 0,1 EGTA, pH 7,0 ajustado con MES, y una solución externa que contiene en mM: 100 NaCl, 1 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 2,5 KCl, 5 HEPES, pH 7,6

Los protocolos básicos que se emplearon para registrar corrientes de canales de calcio en el ovocito son: Un protocolo para probar la corriente de Ba^{2+} : Sobre un voltaje de mantención de -90 mV, se generan tres pulsos de 50 ms a -30 , 0 y $+30$ mV. Para confeccionar la curva corriente versus voltaje (IV) se utilizó un voltaje de mantención de -80 mV y pulsos de 60 ms desde -50 hasta $+60$ mV en incrementos de 10 mV. Para medir la carga macroscópica movida en la apertura (Q_{ON}) utilizamos un tercer protocolo (figura 4B) dando pulsos de 10 ms desde $+45$ hasta $+51$ mV con incrementos de 2 mV y así registramos Q_{ON} al potencial de reversión de la corriente de Ba^{2+} . El voltaje de mantención de este protocolo era de -90 mV. Un cuarto protocolo para confeccionar la curva de conductancia versus el voltaje (GV): Mantenimiento a -80 mV, pulsos de 60 ms desde -40 hasta $+150$ mV, con repolarización a -80 mV. Las corrientes resultantes son filtradas a 4 kHz y los componentes lineales son eliminados restando la suma de las corrientes evocadas por cuatro pulsos sucesivos de un cuarto de la amplitud del pulso de interés. Para los dos primeros protocolos se agregó un filtro digital de 1 kHz. La capacitancia de la membrana registrada se midió con un quinto protocolo que consistía en un pulso de 400 ms a $+20$ mV desde un voltaje de mantención de -80 mV. Los protocolos para los registros de canales de potasio en el ovocito son: Uno para confeccionar una curva I-V: Mantenimiento a -90 mV, con pulsos de 30 ms desde -80 hasta $+70$ mV con incrementos de 10 mV. El análisis de los registros se desarrolló con el programa pClamp 6.0 (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA).

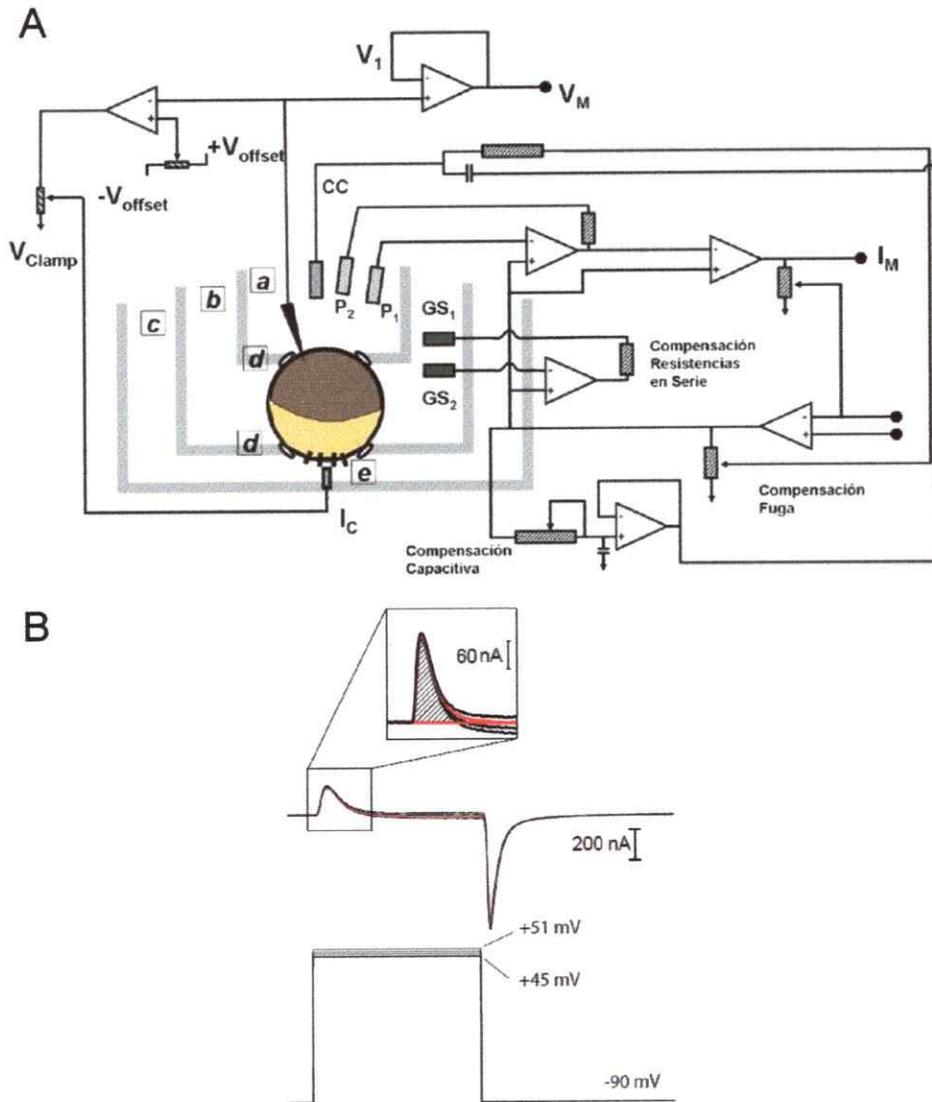


Figura 4. Diagrama esquemático de la cámara de registro y la electrónica en COVC y medición de Q_{ON} .

A. La cámara de registro está compuesta por el compartimiento externo de registro (a), el compartimiento de las guardas (b) y el compartimiento interno donde se inyecta corriente (c). El ovcito es asentado entre las cámaras a y b y los compartimientos se encuentran sellados con vaselina (d). La superficie del ovcito que da a la cámara inferior (C) es permeabilizada con saponina (e). B. Q_{ON} fue medida integrando las corrientes transitorias de salida (inset) al inicio de un pulso de voltaje cercano al potencial de reversión de la corriente de Bario (I_{Ba}) es determinado empíricamente por varios pasos de voltaje de +51 a +45 mV) con incrementos de 2 mV (trazo rojo)

4. Separación de membranas totales desde ovocitos.

Un grupo ovocitos fueron homogenizados mecánicamente con un homogenizador Dounce en 20 μ l de HbA (en mM: 5 $MgCl_2$, 5 NaH_2PO_4 , 1 EDTA 80 Sacarosa, e inhibidores de proteasas, 1 PMSF, 20 Tris pH 7,4, 5 μ g/mL leupeptina y pepstatina) y centrifugados dos veces por 5 min a 4°C a 200 g. Para obtener la fracción de membranas totales el sobrenadante es recuperado y centrifugado por 20 min a 4°C a 16000 g. Para la inmunotransferencia la fracción de membrana se resuspendió en 4 μ l de tampón Laemmli (tampón Laemmli 2X: 4% (p/v), 20% glicerol (v/v) 10% 2-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol, 0,125M Tris-HCl, pH 6.8) (Laemmli, 1970) por ovocito y almacenadas a -80°C (Kamsteeg y Deen, 2001).

5. Fraccionamiento subcelular.

El protocolo de fraccionamiento usado es una modificación del protocolo de Corey y col. 1994 (Corey y col., 1994). Un grupo de entre 30 a 100 ovocitos inyectados fueron homogenizados en 200 μ l tampón TE (en mM: 50 Tris, 1 EDTA pH 7,5) con 0,32M sacarosa más inhibidores de proteasas (1mM PMSF, 5 μ g/ml leupeptina y 5 μ g/ml pepstatina) centrifugados dos veces a 1000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante fue cargado en una gradiente continuo de sacarosa (desde 2,0-0,6M de sacarosa en tampón TE más 5mM de $MgCl_2$). Las muestras fueron centrifugadas a 40000 rpm por 3 h a 4°C en un rotor SW60Ti (Fuerza centrífuga relativa: $RCF_{Máxima}$ 215578; $RCF_{Promedio}$ 164326). Se

muestras fueron centrifugadas a 40000 rpm por 3 h a 4°C en un rotor SW60Ti (Fuerza centrífuga relativa: $RCF_{Máxima}$ 215578; $RCF_{Promedio}$ 164326). Se recolectaron 15 fracciones desde el fondo del tubo de alrededor de 250 µl cada una. La concentración de sacarosa de cada fracción recolectada fue estimada a partir de la medición con un refractómetro calibrado con las soluciones madres del gradiente (2M, 0,6M y 0,32M sacarosa). Se agregaron 5 µl de tampón Laemmli 3X a 15 µl de cada fracción y se cargaron en un gel SDS-PAGE al 9%, que luego fue sometido a electroforesis a 170 V por 1h. Luego se transfirieron a membranas de PVDF (MilliPore) a 30V toda la noche a 4°C o bien a 100V por 75 min a 4°C con agitación. Las inmunotransferencias fueron bloqueadas con leche descremada (5% LD, Svelty-Nestlé) 5% (p/v) en TBS (en mM: 150 NaCl, 2,8 KCl, 25 Tris-base, pH 7,4) Las membranas fueron lavadas 3 veces por 5 min con TBS y luego se incubaron con anticuerpo primario en TBS más 5% LD toda la noche a 4°C con agitación. Finalmente las membranas se lavaron 3 veces con TBS por 5 min.

Para revelar el anticuerpo primario se utilizaron anticuerpo secundario conjugados con peroxidasa de rábano (HRP; Sigma-Aldrich, St. Louis MO), incubando las membranas en TBS más 5% LD a temperatura ambiente por 3 horas en presencia del anticuerpo secundario. Las membranas fueron lavadas extensamente con TBS. Se agregaron a las membranas reactivo luminol más sustrato peróxido estabilizado en partes iguales (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific, Rockford) y la reacción de luminiscencia fue capturada con una cámara enfriada y acoplada capacitativamente a un diodo CCD (KODAK)

de un sistema de documentación de geles (Epichemi 3 Darkroom, UVP) con el software LabWorks 4.6 (Media Cybernetics, Inc). Este sistema permite integrar la imagen en el dispositivo de la cámara por tiempos prolongados para mejorar la sensibilidad. Aquí se utilizaron integraciones de 1 a 1200 s. asegurándose de que no haya saturación de la cámara. Para re-usar las membranas se eliminaron los anticuerpos unidos con un tratamiento con NaOH 0,5M por 10 min.

Para identificar los distintos tipos de membrana se utilizaron anticuerpos específicos para RE y MP. Como marcador de RE utilizamos anticuerpos contra la proteína PDI, la cual es una proteína luminal que participa en la formación de puentes disulfuro y como control del plegamiento correcto de proteínas recién sintetizadas (Hillson y col., 1984; Lyles y Gilbert, 1991). Utilizamos el anticuerpo anti-PDI en una dilución 1:1000 (Mouse monoclonal antibody-BD Transduction Laboratories). Como marcador de MP utilizamos anticuerpos contra la proteína constitutiva de membrana Na^+/K^+ ATPasa. Esta bomba es usada ampliamente como marcador de MP en diversos sistemas celulares y en ovocitos de *X. laevis*. (Corey y col., 1994). Utilizamos el anticuerpo anti Na^+/K^+ ATPasa en una dilución 1:200 (Mouse monoclonal antibody-Santa Cruz Biotechnology)

Para revelar anti-HA se utilizo Anti-Rat IgG (whole molecule) HRP (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) y para Anti-PDI y Anti-Na Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch).

6. Medición quimioluminiscente en ovocitos únicos.

Desarrollamos un método para medir la expresión en superficie de proteínas en ovocitos de *Xenopus laevis* con quimioluminiscencia basado en el protocolo descrito por el grupo de Jan (Zerangue y col., 1999) y otro método publicado por el grupo de trabajo (Hidalgo y col., 2006) pero en vez de utilizar un luminómetro se obtuvieron imágenes con el mismo sistema utilizado para revelar los western blot (Epichemi 3 Darkroom, UVP). Se utilizó para este protocolo el constructo con el epitopo de hemaglutinina (HA) insertado entre el lazo S5-S6 del dominio II de Cav1.2. La figura 6 describe un experimento control de este método. Entre 3-10 ovocitos fueron fijados por 15 min a 4°C en formaldehído al 4% en solución estéril ND96 (en mM: 96 NaCl, 2 KCl, 1 MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 5 HEPES, pH 7,4, esterilizada con filtros de 0,2 µm) y luego lavados tres veces con ND96 a 4°C, Esto ovocitos fijados fueron almacenados con ND96 en una placa de ELISA de 24 pocillos a 4°C. Los ovocitos fueron incubados por 1 h con solución de bloqueo 1% BSA-ND96 (usada en los siguientes pasos de incubación con anticuerpos) y luego toda la noche con una dilución 1:300 de anticuerpo monoclonal anti-HA (Roche Applied Science. Mannheim) a 4°C con agitación suave. Transcurrida la incubación los ovocitos fueron lavados tres veces por 5 min con ND96 a 4°C para luego incubarlos con anticuerpo secundario en una dilución 1:2000 anti Rat IgG (whole molecule) HRP (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) por 90 min a 4°C. Una vez lavados tres veces por cinco minutos en ND96 a 4°C fueron ordenados en una cámara

(figura 5) para la reacción de luminiscencia. Esta consiste en agregar 25 μ l en partes iguales de reactivo luminol más sustrato peróxido estabilizado (SuperSignal West Femto, Thermo Scientific, Rockford) a cada posillo. La señal quimioluminiscente fue detectada con la captura de una imagen integrada entre 1-60 s con el sistema Epichemi 3 Darkroom, (figura 6).

Como controles para reacciones inespecíficas a los anticuerpos 1° y 2° se utilizaron ovocitos sin inyectar o expresando una proteína de membrana que posee un epítopo HA expuesto hacia el lado intracelular (HA-Shaker-IR-T449F). Como control positivo para probar el método se utilizaron ovocitos inyectado con Δ N60Ca_v1.2HA cRNA luego de 5 días de cultivo. La figura 6 muestra una imagen de ovocitos representativos de cada condición experimental utilizando 5s de integración. En esta se ve que solo se detecta luminiscencia en los ovocitos inyectados con cRNA de Δ N60Ca_v1.2HA incubado con el anticuerpo primario y secundario.

7. Análisis estadístico.

Análisis estadísticos fueron desarrollados usando la prueba t de Student o análisis de varianza de una cola según sea apropiado. Diferencias estadísticas de $p < 0,05$ fueron consideradas significativas.

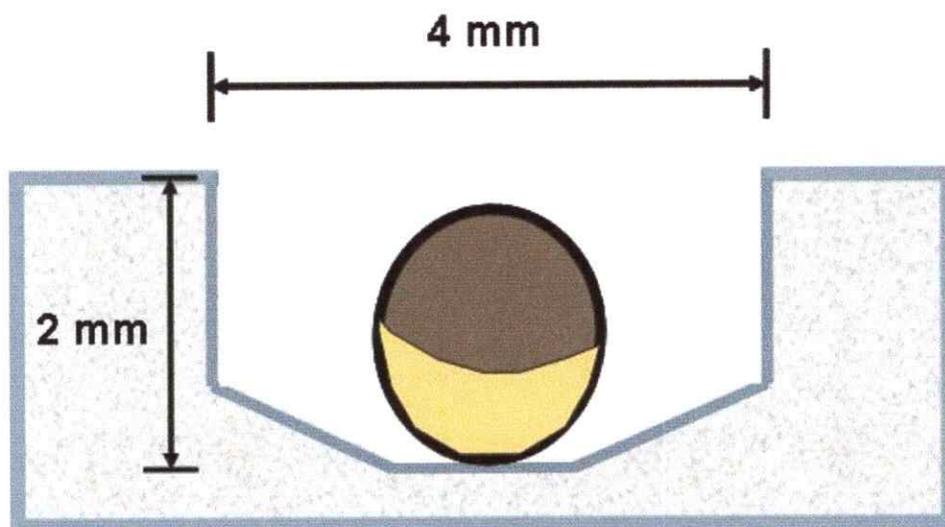


Figura 5. Cámara para la detección de quimioluminiscencia en ovocitos únicos.

Cámara de acrílico transparente con orificios de 2 mm de profundidad y 4 mm de diámetro donde se asienta el ovocito. El volumen de la cámara es de $\sim 30 \mu\text{l}$.

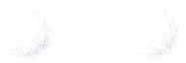
Anticuerpo Anti-HA	+	-	+
Anticuerpo Anti RAT-HRP	-	+	+
Ovocitos sin inyectar			
DN60Ca _v 1.2HA			
HA-Shaker-T449F			

Figura 6. Controles de detección de canales en la superficie de ovocitos.

Ovocitos sin inyectar, inyectados con cRNA de Shaker-IR-T449F, o con cRNA de Δ N60Ca_v1.2HA fueron tratados con anticuerpo 1^o, 2^o o ambos. Solo Δ N60Ca_v1.2HA tratado con ambos anticuerpos dio una señal. La expresión de canales también fue corroborada por electrofisiología en COVC en ovocitos del mismo lote.

RESULTADOS

1. Regulación de la inserción de $\text{Ca}_v\alpha_1$ por la subunidad β .

Estudiamos la participación de $\text{Ca}_v\beta$ en la inserción de canales en la MP utilizando la isoforma cardíaca del CCDV clonada desde corazón de conejo (Wei y col., 1991).

1.1. Efectos de la subunidad β del canal de calcio en la inserción en MP de $\text{Ca}_v1.2$.

Contamos con dos metodologías para cuantificar la cantidad de canales presentes en la superficie del ovocito. Una, que se utiliza con regularidad en el laboratorio es la medición electrofisiológica de canales en superficie, cuantificando el movimiento de cargas asociadas a la apertura del canal. Los canales de iones dependientes de voltaje, contienen sensores que se mueven en el campo eléctrico durante el arreglo de la proteína en respuesta a un cambio en el voltaje de la membrana. Este movimiento produce un desplazamiento neto de cargas que se manifiesta en corrientes capacitativas denominadas corrientes de compuerta, donde la conservación de cargas entre Q_{ON} y Q_{OFF} se mantiene (Neely y col., 1993) en registros con Co^{2+} como bloqueador de la corriente iónica. En ausencia de Co^{2+} la corriente al

final del pulso es la suma de la Q_{OFF} con la corriente de entrada de Ba^{2+} que es mayor en presencia de $Ca_v\beta$. La integral de esta corriente se corresponde con las cargas desplazadas durante una despolarización (Noceti y col., 1996). Un canal de calcio moviliza 8,6 cargas elementales durante una despolarización a +40 mV y la activación de 7×10^5 canales funcionales resulta en la transferencia de 1 pC, (Noceti y col., 1996). La técnica COVC tiene la resolución necesaria para registrar corriente capacitivas de unos pocos nA de amplitud en unas pocas decenas de milisegundo. Al integrarlas se corresponde con 10 pC de movimiento de carga de activación o Q_{ON} lo cual nos permite detectar la presencia de canales funcionales desde 7×10^6 para la superficie de membrana aislada por la técnica del COVC, que equivale a un 20% de la superficie total (1 mm^2 , diámetro de un ovocito en estado VI es de 1,3 mm). El otro método se basa en la detección por quimioluminiscencia de complejos entre CCDV y anticuerpo en ovocitos únicos. Al comparar las mediciones en los mismos ovocitos con ambos métodos encontramos una buena correlación entre Q_{ON} y la quimioluminiscencia (figura 7). El gráfico de la figura 7D muestra que existe una buena correlación entre las mediciones de Q_{ON} y la medición de quimioluminiscencia sobre el mismo ovocito. En este experimento registramos ovocitos en COVC que luego fueron fijados en formaldehído al 4% tal como se describe en "Materiales y métodos". Por otro lado el desarrollo de la técnica de detección de proteínas en

superficie nos permitió hacer un seguimiento de la incorporación de $Ca_v1.2HA$ en la condición solo o con $Ca_v\beta_{2a}$. En la figura 7C se grafican las mediciones de Q_{ON} comparadas con las mediciones de quimioluminiscencia al quinto día post-inyección. En ella podemos notar que el aumento de la expresión asociado a la co-expresión de $Ca_v\beta_{2a}$ es mayor con las mediciones de Q_{ON} , comparadas con las de quimioluminiscencia. La diferencia de Q_{ON} es, de aproximadamente 10 veces, de $24,3 \pm 7,3$ sin $Ca_v\beta_{2a}$ a $206,2 \pm 39,8$ pC con $Ca_v\beta_{2a}$ ($n=13$ y 15 , respectivamente), en tanto que solo se observa aumento de tres veces con quimioluminiscencia: de $0,29 \pm 0,01$ a $0,57 \pm 0,03$ URL/URL_{MAX} con $Ca_v\beta_{2a}$; ($n=37$ y 40 , respectivamente).

La figura 8A muestra imágenes de quimioluminiscencia de ovocitos tomadas a varios días post-inyección de cRNA $Ca_v1.2HA$ solo y co-expresándolo con el cRNA de $Ca_v\beta_{2a}$, partiendo por 1 día. La figura 8B muestra un curso temporal promedio ($n=3$) de la inserción de canales en la superficie del ovocito, de 1 a 6 días. En gráfica imagen se observa el notable aumento en la expresión de canales en superficie en presencia de $Ca_v\beta_{2a}$. Cuando los ovocitos son co-inyectados con el cRNA de $Ca_v\beta_{2a}$ la cantidad de canales que alcanza la superficie de los ovocitos después de 6 días de expresión es mayor (figura 8A y B) pero el curso temporal es similar. Es decir, el aumento no se debe a una mayor velocidad de aparición de canales en la superficie presencia de

$\text{Ca}_v\beta_{2a}$ si no que a que a una mayor cantidad disponible para la inserción.

Para discriminar que el aumento en la señal de quimioluminiscencia y en Q_{ON} en los ovocitos co-inyectados con el cRNA de $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ se debe a un aumento en la eficiencia de incorporación de canales en superficie y no a cambios en la síntesis de proteína, separamos membranas totales de ovocitos inyectados y mediante una inmunotransferencia cuantificamos la banda inmunoreactiva a HA versus el control interno de membrana $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ (figura 9). De tres experimentos independientes no obtuvimos diferencias significativas entre ambas condiciones, indicando que no hay un aumento de la proteína $\text{Ca}_v1.2\text{HA}$ cuando se co-inyecta con $\text{Ca}_v\beta_{2a}$.

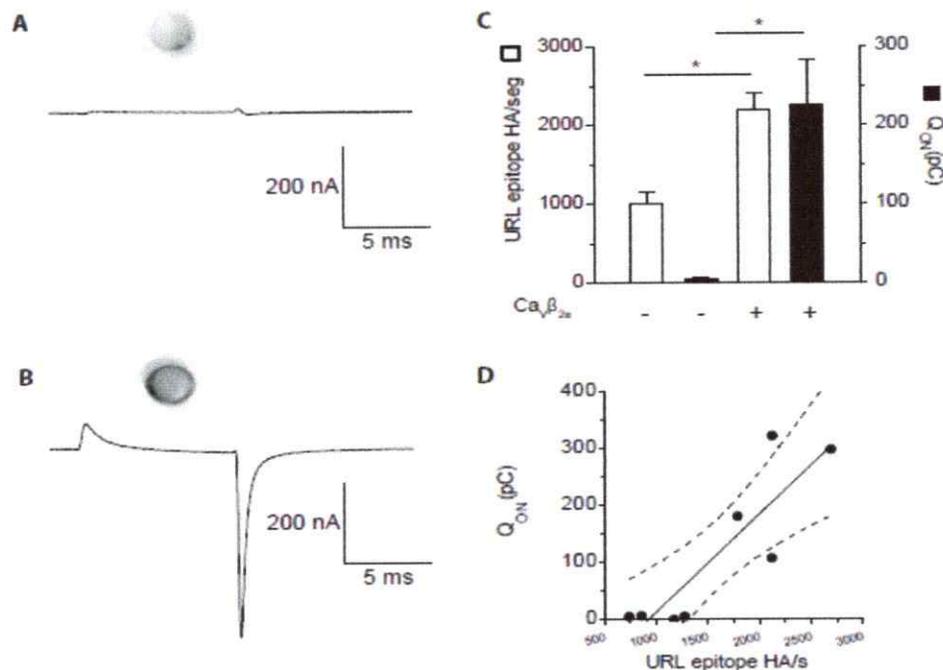


Figura 7. Correlación entre los registros de Q_{ON} en COVC y medición de canales en superficie con quimioluminiscencia.

A y B. Imagen de quimioluminiscencia de ovocito con su respectivo registro de Q_{ON}. C. Cuantificación de canales funcionales y de superficie de Ca_v1.2HA. Gráfico de barras de corrientes de compuerta Q_{ON} (pC) de ovocitos que expresan Ca_v1.2HA, con y sin Ca_vβ_{2a} al quinto día (barras negras) comparado con registros de quimioluminiscencia (URL del epitopo HA/s) (barras blancas) del mismo lote de ovocitos (t-test, * P<0.05). D. Q_{ON} versus quimioluminiscencia de ovocitos expresando Ca_v1.2HA. Se registraron en COVC ovocitos co-expresando o no Ca_vβ_{2a}. Con los mismos ovocitos se midió la quimioluminiscencia (expresado en URL epitopo HA/s) la línea continua corresponde a la regresión lineal mientras que las líneas discontinuas corresponden al 95% de confidencialidad del análisis de regresión.

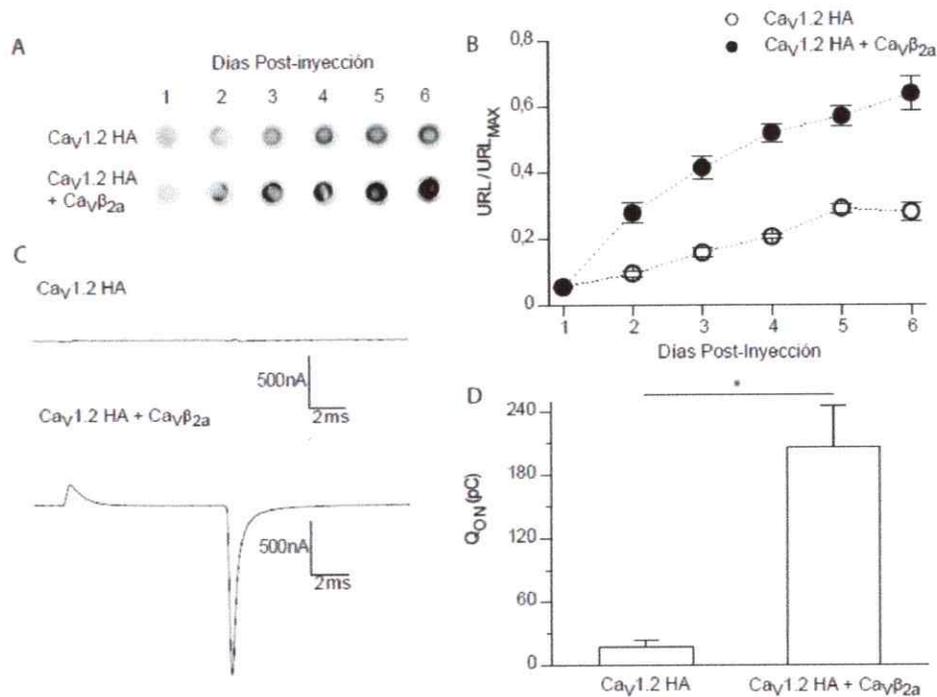


Figura 8. Ca_vβ aumenta la inserción de canales en la MP.

A. Imágenes de quimioluminiscencia de ovocitos en un curso temporal de 6 días. B. Curso temporal de la expresión de Ca_v1.2HA en la superficie de ovocitos, solo (○) o co-expresado con Ca_vβ_{2a} (●), promedio de tres experimentos independientes tomando en cada tiempo entre 3-10 ovocitos. El valor de URL/URL_{MAX} corresponde a la normalización por el valor máximo de quimioluminiscencia para cada set de experimentos. C. Registros representativos de Q_{ON} 5 días post-inyección. D. Q_{ON} de ovocitos al quinto día post-inyección de cRNA Ca_v1.2HA (n=18) o Ca_v1.2HA más Ca_vβ_{2a} (n=15) obtenidos de los mismos lotes de ovocitos de los promedios del curso temporal en B. (t-test, * P<0.05).

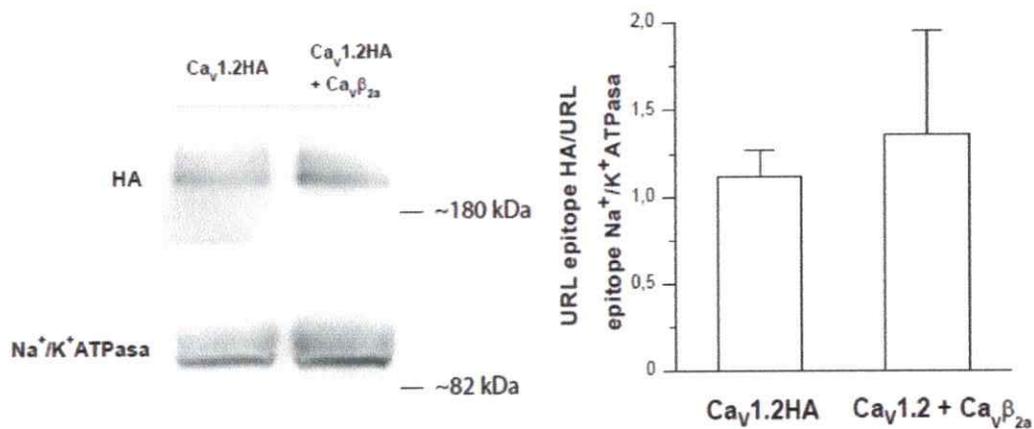


Figura 9. Co-inyección de Ca_vβ_{2a} no aumenta la expresión de proteína Ca_v1.2HA.

A la izquierda se muestra una inmunotransferencia de membranas totales de ovocitos contra el epítipo HA y contra el marcador de MP, Na⁺/K⁺ATPasa. El gráfico de barras de la derecha muestra las medias de la razón de la señal URL de epítipo HA contra URL epítipo Na⁺/K⁺ATPasa mostrando que no hay diferencias en la expresión de Ca_v1.2HA en ambas condiciones. (t-test).

1.2. Determinación del efecto de $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ en la localización subcelular de $\text{Ca}_v1.2\text{HA}$ en ovocitos de *Xenopus*.

Nuestros experimentos de quimioluminiscencia y de mediciones de movimiento de carga confirman que la incorporación de $\text{Ca}_v1.2$ a la membrana de los ovocitos aumenta con la co-expresión de $\text{Ca}_v\beta_{2a}$. Para resolver si esto se debe a una regulación del tráfico de $\text{Ca}_v1.2$ investigamos posibles diferencias en el patrón de distribución de la proteína en distintos compartimentos intracelulares utilizando fraccionamiento subcelular por sedimentación en gradientes continuos de sacarosa. La figura 10 muestra resultados de tres experimentos independientes 12, 48h y 96 h después de la inyección de cRNA. Alícuotas de las fracciones 2 a la 15 fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE), la presencia de $\text{Ca}_v1.2\text{-HA}$, y marcadores específicos de membranas del RE (disulfuro isomerasa o PDI) y membrana plasmática ($\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa) fue revelada por western blot.

La figura 10 resume la distribución de los distintos epitopos en las fracciones de los gradientes continuos de sacarosa normalizados por la señal máxima de quimioluminiscencia para cada epitopos ($\text{URL}/\text{URL}_{\text{MAX}}$).

Los perfiles de los gradientes continuos de sacarosa muestran que en presencia de $\text{Ca}_v\beta_2$ $\text{Ca}_v1.2\text{HA}$ tiende a las fracciones donde está el

marcador de MP $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$. Para cuantificar este efecto utilizamos los valores de la integral bajo cada curva del perfil de HA en la inmunotransferencia, normalizados por el tiempo de integración con el que se capturó la imagen. Con este resultado hicimos una razón respecto de la integral bajo la curva con el marcador de compartimiento de interés (PDI o $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$), ambos normalizados por sus propios tiempos de integración. La figura 11 muestra el resumen de los experimentos de fraccionamiento subcelular a 12 h (n=3), 48 h (n=3) y 96 h (n=4) para cada condición con y sin $\text{Ca}_v\beta_{2a}$. En estos se observa que en presencia de $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ a las 96 horas una gran proporción de $\text{Ca}_v1.2\text{HA}$ se ha desplazado hacia la MP, sin embargo, siempre hay presencia de la proteína en el RE.

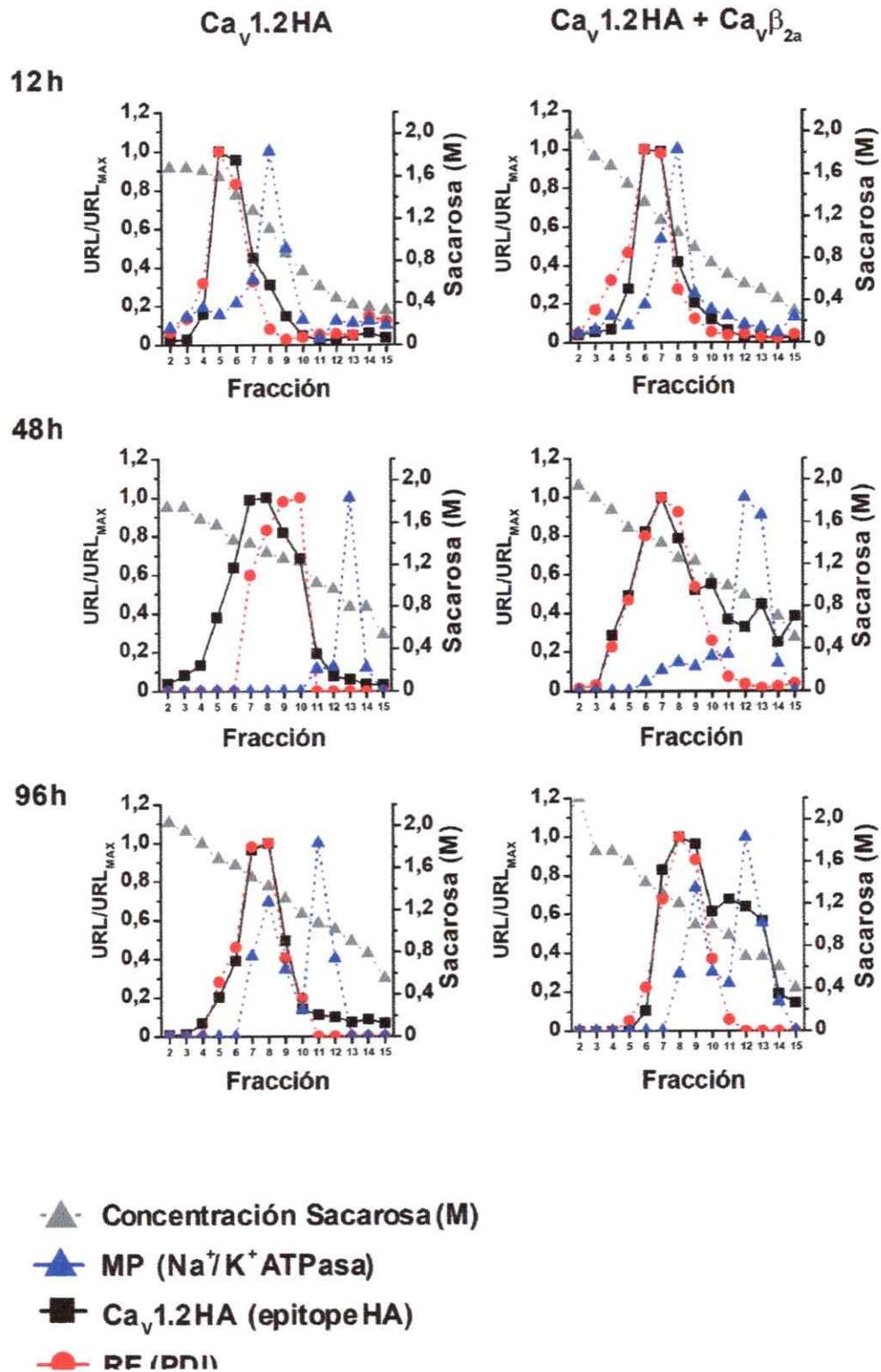


Figura 10. Efecto de $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ en la distribución de $\text{Ca}_v1.2\text{HA}$ en ovocitos de *Xenopus laevis* 12, 48 y 96 h post-inyección.

Perfiles de gradientes continuos de sacarosa (\blacktriangle , concentración molar de sacarosa) con marcadores de RE (\bullet , proteína disulfuro isomerasa, PDI), MP (\blacktriangle , proteína $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$) y de $\text{Ca}_v1.2\text{HA}$ (\bullet , epitopo HA) visualizados por inmunotransferencia y expresados como la razón entre la señal (URL) en la fracción por la señal máxima (URL_{MAX}) del epitopo. Las membranas fueron preparadas desde ovocitos inyectados con cRNA de $\text{Ca}_v1.2\text{HA}$ solo (izquierda) o con cRNA de $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ (derecha) 12, 48 o 96 horas post-inyección.

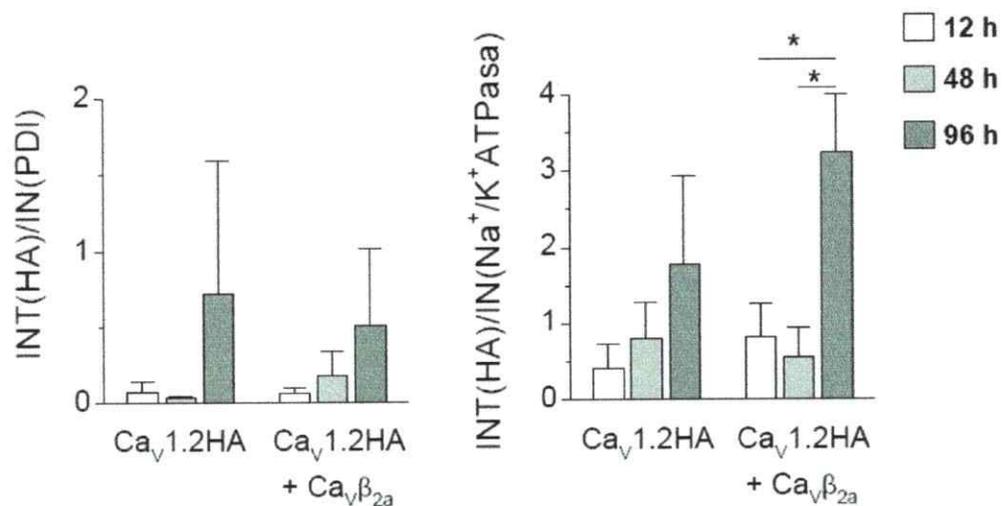


Figura 11. Ca_vβ_{2a} desplaza a Ca_v1.2HA hacia la MP.

Los gráficos fueron obtenidos a partir de inmunotransferencias dividiendo la integral de la señal quimioluminiscente HA (IOD/seg) por la del respectivo marcador de membrana (PDI o Na⁺/K⁺ATPasa) desde fraccionamientos de 12, 48 y 96 h post-inyección de cRNA de Ca_v1.2HA o co-inyectado con el cRNA de Ca_vβ_{2a}. (t-test * P<0.05).

1.3. Destrucción del sitio principal de unión de la subunidad β no impide la expresión de canales funcionales.

Estudios con isoformas neuronales del canal de calcio y utilizando células de mamíferos como sistemas de expresión (Bichet y col., 2000; McEnery y col., 1998; Cornet y col., 2002; Dalton y col., 2005) indican que la unión de la subunidad β con la secuencia AID de la subunidad α_1 es necesaria para que los canales de calcio alcancen la membrana plasmática. Para explorar si esto es válido para $\text{Ca}_v1.2$ expresado en ovocitos, se investigó el impacto de eliminar el motivo AID en la expresión de canales funcionales utilizando la medición de Q_{ON} . Consistente con la destrucción de la interacción α_1 - β en mutantes carentes del motivo AID ($\text{Ca}_v1.2(\Delta\text{AID})$), la co-expresión de $\text{Ca}_v\beta$ no altera los valores de Q_{ON} . Lo que resultó inesperado es que $\text{Ca}_v1.2(\Delta\text{AID})$ diera lugar a canales funcionales cuantificables por mediciones de Q_{ON} (figura 12). Sin embargo, los niveles de expresión son visiblemente menores a los del tipo silvestre co-expresado con $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ (Fig 8), confirmando que $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ juega un rol importante en el tráfico de $\text{Ca}_v1.2$ hacia la MP, aunque contrario a lo que se pensaba no es un requisito absoluto.

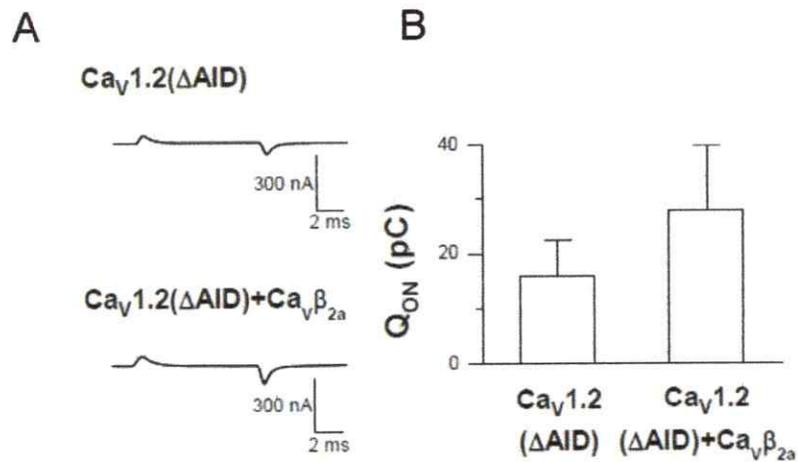


Figura 12. Delección del motivo AID suprime el efecto de $Ca_v\beta$ en la aparición de canales funcionales en la MP.

A Registros representativos de Q_{ON} de ovocitos que expresan $Ca_v1.2(\Delta AID)$ solo ($n=7$) o co-inyectado con cRNA de $Ca_v\beta_{2a}$ ($n=7$) al quinto día después de la inyección. B promedios más el error estándar de Q_{ON} (pC) en ambas condiciones. La diferencia no es significativa (t.-test, $p>0.05$)

2. Regulación en la inserción en MP de $\text{Ca}_v\alpha_1$ por el amino terminal.

Otro elemento estructural que tiene un impacto relevante sobre los niveles de expresión de $\text{Ca}_v1.2$ se encuentra en el amino terminal (NT) que se manifiesta en ovocitos de *X. laevis* (Wei y colaboradores 1996). La eliminación de los primeros 40 a 120 aminoácidos del NT de $\text{Ca}_v1.2$ se correlaciona con un aumento de hasta 6 veces en Q_{ON} al compararlo con la forma silvestre en ausencia de $\text{Ca}_v\beta$. Una posibilidad es que en estos canales truncados el requerimiento de unión a la subunidad auxiliar para su tráfico a la MP se haya relajado.

A través de mediciones de Q_{ON} y quimioluminiscencia comparamos los niveles de expresión funcional de un canal de largo completo ($\text{Ca}_v1.2\text{-HA}$) con uno que carece de los primeros 60 aminoácidos, ($\Delta\text{N60Ca}_v1.2\text{-HA}$) que incluyen el epítipo HA (Fig 13). A diferencia de $\text{Ca}_v1.2\text{-HA}$, $\Delta\text{N60Ca}_v1.2$ (Figura 13-A y B) la presencia de $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ no se correlaciona con un aumento en la expresión de canales funcionales en la MP de ovocitos. En presencia de $\text{Ca}_v\beta_{2a}$, la Q_{ON} promedio (31 ovocitos en 3 lotes) fue de $137,3 \pm 17,5$ pC, virtualmente idéntica al promedio obtenido de ovocitos no co-inyectados con la cRNA de la subunidad auxiliar ($135,4 \pm 14,5$ pC, 3 lotes, $n=27$): Estos resultados confirman publicaciones anteriores de nuestro grupo (Hidalgo y col., 2006; Neely y col., 2004). En los experimentos con $\Delta\text{N60Ca}_v1.2\text{-HA}$ (figura 13C) tampoco hay una diferencia estadísticamente significativa entre ovocitos inyectados solo con $\Delta\text{N60Ca}_v1.2\text{-HA}$ cRNA en comparación con los co-inyectados con $\text{Ca}_v\beta$ cRNA.

Dado que estos experimentos eran esencialmente confirmatorios de Hidalgo y col. (2006) solo se registraron 3 ovocitos en cada condición y en un solo lote.

2.1. Determinación del curso temporal en la inserción en MP del mutante $\Delta N60Ca_v1.2$.

Una posibilidad para explicar la pérdida aparente de la regulación en la expresión por $Ca_v\beta$ es que la eliminación de los primeros 60 aminoácidos de $Ca_v1.2$ produzca un aumento general de la velocidad del tráfico a la membrana y que al quinto día de expresión las posibles diferencias entre ovocitos con y sin $Ca_v\beta$ se reduzca. Esto es aun mayor si consideramos los resultados de nuestro grupo (Gonzalez y col., 2007) que muestran que $Ca_v\beta$ promueve la endocitosis. Para investigar esta posibilidad, se midió la expresión superficial $\Delta N60Ca_v1.2$ -HA por quimioluminiscencia a distintos tiempos después de la inyección de crRNA. La figura 13 F muestra la curva temporal de expresión donde al tercer día se llega a los niveles máximos de expresión no existiendo diferencias muy marcadas en la incorporación de canales en la superficie en presencia de $Ca_v\beta$. Si, llama la atención que al tercer día se produce un aumento abrupto en la inserción de canales en presencia de $Ca_v\beta_{2a}$ pero luego $\Delta N60Ca_v1.2$ -HA en ausencia de $Ca_v\beta_{2a}$ lo alcanza entre el cuarto y quinto día. También observamos que en presencia de $Ca_v\beta_{2a}$, la cantidad de proteínas $\Delta N60Ca_v1.2$ -HA comienza a caer, de manera que al quinto día, se iguala con la registradas en ausencia de $Ca_v\beta_{2a}$. Es claro que la eliminación de los primeros 60

aminoácidos aumentan la velocidad de inserción pero mas allá de esta aceleración en el tráfico, este es menos sensible a la $Cav\beta$ que en los canales de NT de largo completo.

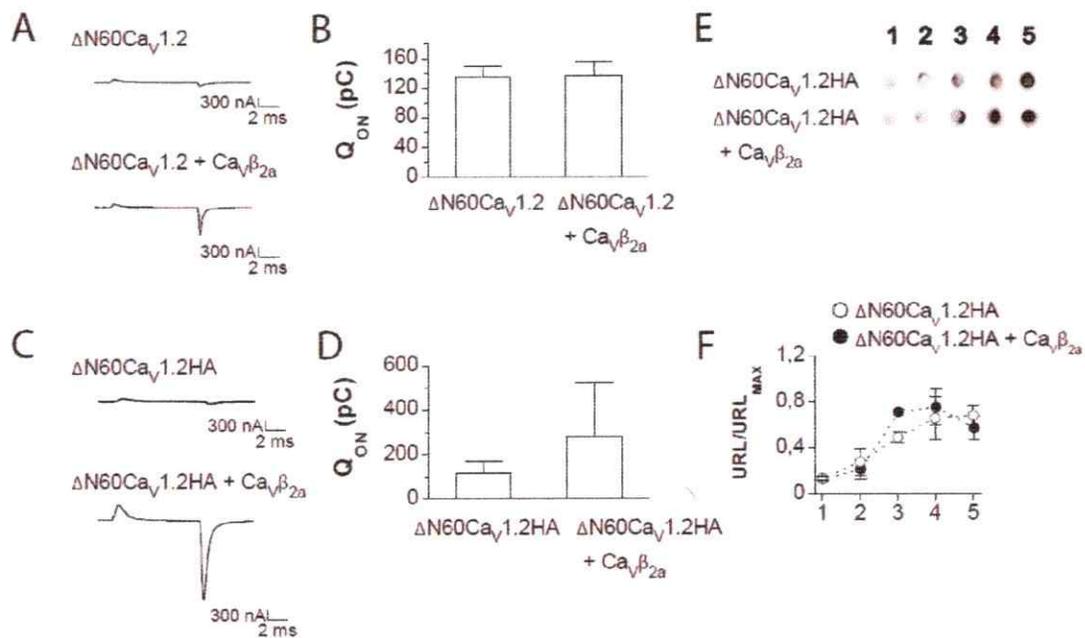


Figura 13. Eliminación de los primeros 60 aminoácidos del amino terminal de $Ca_V1.2$ no provoca cambios en la incorporación en la MP en presencia de $Ca_V\beta$.

A. Registros representativos de ovocitos que expresan $\Delta N60Ca_V1.2HA$ en ausencia o presencia de $Ca_V\beta_{2a}$. B. Promedio de las Q_{ON} de ovocitos al quinto día post-inyección de cRNA $\Delta N60Ca_V1.2HA$ (n=3) o $\Delta N60Ca_V1.2HA$ más $Ca_V\beta_{2a}$ (n=3), (t-test). C. Registros al quinto día de ovocitos en el curso temporal de la figura F junto con el gráfico de Q_{ON} (D). Media más SEM. (t-test sin diferencias significativas) E. Ovocitos representativos del curso temporal de $\Delta N60Ca_V1.2HA$ en presencia o no de $Ca_V\beta_{2a}$ graficado en F. F. Curso temporal de la expresión de $\Delta N60Ca_V1.2HA$ solo (○) o co-expresado con $Ca_V\beta_{2a}$ (●). Para cada tiempo fueron tomados entre 3 a 6 ovocitos.

2.2. Efectos de la destrucción de la interacción α_1 - β a través del AID en la inserción en la MP del mutante $\Delta N60Ca_v1.2$.

Para confirmar que la eliminación de los primeros 60 aminoácidos del NT de $Ca_v1.2$ conlleva a una pérdida de sensibilidad a $Ca_v\beta_{2a}$ en su incorporación a la MP, se hicieron experimentos con un mutante en que el triptófano de la secuencia AID (W470) crítico para la unión con $Ca_v\beta$ fue remplazado por una serina ($\Delta N60Ca_v1.2(W470S)$) (Hidalgo y col., 2006). Los registros de Q_{ON} muestran que no existen diferencias entre la condición sin $Ca_v\beta_{2a}$ ($187,1 \pm 23,0$ tres lotes de ovocitos, $n=13$) y con $Ca_v\beta_{2a}$ ($144,3 \pm 13,5$, 3 lotes de ovocitos, $n=17$) (figura 14). Además, los valores de Q_{ON} no se diferencian de los obtenidos con el mutante con el motivo AID intacto (figura 13B y D).

Tabla 1. Efectos de las deleciones del amino terminal y de los mutantes en el motivo AID sobre las corrientes de compuertas.

	Q_{ON} (pC)			
	Sin Cavβ_{2a}	(n)	Con Cavβ_{2a}	(n)
Cav1.2	9,1±2,9	(33)	140,1±26,5	(27)
Cav1.2-HA	24,3±7,3	(13)	206±39,8	(15)
Cav1.2Δ(AID)	15,9±6,6	(7)	27,8±11,9	(7)
ΔN60Cav1.2	135,4±14,5	(27)	137,3±17,5	(31)
ΔN60Cav1.2(W470S)	187,1±23,0	(13)	144,3±13,5	(17)
ΔN132Cav1.2	0,2±0,2	(14)	28,3±12,1	(16)
ΔN132Cav1.2(ΔAID)	10,3±6,5	(3)	22,2±5,9	(3)
ΔN132Cav1.2(W470S)	24,5±11,9	(7)	33,0±18,7	(8)

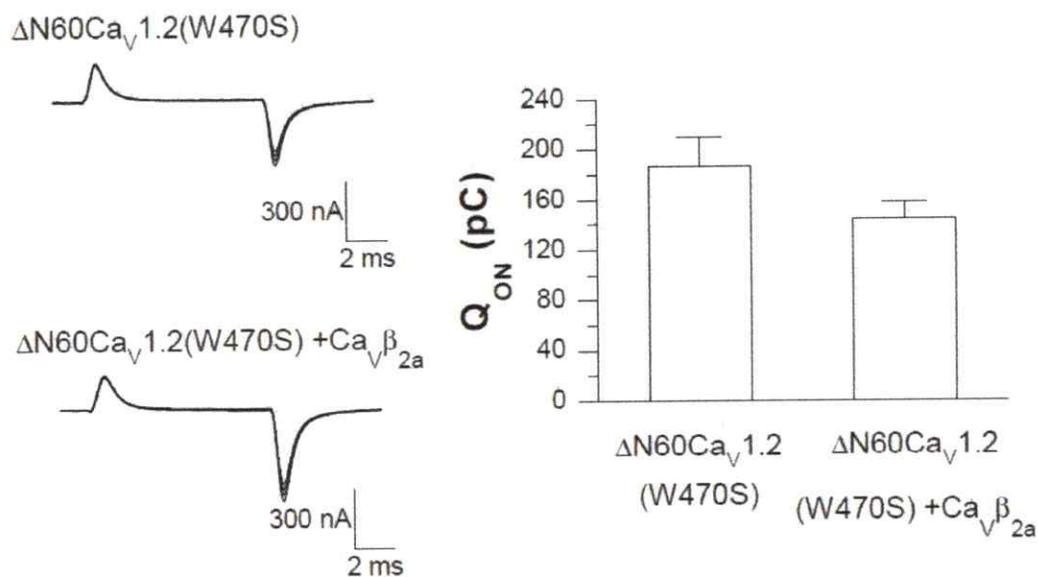


Figura 14. Eliminación de residuo crítico en la interacción con $Ca_V\beta$ no interfiere con la incorporación de canales funcionales en la MP.

Registros representativos de Q_{ON} en COVC al quinto día de ovocitos que expresan $\Delta N60Ca_V1.2(W470S)$ solo o co-inyectado con cRNA de $Ca_V\beta_{2a}$. A la derecha se muestra un grafico de los promedios de Q_{ON} en ambas condiciones no habiendo diferencias en la inserción de canales funcionales en la MP en presencia de $Ca_V\beta$ (t-test).

2.3. La eliminación de gran parte del amino terminal de $Ca_v1.2$, restaura la dependencia de $Ca_v\beta$ para la expresión de canales funcionales en la membrana plasmática.

La eliminación parcial del amino terminal en 40, 60, 80, 100 y 120 aminoácidos muestra un claro efecto de independencia de $Ca_v\beta$ para la expresión de canales funcionales expresados heterológamente en ovocitos de *X. laevis* (Wei y col 1996). Sin embargo, la eliminación de los primeros 132 aminoácidos ($\Delta N132Ca_v1.2$), de los 156 posibles que componen el NT de $Ca_v1.2$, muestran una marcada dependencia de la presencia de $Ca_v\beta_{2a}$ para en la expresión de canales funcionales. Cuando los ovocitos son inyectados con cRNA de $\Delta N132Ca_v1.2$ las corrientes de compuerta no pueden ser resueltas ($0,21 \pm 0,15$ pC, 5 lotes de ovocitos, $n=14$), mientras que cuando se co-inyecta con el cRNA de $Ca_v\beta_{2a}$, las corrientes de compuerta pueden ser claramente resueltas ($28,3 \pm 12,1$ pC, 5 lotes de ovocitos, $n=16$, figura 15). Esto sugiere que a diferencia del tipo silvestre, la presencia de $Ca_v\beta$ es un requisito absoluto para estos mutantes. Para corroborar esta hipótesis, investigamos el impacto de la destrucción de la interacción α_1 - β mutando el aminoácido triptófano en la posición 470 por serina (W470S) o eliminando la secuencia AID. Para nuestra sorpresa, tanto $\Delta N132Ca_v1.2$ (W470S) y $\Delta N132Ca_v1.2(\Delta AID)$ pueden alcanzar la MP y dar lugar a canales funcionales aunque como era de esperar los valores

de Q_{ON} no son significativamente diferentes en ovocitos co-inyectados con cRNA para $Ca_v\beta_{2a}$ (figura 16) Los registros de Q_{ON} de dos lotes de ovocitos para $\Delta N132Ca_v1.2(W470S)$ solo, fue de $24,5\pm 11,9$ pC ($n=7$) y co-expresado con $Ca_v\beta_{2a}$ $33,0\pm 18,7$ pC ($n=8$). Los registros de Q_{ON} de un lote de ovocitos para $\Delta N132Ca_v1.2(\Delta AID)$ solo, fue de $10,3\pm 6,5$ pC ($n=3$) y co-expresado con $Ca_v\beta_{2a}$ $22,2\pm 5,9$ pC ($n=3$) (Resumen de Q_{ON} en tabla 1). Esta reversión en la dependencia de $Ca_v\beta_{2a}$ nos sugiere que debe existir una unión complementaria entre $Ca_v\beta_{2a}$ y el aminoterminal que regula la incorporación y tráfico del canal hacia la MP.

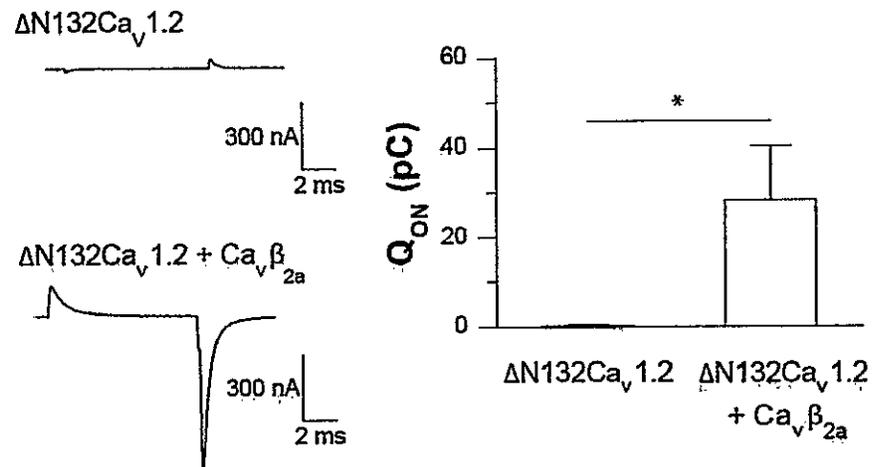


Figura 15. Eliminación de los primeros 132 aminoácidos del amino terminal de $Ca_v1.2$ vuelve al canal completamente dependiente de $Ca_v\beta_{2a}$ para su expresión en MP.

Registros de Q_{ON} representativos para $\Delta N132Ca_v1.2$ en COVC filtrados a 4kHz, solo o co-inyectado con cRNA de $Ca_v\beta_{2a}$. A la derecha se grafican las medias más el error estándar de las Q_{ON} . (t-test, * $p < 0,05$).

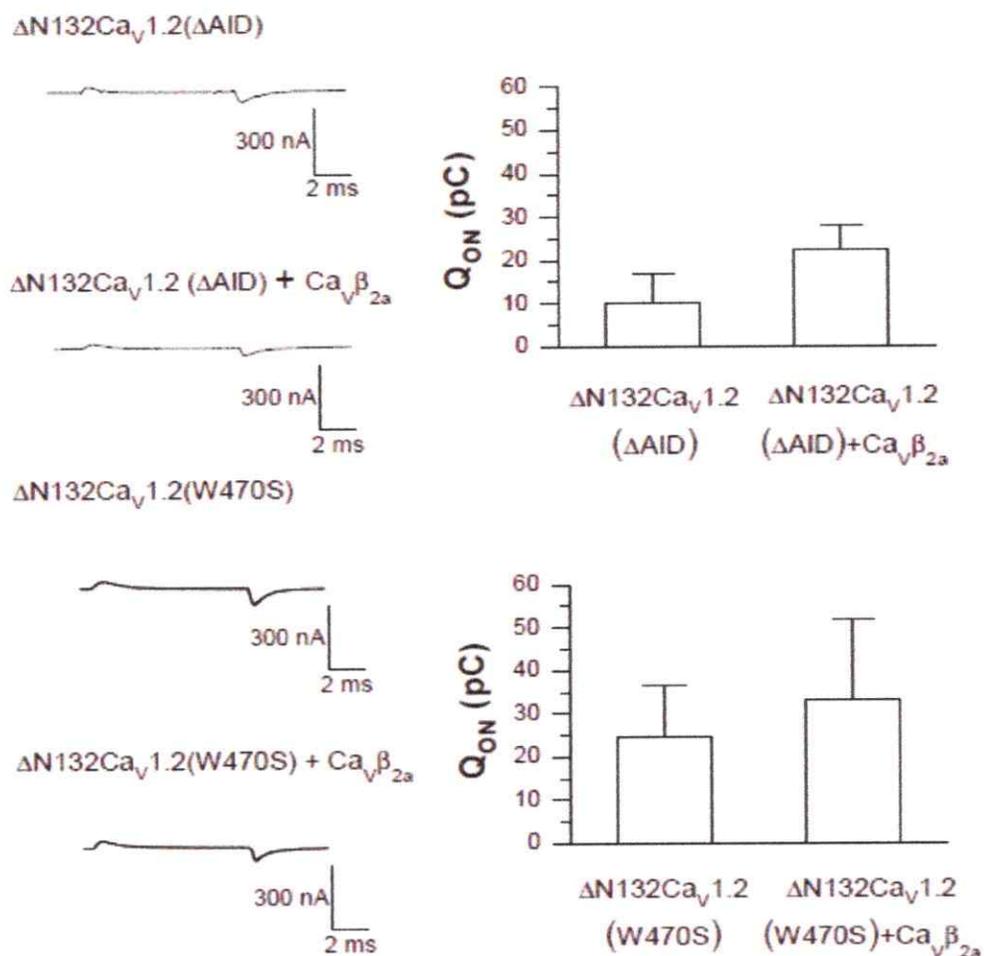


Figura 16. Eliminación de la interacción α_1 - β revierte la dependencia absoluta en la incorporación de $\Delta N132Ca_V1.2$ en la MP.

Registros de Q_{ON} representativos para $\Delta N132Ca_V1.2(W470S)$ y $\Delta N132Ca_V1.2(\Delta AID)$ obtenidos con COVC y filtrados a 4kHz, solos o en presencia de $Ca_V\beta_{2a}$. A la derecha se grafican las medias más el error estándar de las Q_{ON} . Nótese que se recupera la incorporación de canales funcionales en la MP al suprimir la interacción con $Ca_V\beta_{2a}$. (t-test)

3. Capacidad reguladora del lazo I-II.

El lazo intracelular que une los dominios I y II de $Ca_v\alpha_1$ ha sido implicado en la unión de $Ca_v\beta$ por medio del motivo AID (Pragnell y col., 1994). Dicha unión regularía la función del canal aumentando la probabilidad de encontrar al canal en un estado abierto conductor (Neely y col., 1993), y regulando su tráfico hacia la MP (Bichet y col., 2000). Si el lazo I-II participa como un dominio regulador del tráfico hacia la MP, debiera ser posible transferirlo a otra proteína de MP y que su presencia inhiba la expresión de esta nueva proteína quimera. El grupo de De Waard introdujo el lazo I-II de $Ca_v2.1$ en el carboxilo terminal del canal de potasio tipo *Shaker*, y del receptor CD8 (Bichet y col., 2000). En ambos casos la proteína quimera presenta niveles de expresión en la superficie celular muy disminuidos en comparación a la proteína parental. Nosotros quisimos probar si este efecto solo está circunscrito al lazo I-II de $Ca_v2.1$, que parecer tener una dependencia más estricta de la presencia de $Ca_v\beta$ que $Ca_v1.2$. Con esta finalidad incorporamos el lazo I-II de $Ca_v1.2$ al carboxilo terminal del canal de potasio tipo *Shaker*.

3.1. Medición de densidades de corriente de la quimera del canal de potasio tipo *Shaker* con el lazo I-II de $Ca_v1.2$.

Introducimos el lazo I-II en el carboxilo terminal del canal tipo *Shaker*, luego utilizamos la quimera para producir cRNA e inyectarlo en ovocitos de *X. laevis* y observar su expresión en superficie registrando en COVC entre el segundo y sexto día. Además, necesitábamos saber si la inyección de cRNA no estaba saturando la maquinaria de síntesis, de manera de observar sólo el efecto en la inserción de canales funcionales en la superficie. Para esto hicimos una curva con distintas diluciones de cRNA del constructo de *Shaker* (*Shaker-lazo I-II_C*). La figura 17A muestra que concentraciones de cRNA bajo los 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ están dentro del rango lineal de expresión del ovocito tanto para *Shaker* como *Shaker lazo I-II_C*. Los resultado (figura 17B) muestran que, efectivamente hay un aumento monotónico en la densidad de corriente de K^+ hasta los 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de cRNA de $Ca_v\beta_{2a}$ (figura 17B). En un principio nos llamó la atención las altas concentraciones de $Ca_v\beta_{2a}$ cRNA en las que se observó un aumento significativo, observando que el aumento máximo en la densidad de corriente solo fue de tres veces, muy por debajo de las diez veces reportadas para el lazo I-II de $Ca_v2.1$ (Bichet y col., 2000). Este efecto de tres veces en la densidad de corriente al co-inyectar $Ca_v\beta_{2a}$ no hace posible una recuperación completa en la expresión de canales funcionales en la superficie, ya que el cRNA de *Shaker* inyectado en una misma concentración expresa densidades de corriente sobre los 600 nA/nF

(figura 18A y C). Por otra parte la incorporación del lazo I-II_C al carboxilo terminal de *Shaker* no afectaría la función del canal para dar cuenta de la disminución en la densidad de corriente, ya que al comparar trazos normalizados de I_{K+} a 50 mV de *Shaker* y *Shaker-lazo I-II_C* no hay diferencias en la cinética general del canal (tau de inactivación de 2,8±0,1 y 2,8±0,1 s⁻¹, respectivamente) (figura 18B).

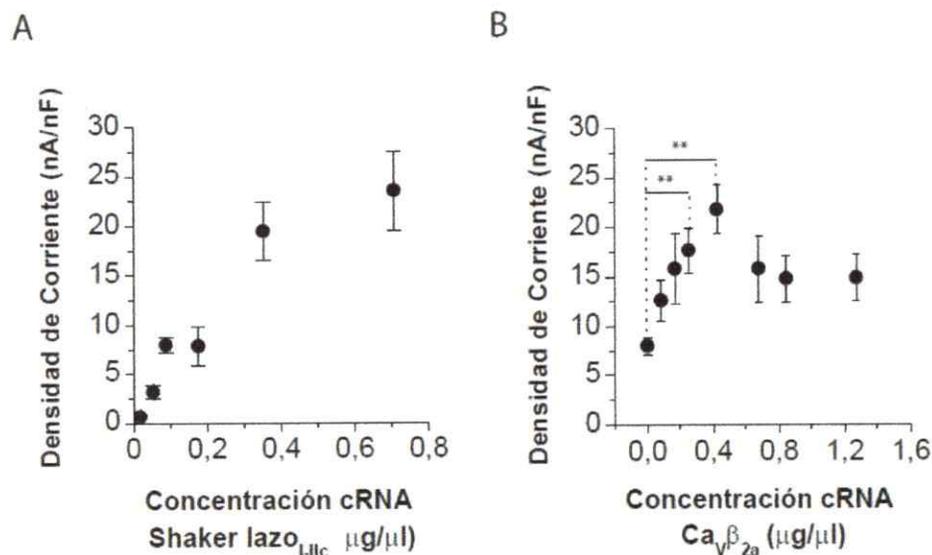


Figura 17. Curva de valoración de Ca_Vβ_{2a} sobre Shaker lazo I-II_C

A. Gráfico de expresión de densidad de corriente en ovocitos inyectados con distintas concentraciones de cRNA de Shaker lazo I-II_C registrados al tercer día en COVC. B. Gráfico de densidad de corriente obtenidos en COVC de ovocitos co-inyectados con cRNA de Shaker lazo I-II_C (0,088 µg/µl) y con distintas concentraciones de cRNA de Ca_Vβ_{2a} (0,084-1,3 µg/µl). Análisis de varianza de una cola (ANOVA) con post-prueba de comparaciones múltiples de Dunnett considerando Shaker-lazo I-II_C sin Ca_Vβ_{2a} como control (** P<0.01).

3.2. Efectos de la subunidad $Ca_v\beta_{2a}$ sobre canales no funcionalmente relacionados expresados en ovocitos de *Xenopus*.

Una observación que surgió de los experimentos anteriores fue que al co-inyectar cRNA (0,09 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) o proteína $Ca_v\beta_{2a}$ (3,6 mg/ml) sobre ovocitos que expresan *Shaker* (0,09 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) la densidad de corriente disminuye de $630\pm 116,3$ nA/nF (n=10) a $102,6\pm 19,1$ nA/nF (n=9) y $223\pm 120,9$ nA/nF (n=8), respectivamente (figura 19A y B). Este efecto sugiere que $Ca_v\beta_{2a}$ promovería la salida de canales funcionales desde la MP, la cual no depende de la síntesis de *Shaker* en presencia de $Ca_v\beta_{2a}$, debido a que inyección de la proteína $Ca_v\beta_{2a}$ produce también disminución en la densidad de corriente. Este proceso involucra a la proteína dinamina, la cual interacciona bioquímicamente con $Ca_v\beta_{2a}$, luego, reclutándola y promoviendo endocitosis de proteínas de MP (Gonzalez-Gutierrez y col., 2007).

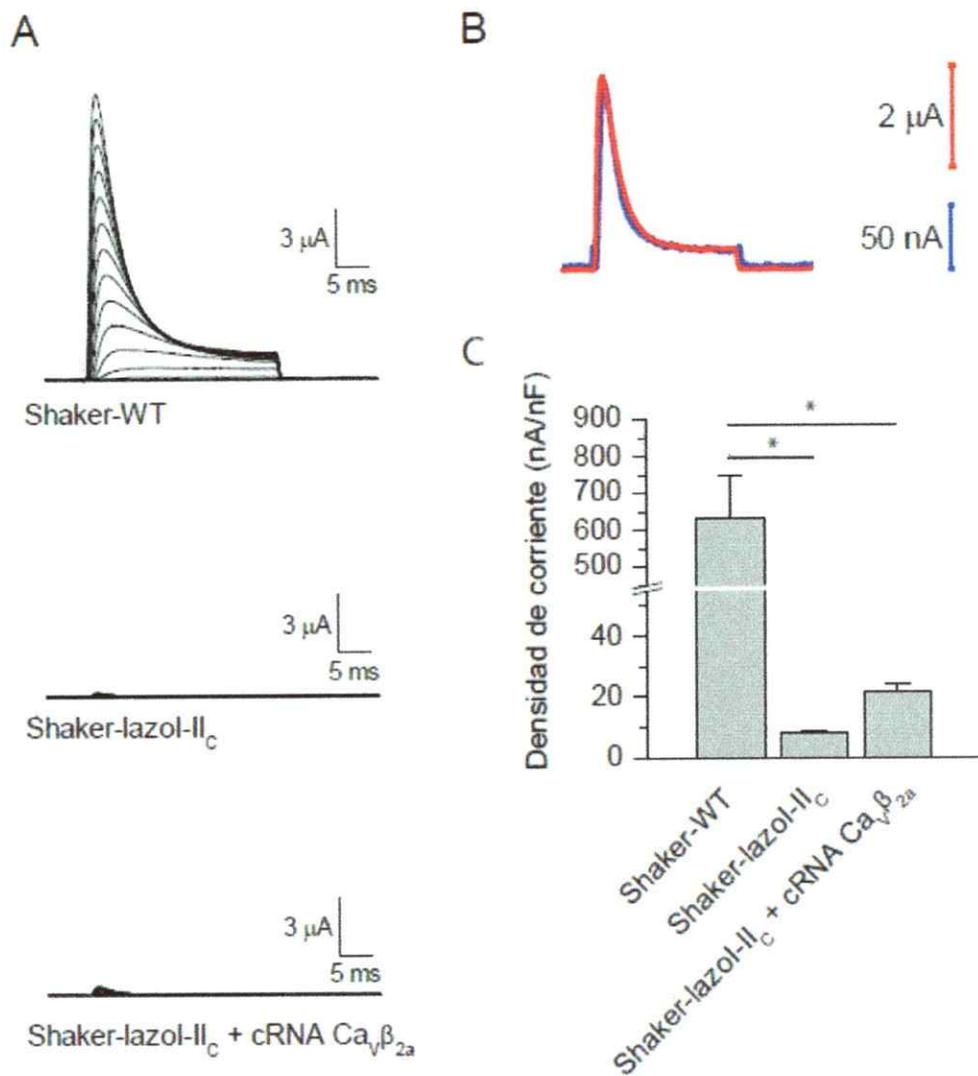


Figura 18. Incorporación del lazo I-II de Ca_v1.2 en *Shaker* impide su incorporación en la MP.

A. Registros representativos en COVC de *Shaker*, *Shaker-lazol-II_c* solo o co-inyectado con cRNA de Ca_vβ_{2a}. B. trazo superpuestos de corrientes de potasio (I_K⁺) a +50mV de *Shaker*-WT y *Shaker-lazol-II_c*. En C se grafican las medias con error estándar de la densidad de corriente (nA/nF) de ovocitos que expresan *Shaker*-WT y *Shaker-lazol-II_c* solo y co-inyectado con cRNA de Ca_vβ_{2a}, registrados a los 3 días después de ser inyectados. Los ovocitos se inyectaron con 50 nL de cRNA de *Shaker*-WT, *Shaker-lazol-II_c* (0,09 μg/μL) y Ca_vβ_{2a} (0,42 μg/μL). La densidad de corriente se obtuvo con I_K⁺ máxima a +50mV filtrada a 1kHz, con mantención de voltaje a -90mV, dividido por la capacitancia de la membrana registrada. (t-test * P<0.05).

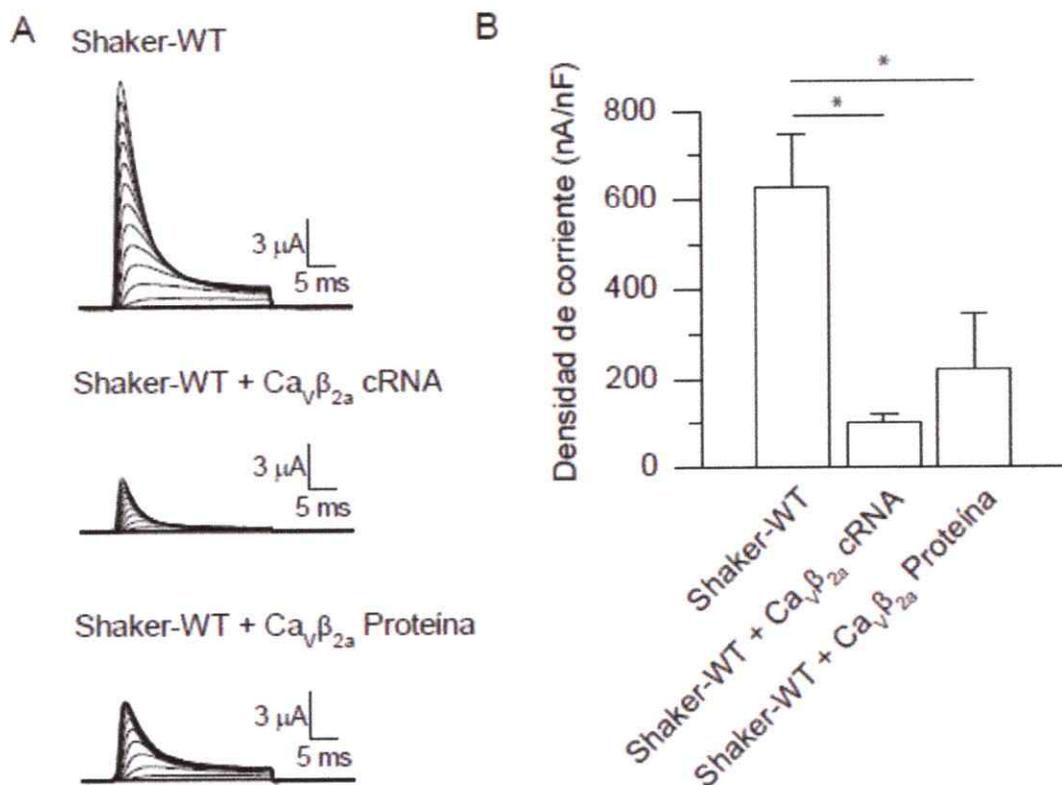


Figura 19. La subunidad β disminuye la densidad de corriente de ovocitos expresando *Shaker*.

A. Registros representativos de I_K^+ a los 3 días después de la inyección. En B se grafican las medias con error estándar de la densidad de corriente (nA/nF) de ovocitos que expresan *Shaker* solo, co-inyectados con cRNA de $Ca_v\beta_{2a}$, o inyectados con proteína $Ca_v\beta_{2a}$. Los ovocitos se inyectaron con 50 nL de cRNA de *Shaker* (0,09 μ g/ μ l) y $Ca_v\beta_{2a}$ (0,09 μ g/ μ l) y dos horas antes del registro con 50 nL de proteína $Ca_v\beta_{2a}$ (3,6 mg/ml) (t-test * $P < 0.05$).

DISCUSIÓN.

1. Determinantes de la expresión y tráfico hacia la superficie de la subunidad $Ca_v\alpha_{1C}$ de los canales de calcio dependientes de voltaje.

Los canales de calcio dependientes de voltaje tienen una gran participación en sistemas fisiológicos y mecanismos de control del ión calcio (Catterall, 2000).

La localización precisa de estos canales en la MP, así como también la disponibilidad de estos para los procesos celulares, involucran una señal local de calcio. Estas señales locales de calcio pueden pasar a ser señales globales cuando se acoplan y coordinan con mecanismos de liberación de calcio desde reservorios intracelulares.

En estas tesis exploramos el papel de varios componentes de la proteína en el tráfico y expresión en superficie. Utilizamos el sistema de expresión heteróloga de ovocitos de *X. laevis*, debido a que nos permite cuantificar la inserción de canales funcionales en la membrana plasmática mediante la técnica electrofisiológica COVC, y además es factible desarrollar técnicas bioquímicas para la detección de canales en superficie.

Nuestros resultados nos permiten distinguir al menos tres componentes que participan en la salida del canal desde el RE y su inserción en la superficie

celular del ovocito. Uno de ellos es la subunidad accesoria $\text{Ca}_v\beta$ que interacciona con $\text{Ca}_v\alpha$ por medio de un dominio, AID, en el lazo que une los dominios I y II. Muchos estudios apoyan la idea de que $\text{Ca}_v\beta$ promovería la salida de $\text{Ca}_v\alpha$ desde el RE al unirse a AID. Nosotros presentamos tres resultados independientes que indican que este rescate por $\text{Ca}_v\beta$ parece no ser una condición necesaria para la llegada de $\text{Ca}_v1.2$ a la MP. i, La subunidad $\text{Ca}_v1.2$ se expresa en ausencia de $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ (Fig 7C y D); ii Aún después de varios días post-inyección con $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ una fracción importante de $\text{Ca}_v1.2$ -HA reside en el RE (Fig 9 y 10) iii La eliminación del motivo AID no impide la expresión de canales funcionales en la MP (figura 11).

Otro determinante de la inserción de canales en la superficie es el amino terminal (NT). Varias isoformas de $\text{Ca}_v1.2$ varían en la longitud del NT. La isoforma de largo completo se expresa en músculo cardíaco, liso y células endocrinas, a diferencia de una isoforma de NT más corto que se expresa principalmente en el tejido cerebral (Soldatov, 1994; Schultz y col., 1993). La subunidad $\text{Ca}_v1.2$ con amino terminal completo aumenta su incorporación en la MP (figura 7A) con la presencia de la subunidad $\text{Ca}_v\beta_{2a}$, (figura 7B) en tanto que el mutante al cual se le eliminaron los primeros 60 aminoácidos del NT ($\Delta\text{N60Ca}_v\alpha_{1C}$), se expresa de manera similar con y sin $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ (figura 11E y F). Esta pérdida de regulación por $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ apunta a que los primeros aminoácidos (1-39), del NT participarían como elementos inhibitorios de la incorporación en la MP, o bien que los aminoácidos entre el 40 y el 120 del NT promoverían la independencia de $\text{Ca}_v\beta_{2a}$. Esto último se confirmaría si eliminásemos más

aminoácidos del amino NT. Para esto utilizamos el mutante que carece de los primeros 132 aminoácidos, observando que la dependencia de la subunidad $Ca_v\beta_{2a}$ se recupera (figura 15). Estos resultados, nos permiten especular que los primeros 39 aminoácidos del NT participarían inhibiendo la interacción de elementos estructurales entre los aminoácidos desde el 40 hasta el 120 con una estructura complementaria dentro de la proteína u otra que interactúe con ella.

La abolición de la interacción α - β solo afecta a la subunidad $Ca_v1.2$ de largo completo. Sin embargo el eliminar esta interacción no impide la salida de $Ca_v1.2$ - Δ AID de RE ya que se observa incorporación a la MP, independiente de la presencia de $Ca_v\beta_{2a}$. El mutante Δ N60 $Ca_v1.2$, por su parte, mantiene su independencia de $Ca_v\beta_{2a}$ al mutar la secuencia AID (Δ N60 $Ca_v1.2$ (W470S)), (Fig 14). Esto sugiere que existen elementos estructurales que participan en la regulación del tráfico del canal que actúan en concierto con $Ca_v\beta_{2a}$, así mutantes del amino terminal no sólo se expresan más sino que de manera independientes de la interacción con la subunidad auxiliar. Sin embargo, removiendo una fracción mayor del NT, como en el mutante Δ N132 $Ca_v1.2$ revierte el fenotipo a una dependencia absoluta en la incorporación de canales funcionales en la superficie, sugiriendo la participación de elementos adicionales dentro de la subunidad $Ca_v1.2$ que promoverían o reprimirían la expresión de estos canales en la MP (Figura 15). Estos elementos son sensibles a la composición del AID, ya que Δ N132 $Ca_v1.2$ (W470S) y Δ N132 $Ca_v1.2$ (Δ AID) se incorporan a la MP (Figura 16). Esto sugiere que los

determinantes del NT interactúan con señales de retención en el lazo I-II. Este es uno de los principales argumentos para indicar que son necesarios varios elementos en el tráfico e incorporación de canales en la MP. Así, el lazo I-II sería uno de los elementos que regulan la incorporación de canales en la MP y su impacto es sensible al largo del NT.

Aquí intentamos aislar el rol del lazo I-II incorporándolo a otra proteína de membrana como el canal de potasio tipo *Shaker*. Pudimos confirmar que hay una inhibición de la expresión que se puede revertir con $Ca_v\beta_{2a}$ (figura 17). Sin embargo, la co-expresión de $Ca_v\beta_{2a}$ no es capaz de recuperar la densidad de corriente del canal silvestre confirmando que otros elementos son necesarios para restituir el tráfico e incorporación en MP. Ya sabemos que uno de los elementos de regulación de la densidad de canales en la superficie es el incremento en endocitosis inducido por la interacción de $Ca_v\beta_{2a}$ libre con Dinamina (Gonzalez-Gutierrez y col., 2007). Es razonable pensar que en los experimento con *Shaker* lazo I-II_C compiten dos procesos mediados por $Ca_v\beta_{2a}$: 1) Promover la salida del canal desde el ER por oclusión de señales de retención codificadas en el lazo I-II y 2) Aumento en la velocidad de endocitosis por la presencia de $Ca_v\beta_{2a}$ libre. Esto explicaría la forma acampanada de la relación densidad de corriente *Shaker* lazo I-II_C y la cantidad de cRNA de $Ca_v\beta_{2a}$ inyectado (Fig 17b).

Recientemente, encontramos que en la secuencia del lazo I-II existe una región conservada entre los distintos subtipos de canales de Ca^{2+} . Esta secuencia

corresponde a 8 aminoácidos, los cuales al eliminarla sobre el mutante $\Delta N60Ca_v1.2$ (el cual se incorpora normalmente en la MP en ausencia de $Ca_v\beta$) suprime la expresión de canales funcionales (Q_{ON}) en la MP. Es necesario corroborar estos resultados con mediciones con quimioluminiscencia, y además determinar en que compartimiento intracelular son retenidos estos mutantes (si es que este fuera el mecanismo). Si la eliminación de esta secuencia de 8 aminoácidos suprime la expresión de canales en la MP en $Ca_v1.2$ en ausencia de $Ca_v\beta$, y si además los mutantes de lazo I-II de nuestros distintos constructos, ya sea ΔAID y $W470S$, no aparecieran en la MP sería un indicio de la existencia de una región reguladora del tráfico de canales hacia la MP distintas de las ya nombradas y además se podría relacionar con la secuencia complementaria planteada en el desarrollo de esta tesis.

2. Papel del amino terminal en la función y tráfico del canal de calcio tipo L.

Se ha descrito que el amino terminal en canales calcio tipo L posee varios roles funcionales. El grupo de Dascal postula un módulo inhibitorio del amino terminal formado por los primeros 46 aminoácidos (Kanevsky y Dascal 2006), ya que la delección de los primeros 46 aminoácidos se correlaciona con un aumento en las corrientes macroscópicas en tanto que los niveles de proteínas en la membrana era comparable al de la forma larga. Dado que la corriente macroscópica generada por un tipo de canal de iones es función de la

probabilidad de encontrar al canal en una configuración abierta o conductora (P_o), la corriente unitaria del canal y el número de canales funcionales en la MP (N), este resultado se puede explicar por un aumento en la P_o . Nuestro grupo de trabajo, reportó que la eliminación de 40 a 120 aminoácidos del NT produce un incremento de Q_{ON} que se correlaciona con un aumento en N (Wei y col., 1996). La raíz de la discrepancia podría estar en que las técnicas bioquímicas miden proteínas presentes en la membrana en tanto que la medición de Q_{ON} mide proteínas funcionales.

El NT presenta sitios de interacción a calmodulina que junto a los sitios EF-hand e IQ (dominio Isoleucina-Glutamina) del carboxilo terminal participarían en la inactivación dependiente de Ca^{2+} del canal (CDI). La presencia de estos tipos de interacción en las colas del canal (NT y CT) promovería dos tipos de interacción funcional de la Ca^{+2} -calmodulina confiriendo selectividad espacial a la respuesta de Ca^{2+} (Dick y col., 2008). Ca^{2+} -calmodulina por su parte puede regular el tráfico de los CCDV en neuronas de hipocampo (Wang y col., 2007), e independiente de $Ca_v\beta$ en células Cos1 (Ravindran y col., 2008), facilitando en este último caso la apertura del canal.

Se ha descrito también que $Ca_v\beta$ podría disminuir la movilidad del amino terminal facilitando la respuesta del canal a la apertura dependiente de voltaje (Kobrinisky y col 2005). Estudios en células COS-1 con una isoforma neuronal de $Ca_v1.2$ que carece de los primeros 77 aminoácidos (α_{1C-77}) nos muestra que la movilidad del amino terminal es un factor importante para la inserción de canales en la MP (Kobrinisky et al 2005), ya que al incorporar en el amino

terminal un dominio de homología a pleckstrina (PH, dominio de la fosfolipasa C δ 1 el cual interacciona con PIP $_2$) aumenta la destinación hacia la MP de esta quimera, en ausencia de la subunidad Ca $v\beta$. Sin embargo, el canal permanece en un estado "silente" o no funcional, ya que no se registró actividad eléctrica del mismo. La idea de que el amino terminal de la subunidad Ca $v\alpha_1$ interaccione con otras proteínas que permitan su "inmovilización" se puede interpolar con los resultados en el mutante Δ N60Ca v 1.2HA, el cual posee un amino terminal más corto y con una menor capacidad de interacción con el resto de la proteína, por lo que tendría una menor movilidad, lo cual, puede favorecer su aparición en la MP en ausencia de Ca $v\beta$. No obstante, al eliminar 132 aminoácidos del NT (Δ N132Ca v 1.2HA) el canal se vuelve muy sensible a Ca $v\beta$ en su incorporación a la MP, por tanto asignándole al NT un rol más dinámico, en el sentido de que también se puede requerir para otras funciones en el tráfico e incluso en el correcto plegamiento de la proteína, ya que su expresión en MP es pobre relacionada al canal de tipo silvestre con Ca $v\beta$ (figura 15).

3. Diferencias entre la medición electrofisiológica y quimioluminiscente.

En esta tesis abordamos la inserción de canales en la MP con dos técnicas. Con la técnica de COVC podemos medir canales funcionales en la MP mediante las corrientes de compuerta Q_{ON} . La otra técnica fue la que desarrollamos durante esta tesis que es la medición quimioluminiscente de canales en superficie. Aparentemente el efecto de $Ca_v\beta$ sobre la expresión de $Ca_v1.2$ es mayor en las mediciones de Q_{ON} que por quimioluminiscencia pero este sería fácil de explicar por la mayor sensibilidad del método de quimioluminiscencia. Es posible obtener una señal quimioluminiscente en un ovocito donde la Q_{ON} no es cuantificable (Figura 6D). Esta discrepancia no puede explicarse por quimioluminiscencia de fondo ya que controles con anticuerpos primarios y secundarios no dan señal (figura 5). Otra explicación posible puede ser la existencia de canales "silentes" que no podrían ser detectados electrofisiológicamente como parece ser el caso de un mutante de $Ca_v2.1$ el cual es el gen responsable de un tipo de migraña hemipléjica familiar con aura descrito por Barret y colaboradores. En este mutante la treonina en la posición 666 (en el lazo extracelular entre los segmentos S5 y S6 del dominio II) es sustituida por una metionina con graves consecuencias en las corrientes macroscópicas de estos tipos de canales que son claves en la transmisión sináptica (Piedras-Renteria y col., 2004). Esta mutación es además única en que las corrientes de compuerta son reducidas sin cambios en la cinética y

dependencia de voltaje, y en sus niveles de expresión, o tráfico hacia la MP. Estos resultados sugieren que la disminución en la entrada de calcio no es debido a una reducción en el número de canales si no que a la presencia canales en la MP silentes (Barrett y col., 2005).

4. Cav β participa en el tráfico de Cav1.2.

Los estudios con fraccionamiento subcelular en ovocitos nos muestran que Cav β promueve el desplazamiento de Cav1.2 hacia la MP. Sin embargo, estos experimentos también nos muestran que una fracción preponderante permanece retenida en el RE 4 días luego de la inyección de cRNA. Estos experimentos también nos muestran que en ausencia de Cav β exógena una fracción medible migra de RE a MP (Figuras 9 y 10). Estas observaciones son consistentes con las curvas de curso de temporal de la llegada de Cav1.2-HA a la MP medida por quimioluminiscencia (Figura 8), Estos resultados permiten concluir que si bien Cav β facilita la salida de Cav1.2HA del RE este no es un requisito absoluto como lo sugirieron los experimentos de Pragnell y colaboradores (Pragnell y col., 1994). La otra lección de estos experimentos es que una gran proporción de proteínas permanece "retenida" en el RE. Este efecto puede ser debido a que existe saturación en el tráfico en nuestro sistema de expresión, impidiendo la completa salida de las proteínas neo-sintetizadas hacia la MP. Otra alternativa es que pueden existir otros compartimentos como vesículas endocíticas o lisosómicas que están co-migrando con el RE. Esto

podría ser diferenciado con anticuerpos específicos para dichos compartimientos.

Una de las preguntas que surge de la participación de $Ca_v\beta$ en el tráfico del canal es si ésta permanece unida al canal a lo largo de todo el tráfico hacia la MP. Algunas investigaciones apuntan a que solo una $Ca_v\beta$ es capaz de reconstituir las propiedades del tráfico del canal (Dalton et al 2005), sin embargo, ha sido bien documentado que el intercambio entre $Ca_v\beta$ s es posible y que dicha reversibilidad genera competencia por un sitio único entre $Ca_v\beta$ (Hidalgo et al 2006).

5. $Ca_v\beta$ participa en la endocitosis de proteínas de membrana.

Durante el desarrollo de la tesis notamos que $Ca_v\beta$ puede promover la endocitosis de proteínas de membrana. Este efecto es visible en la disminución en la densidad de corriente en canales tipo *Shaker* al co-expresarlo con cRNA de $Ca_v\beta$ como también inyectándole la proteína recombinante. Este efecto de $Ca_v\beta$ estaría asociado a la interacción con dinamina, reclutándola por medio de su dominio SH3 (Gonzalez-Gutierrez y col., 2007). El efecto de $Ca_v\beta$ sobre la disponibilidad de proteínas abre nuevos caminos a explorar, uno de ellos sería reconocer el tipo de proteínas que interaccionan con $Ca_v\alpha_1$ durante el tráfico hacia la MP, y como se regula la disponibilidad de estos canales en la MP. En la

subunidad $Ca_v1.2$ la eliminación del motivo de interacción AID (Δ AID) no elimina la incorporación de canales funcionales en ausencia de $Ca_v\beta$ (figura 12), mientras que cuando se co-expresa con $Ca_v\beta$ la Q_{on} disminuye notoriamente sugiriendo que el exceso de $Ca_v\beta$ promovería la endocitosis de estos canales. Este efecto también fue documentado por Gonzalez-Gutierrez y colaboradores (Gonzalez-Gutierrez y col., 2007) donde el mutante Δ N60 $Ca_v1.2(\Delta$ AID) disminuye sus niveles en la superficie en presencia de $Ca_v\beta$.

Otro mecanismo para sacar canales funcionales desde la MP es el descrito por Bannister y colaboradores (Bannister y col., 2008). En este artículo los autores exploran la participación de Rem, un miembro de la familia RGK (Rem2, Rad, Gem/Kir) de proteínas monoméricas de unión a GTP relacionadas con Ras que inhiben a los canales de calcio HVA por medio de la interacción con $Ca_v\beta$ (Bèguin et al 2001, 2005a, 2005b, 2006, 2007; Finlin et al 2003, 2005, 2006; Sasaki et al 2005). Los sitios de unión con $Ca_v\beta$ (en el dominio guanilato kinasa) son distintos a los sitios de unión de $Ca_v\alpha_1$ (Finlin et al 2006, Bèguin et al 2007). Los mecanismos de esta inhibición aún no son claros. Algunas evidencias apuntan a la disminución del número total de proteínas en la MP (Bèguin et al 2001, 2005a, 2005b, 2006, 2007; Sasaki et al 2005), mientras que otros resultados no muestran diferencias de expresión (Finlin et al 2005, 2006; Chen et al 2005). Sin embargo, Rem2 afecta las cinéticas de apertura de la compuerta de canales $Ca_v1.2$ expresados heterológicamente en ovocitos de *Xenopus laevis* (Seu and Pitt, 2006) y son capaces de disminuir el acoplamiento

excitación-contracción en el músculo esquelético como consecuencia de la reducción del número de canales funcionales de calcio tipo L en la MP (Bannister et al 2008). La presencia de una isoforma endógena de la subunidad β (β_{3XO}) en el ovocito de *Xenopus laevis* (Tareilus et al 1997) nos permitiría sugerir un mecanismo donde la formación de un complejo α_1 - β -Rem daría cuenta de canales no funcionales y que en el caso de la co-inyección con la subunidad β esta secuestraría a Rem permitiendo la formación del complejo α_1 - β . Sin embargo, no tenemos certeza de la presencia de este tipo de proteínas Rem en el ovocito siendo importante a futuro detectar con que tipo de proteínas interacciona $Ca_v\alpha_1$ incorporada en la MP en nuestro sistema de expresión.

CONCLUSIONES.

Nuestros resultados corroboran que $\text{Ca}_v\beta$ es un importante regulador del tráfico del canal hacia la MP, promoviendo su salida desde el RE. Los resultados con los mutantes de amino terminal y el lazo I-II nos llevan a plantear que esta regulación no es estricta y que existe complementación entre los determinantes del lazo I-II para la unión de $\text{Ca}_v\beta$ y elementos estructurales contenidos en el amino-terminal. El modelo contempla la presencia de tres factores reguladores del tráfico del canal. El amino terminal, el lazo I-II con el AID y una señal de retención hipotética, y $\text{Ca}_v\beta$.

La dependencia de $\text{Ca}_v\beta$ para la incorporación de canales en la MP se hace estricta solo con la eliminación de gran parte del amino terminal ($\Delta\text{N132Ca}_v1.2$) pero esa se relaja con la destrucción del sitio AID.

Los resultados con la quimera de *Shaker* confirman que el lazo I-II contiene determinantes que afectan la incorporación de proteínas en la MP y que estos son contrarrestados con la unión de $\text{Ca}_v\beta$ pero este efecto es solo parcial. Un factor limitante es que $\text{Ca}_v\beta$ además promueve la endocitosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bannister, R.A., Colecraft, H.M., Beam, K.G. 2008. Rem inhibits skeletal muscle EC coupling by reducing the number of functional L-type Ca^{2+} channels. *Biophys. J.* 94:2631-2638.
2. Barrett, C.F., Cao, Y.Q., Tsien, R.W. 2005. Gating deficiency in a familial hemiplegic migraine type 1 mutant P/Q-type calcium channel. *J. Biol. Chem.* 280:24064-24071.
3. Beguin, P., Mahalakshmi, R.N., Nagashima, K., Cher, D.H., Ikeda, H., Yamada, Y., Seino, Y., Hunziker, W. 2006. Nuclear sequestration of beta-subunits by Rad and Rem is controlled by 14-3-3 and calmodulin and reveals a novel mechanism for Ca^{2+} channel regulation. *J. Mol. Biol.* 355:34-46.
4. Beguin, P., Mahalakshmi, R.N., Nagashima, K., Cher, D.H., Kuwamura, N., Yamada, Y., Seino, Y., Hunziker, W. 2005a. Roles of 14-3-3 and calmodulin binding in subcellular localization and function of the small G-protein Rem2. *Biochem. J.* 390:67-75.
5. Beguin, P., R.N. Mahalakshmi, K. Nagashima, D.H. Cher, A. Takahashi, Y. Yamada, Y. Seino, and W. Hunziker. 2005b. 14-3-3 and calmodulin control

- subcellular distribution of Kir/Gem and its regulation of cell shape and calcium channel activity. *J. Cell Sci.* 118:1923-1934.
6. Beguin, P., K. Nagashima, T. Gono, T. Shibasaki, K. Takahashi, Y. Kashima, N. Ozaki, K. Geering, T. Iwanaga, and S. Seino. 2001. Regulation of Ca^{2+} channel expression at the cell surface by the small G-protein kir/Gem. *Nature* 411:701-706.
 7. Beguin, P., Y. J. Ng, C. Krause, R. N. Mahalakshmi, M. Y. Ng, and W. Hunziker. 2007. RGK small GTP-binding proteins interact with the nucleotide kinase domain of Ca^{2+} -channel beta-subunits via an uncommon effector binding domain. *J. Biol. Chem.* 282:11509-11520.
 8. Beique, J. C. and R. Andrade. 2003. PSD-95 regulates synaptic transmission and plasticity in rat cerebral cortex. *J. Physiol* 546:859-867.
 9. Beique, J. C., D. T. Lin, M. G. Kang, H. Aizawa, K. Takamiya, and R. L. Huganir. 2006. Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:19535-19540.
 10. Berrou, L., H. Klein, G. Bernatchez, and L. Parent. 2002. A specific tryptophan in the I-II linker is a key determinant of beta-subunit binding and modulation in $\text{Ca}_v2.3$ calcium channels. *Biophys. J* 83:1429-1442.
 11. Berson, J. F., D. W. Frank, P. A. Calvo, B. M. Bieler, and M. S. Marks. 2000. A common temperature-sensitive allelic form of human tyrosinase is retained

- in the endoplasmic reticulum at the nonpermissive temperature. *J. Biol. Chem.* 275:12281-12289.
12. Bichet, D., V. Cornet, S. Geib, E. Carrier, S. Volsen, T. Hoshi, Y. Mori, and M. De Waard. 2000. The I-II loop of the Ca^{2+} channel α_1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25:177-190.
13. Canti, C., Y. Bogdanov, and A.C. Dolphin. 2000. Interaction between G proteins and accessory subunits in the regulation of 1B calcium channels in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 527 Pt 3:419-432.
14. Canti, C., M. Nieto-Rostro, I. Foucault, F. Hebllich, J. Wratten, M.W. Richards, J. Hendrich, L. Douglas, K.M. Page, A. Davies, and A.C. Dolphin. 2005. The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of $\alpha_2\delta$ subunits is key to trafficking voltage-gated Ca^{2+} channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:11230-11235.
15. Catterall, W.A. 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:521-555.
16. Chen, L., D.M. Chetkovich, R.S. Petralia, N.T. Sweeney, Y. Kawasaki, R.J. Wenthold, D.S. Brecht, and R.A. Nicoll. 2000. Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature* 408:936-943.

17. Chen, Y.H., M.H.Li, Y.Zhang, L.L.He, Y.Yamada, A.Fitzmaurice, Y.Shen, H.Zhang, L.Tong, and J.Yang. 2004. Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Nature* 429:675-680.
18. Corey, J.L., N.Davidson, H.A.Lester, N.Brecha, and M.W.Quick. 1994a. Protein kinase C modulates the activity of a cloned gamma-aminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus* oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter. *J. Biol. Chem.* 269:14759-14767.
19. Cornet, V., D.Bichet, G.Sandoz, I.Marty, J.Brocard, E.Bourinet, Y.Mori, M.Villaz, and M.De Waard. 2002. Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum. *Eur. J. Neurosci.* 16:883-895.
20. Dakoji, S., S.Tomita, S.Karimzadegan, R.A.Nicoll, and D.S.Bredt. 2003. Interaction of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins with multiple membrane associated guanylate kinases. *Neuropharmacology* 45:849-856.
21. Dalton, S., S.X.Takahashi, J.Miriyala, and H.M.Colecraft. 2005. A single Ca_vβ can reconstitute both trafficking and macroscopic conductance of voltage-dependent calcium channels. *J. Physiol* 567:757-769.

22. De Waard, M., V.E. Scott, M. Pragnell, and K.P. Campbell. 1996. Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca^{2+} channels. *FEBS Lett.* 380:272-276.
23. Derkach, V.A., M.C. Oh, E.S. Guire, and T.R. Soderling. 2007. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:101-113.
24. Deutsch, C. 2003. The birth of a channel. *Neuron* 40:265-276.
25. Dick, I.E., M.R. Tadross, H. Liang, L.H. Tay, W. Yang, and D.T. Yue. 2008. A modular switch for spatial Ca^{2+} selectivity in the calmodulin regulation of Ca_v channels. *Nature* 451:830-834.
26. Dolphin, A.C. 2003a. Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg. Biomembr.* 35:599-620.
27. Dolphin, A.C. 2003b. G protein modulation of voltage-gated calcium channels. *Pharmacol. Rev.* 55:607-627.
28. Dunlap, K., J.I. Luebke, and T.J. Turner. 1995. Exocytotic Ca^{2+} channels in mammalian central neurons. *Trends Neurosci.* 18:89-98.
29. Elias, G.M., L. Funke, V. Stein, S.G. Grant, D.S. Bredt, and R.A. Nicoll. 2006. Synapse-specific and developmentally regulated targeting of AMPA receptors by a family of MAGUK scaffolding proteins. *Neuron* 52:307-320.

31. Ellgaard, L. and A. Helenius. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:181-191.
32. Elsner, H.A., H.H. Honck, F. Willmann, H.J. Kreienkamp, and F. Iglauer. 2000. Poor quality of oocytes from *Xenopus laevis* used in laboratory experiments: prevention by use of antiseptic surgical technique and antibiotic supplementation. *Comp Med.* 50:206-211.
33. Ertel, E.A., K.P. Campbell, M.M. Harpold, F. Hofmann, Y. Mori, E. Perez-Reyes, A. Schwartz, T.P. Snutch, T. Tanabe, L. Birnbaumer, R.W. Tsien, and W.A. Catterall. 2000. Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 25:533-535.
34. Finlin, B.S., R.N. Correll, C. Pang, S.M. Crump, J. Satin, and D.A. Andres. 2006. Analysis of the complex between Ca²⁺ channel beta-subunit and the Rem GTPase. *J. Biol. Chem.* 281:23557-23566.
35. Finlin, B.S., S.M. Crump, J. Satin, and D.A. Andres. 2003. Regulation of voltage-gated calcium channel activity by the Rem and Rad GTPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:14469-14474.
36. Finlin, B.S., A.L. Mosley, S.M. Crump, R.N. Correll, S. Ozcan, J. Satin, and D.A. Andres. 2005. Regulation of L-type Ca²⁺ channel activity and insulin secretion by the Rem2 GTPase. *J. Biol. Chem.* 280:41864-41871.

37. Funke, L., S. Dakoji, and D.S. Bredt. 2005. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu. Rev. Biochem.* 74:219-245.
38. Giebisch, G. 1998. Renal potassium transport: mechanisms and regulation. *Am. J. Physiol* 274:F817-F833.
39. Goldstein, S.A. and C. Miller. 1993. Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K⁺ channel. *Biophys. J.* 65:1613-1619.
40. Gomez-Ospina, N., F. Tsuruta, O. Barreto-Chang, L. Hu, and R. Dolmetsch. 2006. The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca_v1.2 encodes a transcription factor. *Cell* 127:591-606.
41. Gonzalez-Gutierrez, G., E. Miranda-Laferte, A. Neely, and P. Hidalgo. 2007. The Src homology 3 domain of the beta-subunit of voltage-gated calcium channels promotes endocytosis via dynamin interaction. *J. Biol. Chem.* 282:2156-2162.
42. Grunwald, M.E. and J.M. Kaplan. 2003. Mutations in the ligand-binding and pore domains control exit of glutamate receptors from the endoplasmic reticulum in *C. elegans*. *Neuropharmacology* 45:768-776.
43. Hidalgo, P., G. Gonzalez-Gutierrez, J. Garcia-Olivares, and A. Neely. 2006. The alpha1-beta-subunit interaction that modulates calcium channel activity

- is reversible and requires a competent alpha-interaction domain. *J. Biol. Chem.* 281:24104-24110.
44. Hillson, D.A., N. Lambert, and R.B. Freedman. 1984. Formation and isomerization of disulfide bonds in proteins: protein disulfide-isomerase. *Methods Enzymol.* 107:281-294.
45. Jacob, T.C., S.J. Moss, and R. Jurd. 2008. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat. Rev. Neurosci.* 9:331-343.
46. Jarvis, S.E., J.M. Magga, A.M. Beedle, J.E. Braun, and G.W. Zamponi. 2000. G protein modulation of N-type calcium channels is facilitated by physical interactions between syntaxin 1A and Gbetagamma. *J. Biol. Chem.* 275:6388-6394.
47. Jarvis, S.E. and G.W. Zamponi. 2005. Masters or slaves? Vesicle release machinery and the regulation of presynaptic calcium channels. *Cell Calcium* 37:483-488.
48. Jarvis, S.E. and G.W. Zamponi. 2007. Trafficking and regulation of neuronal voltage-gated calcium channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19:474-482.

49. Kamp, M.A., A. Krieger, M. Henry, J. Hescheler, M. Weiergraber, and T. Schneider. 2005. Presynaptic 'Ca_v2.3-containing' E-type Ca channels share dual roles during neurotransmitter release. *Eur. J. Neurosci.* 21:1617-1625.
50. Kamsteeg, E.J. and P.M. Deen. 2001. Detection of aquaporin-2 in the plasma membranes of oocytes: a novel isolation method with improved yield and purity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282:683-690.
51. Kobrinsky, E., S. Tiwari, V.A. Maltsev, J.B. Harry, E. Lakatta, D.R. Abernethy, and N.M. Soldatov. 2005. Differential role of the alpha1C subunit tails in regulation of the Ca_v1.2 channel by membrane potential, beta subunits, and Ca²⁺ ions. *J. Biol. Chem.* 280:12474-12485.
52. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
53. Lau, C.G. and R.S. Zukin. 2007. NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8:413-426.
54. Leonoudakis, D., L.R. Conti, C.M. Radeke, L.M. McGuire, and C.A. Vandenberg. 2004. A multiprotein trafficking complex composed of SAP97, CASK, Veli, and Mint1 is associated with inward rectifier Kir2 potassium channels. *J. Biol. Chem.* 279:19051-19063.

55. Lyles, M.M. and H.F. Gilbert. 1991. Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer. *Biochem.* 30:613-619.
56. Ma, D., N. Zerangue, Y.F. Lin, A. Collins, M. Yu, Y.N. Jan, and L.Y. Jan. 2001. Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 291:316-319.
57. Manganas, L.N., Q. Wang, R.H. Scannevin, D.E. Antonucci, K.J. Rhodes, and J.S. Trimmer. 2001. Identification of a trafficking determinant localized to the Kv1 potassium channel pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98:14055-14059.
58. Margeta-Mitrovic, M., Y.N. Jan, and L.Y. Jan. 2000. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27:97-106.
59. Maximov, A. and I. Bezprozvanny. 2002. Synaptic targeting of N-type calcium channels in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 22:6939-6952.
60. McEnery, M.W., T.D. Copeland, and C.L. Vance. 1998. Altered expression and assembly of N-type calcium channel alpha1B and beta subunits in epileptic lethargic (lh/lh) mouse. *J. Biol. Chem.* 273:21435-21438.
61. Mochida, S., R.E. Westenbroek, C.T. Yokoyama, H. Zhong, S.J. Myers, T. Scheuer, K. Itoh, and W.A. Catterall. 2003. Requirement for the synaptic

- protein interaction site for reconstitution of synaptic transmission by P/Q-type calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:2819-2824.
62. Neely,A., J.Garcia-Olivares, S.Voswinkel, H.Horstkott, and P.Hidalgo. 2004. Folding of active calcium channel beta(1b) -subunit by size-exclusion chromatography and its role on channel function. *J Biol. Chem.* 279:21689-21694.
63. Neely,A., X.Weï, R.Olcese, L.Birnbaumer, and E.Stefani. 1993. Potentiation by the β subunit of the ratio of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel. *Science* 262:575-578.
64. Noceti,F., P.Baldelli, X.Weï, N.Qin, L.Toro, L.Birnbaumer, and E.Stefani. 1996. Effective gating charges per channel in voltage-dependent K^+ and Ca^{2+} channels. *J Gen. Physiol* 108:143-155.
- 65.O'Kelly,I., M.H.Butler, N.Zilberberg, and S.A.Goldstein. 2002. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111:577-588.
66. Olcese,R., N.Qin, T.Schneider, A.Neely, X.Weï, E.Stefani, and L.Birnbaumer. 1994. The amino terminus of a calcium channel beta subunit sets rates of channel inactivation independently of the subunit's effect on activation. *Neuron* 13:1433-1438.

67. Opatowsky, Y., C.C.Chen, K.P.Campbell, and J.A.Hirsch. 2004. Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain. *Neuron* 42:387-399.
68. Ormond, S.J., N.P.Barrera, O.S.Qureshi, R.M.Henderson, J.M.Edwardson, and R.D.Murrell-Lagnado. 2006. An uncharged region within the N terminus of the P2X6 receptor inhibits its assembly and exit from the endoplasmic reticulum. *Mol. Pharmacol.* 69:1692-1700.
69. Page, K.M., F.Heblich, A.Davies, A.J.Butcher, J.Leroy, F.Bertaso, W.S.Pratt, and A.C.Dolphin. 2004. Dominant-negative calcium channel suppression by truncated constructs involves a kinase implicated in the unfolded protein response. *J. Neurosci.* 24:5400-5409.
70. Phartiyal, P., H.Sale, E.M.Jones, and G.A.Robertson. 2008. Endoplasmic reticulum retention and rescue by heteromeric assembly regulate human ERG 1a/1b surface channel composition. *J. Biol. Chem.* 283:3702-3707.
71. Piedras-Renteria, E.S., J.L.Pyle, M.Diehn, L.L.Glickfeld, N.C.Harata, Y.Gao, E.T.Kavalali, P.O.Brown, and R.W.Tsien. 2004. Presynaptic homeostasis at CNS nerve terminals compensates for lack of a key Ca^{2+} entry pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:3609-3614.

72. Plata, C., J. Escamilla, E. Carrillo, J.M. Galindo, G. Gamba, M.C. Garcia, and J.A. Sanchez. 2004. AKAP79 increases the functional expression of skeletal muscle Ca^{2+} channels in *Xenopus* oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316:189-194.
73. Pragnell, M., M. De Waard, M. Mori, T. Tanabe, T.P. Snutch, and K.P. Campbell. 1994. Calcium channel β -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the α_1 -subunit. *Nature* 368:67-70.
74. Priel, A., A. Koleker, G. Ayalon, M. Gillor, P. Osten, and Y. Stern-Bach. 2005. Stargazin reduces desensitization and slows deactivation of the AMPA-type glutamate receptors. *J. Neurosci.* 25:2682-2686.
75. Puckerin, A., L. Liu, N. Permaul, P. Carman, J. Lee, and M.A. Diverse-Pierluissi. 2006. Arrestin is required for agonist-induced trafficking of voltage-dependent calcium channels. *J. Biol. Chem.* 281:31131-31141.
76. Ravindran, A., Q.Z. Lao, J.B. Harry, P. Abrahimi, E. Kobrinsky, and N.M. Soldatov. 2008. Calmodulin-dependent gating of $Ca_v1.2$ calcium channels in the absence of $Ca_v\beta$ subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:8154-8159.
77. Reid, C.A., J.M. Bekkers, and J.D. Clements. 2003. Presynaptic Ca^{2+} channels: a functional patchwork. *Trends Neurosci.* 26:683-687.

78. Ruiz-Canada, C., Y.H.Koh, V.Budnik, and F.J.Tejedor. 2002. DLG differentially localizes Shaker K⁺-channels in the central nervous system and retina of *Drosophila*. *J. Neurochem.* 82:1490-1501.
79. Sambrook, J., E.F.Fritsch, and T.Maniatis. 1989. Molecular Cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
80. Sanford, J., J.Codina, and L.Birnbaumer. 1991. gamma-subunit of G-Proteins, but not their α - or β -subunits, are polyisoprenylated. *J. Biol. Chem.* 266:9570-9579.
81. Schultz, D., G.Mikala, A.Yatani, D.B.Engle, D.E.Iles, B.Segers, R.J.Sinke, D.O.Weghuis, U.Klockner, and M.Wakamori. 1993. Cloning, chromosomal localization, and functional expression of the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6228-6232.
82. Scott, D.B., T.A.Blanpied, G.T.Swanson, C.Zhang, and M.D.Ehlers. 2001. An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J. Neurosci.* 21:3063-3072.
83. Seu, L. and G.S.Pitt. 2006. Dose-dependent and isoform-specific modulation of Ca²⁺ channels by RGK GTPases. *J. Gen. Physiol* 128:605-613.
84. Sheng, M. and M.Wyszynski. 1997. Ion channel targeting in neurons. *Bioessays* 19:847-853.

85. Shistik, E., T. Ivanina, T. Puri, M. Hosey, and N. Dascal. 1995. Ca^{2+} current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J. Physiol* 489 (Pt 1):55-62.
86. Singer, D., M. Biel, I. Lotan, V. Flockerzi, F. Hofmann, and N. Dascal. 1991. The roles of the subunits in the function of the calcium channel. *Science* 253:1553-1557.
87. Soldatov, N.M. 1994. Genomic structure of human L-type Ca^{2+} channel. *Genomics* 22:77-87.
88. Standley, S., K.W. Roche, J. McCallum, N. Sans, and R.J. Wenthold. 2000. PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28:887-898.
89. Stornaiuolo, M., L.V. Lotti, N. Borgese, M.R. Torrisi, G. Mottola, G. Martire, and S. Bonatti. 2003. KDEL and KKXX retrieval signals appended to the same reporter protein determine different trafficking between endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* 14:889-902.
90. Tagliatela, M., L. Toro, and E. Stefani. 1992. Novel voltage clamp to record small, fast currents from ion channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Biophys. J* 61:78-82.

91. Tareilus, E., M. Roux, N. Qin, R. Olcese, J. Zhou, E. Stefani, and L. Birnbaumer. 1997. A *Xenopus* oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:1703-1708.
92. Tomita, S., H. Adesnik, M. Sekiguchi, W. Zhang, K. Wada, J. R. Howe, R. A. Nicoll, and D. S. Bredt. 2005. Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature* 435:1052-1058.
93. Tsien, R. W., D. Lipscombe, D. V. Madison, K. R. Bley, and A. P. Fox. 1988. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *TINS* 11:431-438.
94. Van Petegem, F., K. A. Clark, F. C. Chatelain, and D. L. Minor, Jr. 2004. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature* 429:671-675.
95. Wang, H. G., M. S. George, J. Kim, C. Wang, and G. S. Pitt. 2007. Ca^{2+} /calmodulin regulates trafficking of $Ca_v1.2$ Ca^{2+} channels in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 27:9086-9093.
96. Wei, X., A. Neely, R. Olcese, W. Lang, E. Stefani, and L. Birnbaumer. 1996. Increase in Ca^{2+} channel expression by deletions at the amino terminus of the cardiac alpha 1C subunit. *Receptors. Channels.* 4:205-215.

97. Wei, X.Y., E. Perez Reyes, A.E. Lacerda, G. Schuster, A.M. Brown, and L. Birnbaumer. 1991. Heterologous regulation of the cardiac Ca^{2+} channel alpha 1 subunit by skeletal muscle beta and gamma subunits. Implications for the structure of cardiac L-type Ca^{2+} channels. *J. Biol. Chem.* 266:21943-21947.
98. Weick, J.P., R.D. Groth, A.L. Isaksen, and P.G. Mermelstein. 2003. Interactions with PDZ proteins are required for L-type calcium channels to activate cAMP response element-binding protein-dependent gene expression. *J. Neurosci.* 23:3446-3456.
99. Wittemann, S., M.D. Mark, J. Rettig, and S. Herlitze. 2000. Synaptic localization and presynaptic function of calcium channel beta 4-subunits in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 275:37807-37814.
100. Yamaguchi, H., M. Okuda, G. Mikala, K. Fukasawa, and G. Varadi. 2000. Cloning of the beta(2a) subunit of the voltage-dependent calcium channel from human heart: cooperative effect of alpha(2)/delta and beta(2a) on the membrane expression of the alpha(1C) subunit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267:156-163.
101. Yasuda, T., L. Chen, W. Barr, J.E. McRory, R.J. Lewis, D.J. Adams, and G.W. Zamponi. 2004. Auxiliary subunit regulation of high-voltage activated calcium channels expressed in mammalian cells. *Eur. J. Neurosci.* 20:1-13.

102. Zarei, M.M., M.Eghbali, A.Alioua, M.Song, H.G.Knaus, E.Stefani, and L.Toro. 2004. An endoplasmic reticulum trafficking signal prevents surface expression of a voltage- and Ca^{2+} -activated K^+ channel splice variant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:10072-10077.
103. Zerangue, N., B.Schwappach, Y.N.Jan, and L.Y.Jan. 1999b. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22:537-548.
104. Zhang, H., A.Maximov, Y.Fu, E.Xu, T.S.Tang, T.Tkatch, D.J.Surmeier, and I.Bezprozvanny. 2005. Association of CaV1.3 L-type calcium channels with Shank. *J. Neurosci.* 25:1037-1049.
105. Zuzarte, M., S.Rinne, G.Schlichthorl, A.Schubert, J.Daut, and R.Preisig-Müller. 2007. A di-acidic sequence motif enhances the surface expression of the potassium channel TASK-3. *Traffic.* 8:1093-1100.