



FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN  
BIOLOGÍA O QUÍMICA

ROL DE RESIDUOS ÁCIDOS EN LA SELECTIVIDAD A CALCIO  
DE LOS CANALES CaV1.2

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN II PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADA EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA

DANIELA ANDREA DE GIORGIS OLIVA

DIRECTOR  
ALAN NEELY DELGUEIL

Valparaíso, Chile

2013

*Bienaventurado el hombre que  
Halla la sabiduría,  
Y que obtiene la inteligencia;  
Porque su ganancia es mejor que  
La ganancia de la plata,  
Y sus frutos más que el oro fino.*

Prov. 3:13-14

## **Agradecimientos**

En primer lugar me gustaría agradecerle a mi tutor Alan Neely, por su buena disposición, apoyo y constancia. También me gustaría darle gracias al profesor Ramón Latorre, ya que fue en su laboratorio donde conocí la electrofisiología y porque me inspiro a seguirla. Al profesor Patricio Orio, por su simpatía, apoyo, y rigurosidad. A Nieves Navarro y Gustavo Contreras, quienes me recibieron en este laboratorio y me apoyaron día a día. Al laboratorio Galvani, en especial a Hans Moldenhauer, Willy Carrasquel y Luisa Soto, por sus buenos consejos. A Nacho Díaz y Gaspar Herrera por su simpatía. Al laboratorio de Neurociencia computacional en especial a Danilo Pezo, por su amistad y sabios consejos.

A mi familia, Anita, Germán, Renata y Franco porque los amo con locura y son mi pilar día a día. A mi amigo Esra y a su hermosa familia, por su amor y amistad incondicional. A Niko y Manu, ellos saben porque. A diana y Romina, mis amigas y apoyo fundamental en mis años de licenciatura. A “los Pinto”, tío Betho, tía Arcy, Chris, Ale, Agus, Hector, Kimy y alvaro, quienes considero como parte de mi familia. A la persona más especial que he conocido y amado Jorge Torres.

A todos ustedes muchas gracias!

## I Índice

I Índice	4
II Resumen	5
III Marco Teórico	6
1. Propiedades dinámicas de los canales de Calcio	9
2. La teoría versus lo experimental	9
3. Modelo de dos sitios	11
4. Modelo molecular por homología Na <sub>v</sub> Ab-Ca <sub>v</sub> 1.2	12
IV Hipótesis y Objetivos	14
1. Hipótesis	14
2. Objetivo general	14
2.1. Objetivos específicos	14
V Estrategia experimental y métodos	15
1. Preparación de mutantes	15
2. Cultivo de bacterias	16
3. Transformación de bacterias	16
4. Obtención y purificación de DNA plasmidial	17
5. Transcripción in vitro	17
6. <i>Xenopus laevis</i>	17
7. Aislamiento y mantención de ovocitos de <i>Xenopus</i>	18
8. Expresión heteróloga de proteínas en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	18
9. Cut-open voltaje clamp	19
10. Soluciones y protocolos de registro	20
11. Análisis de corrientes de cola	21
VI Resultados	22
1. Selectividad iónica, Permeabilidades relativas	22
2. Corrientes instantáneas y Razones de Conductancias	26
VII Discusión	29
VIII Conclusión	30

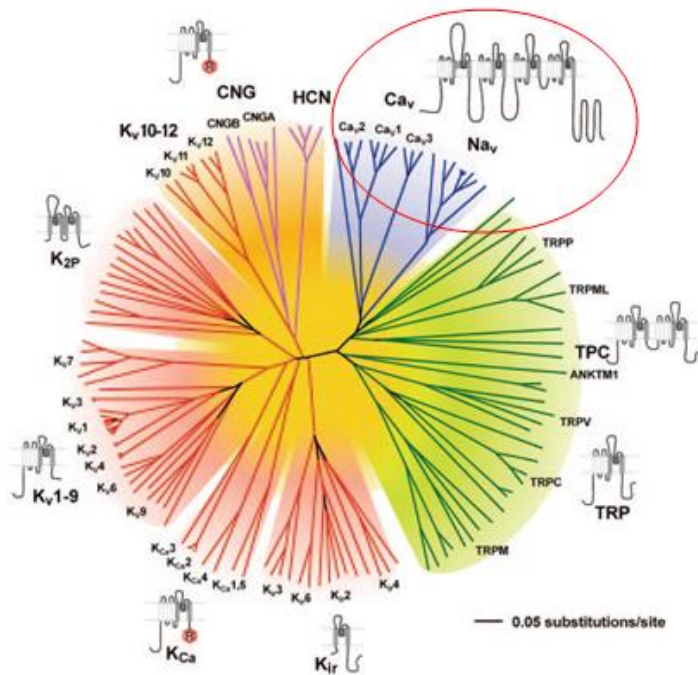
## I Resumen

El calcio es un segundo mensajero clave para muchas respuestas celulares y los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  activados por voltaje ( $\text{Ca}_v$ ), son su principal vía de entrada a la célula. Los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  muestran una alta selectividad a  $\text{Ca}^{+2}$  que se atribuye a un sitio de alta afinidad ubicado en el poro. Sin embargo, este sitio de unión genera una paradoja, dado que con una constante de disociación ( $K_D$ ) de  $10^{-6}$  M su velocidad de salida máxima teórica son  $10^3$  iones por segundo, sin embargo el flujo de calcio es de cerca  $10^6$  iones por segundo. ¿Cómo puede pasar el Ca 1000 veces más rápido que lo que predice la afinidad del canal? Se ha sugerido que más de un calcio ocupa el canal y que la repulsión electrostática facilita el paso de iones a través del canal. Por otra parte solo se ha identificado un solo sitio de unión de alta afinidad que involucra cuatro residuos glutamatos conservados en posiciones equivalentes en la región del poro. Estudios realizados en esta estructura, demostraron que cada uno de estos glutamatos contribuye a la unión a  $\text{Ca}^{+2}$ . Modelos moleculares desarrollados en nuestro grupo revelaron la existencia de otro grupo de aminoácidos ácidos, ubicado hacia la cara externa del poro, y que por tanto podrían participar en la formación de un segundo sitio de unión de  $\text{Ca}^{+2}$ . Nuestra propuesta tiene como objetivo evaluar el rol de este segundo grupo de residuos acídicos en la selectividad y conducción de los canales de calcio y tratar de resolver la paradoja de la alta afinidad y conducción.

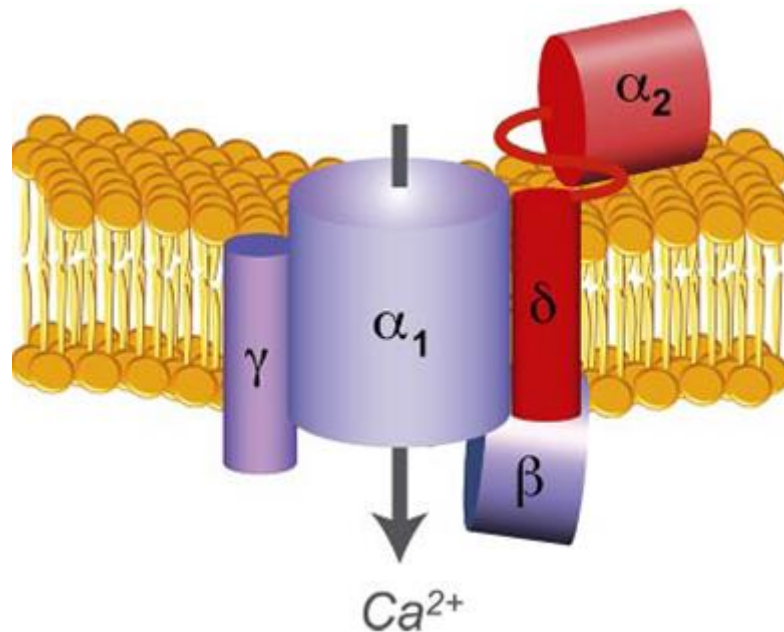
## II Marco Teórico

Los canales de iones, son proteínas de membranas que se expresan en diferentes tejidos de células excitables. Estos se comportan como verdaderas maquinas moleculares, perfectamente creadas para permitir el paso de iones a través de la membrana celular, con una muy alta selectividad y eficiencia ( $10^6$ - $10^8$  iones/s) [Latorre and Miller, 1983 (1), Hille B. 2001 (2)]. Hay una gran variedad de familias de canales de iones donde sobresalen los canales de Calcio, Sodio y Potasio activados por voltaje.

Uno de los grandes avances de la década de los 80s fue obtener mediante genética molecular las secuencias de RNA mensajero, de algunos de los cuales codificaban canales iónicos. Las secuencias de aminoácidos predicha revelaron una gran similitud estructural entre grupos de canales [Yu et al. 2005(3)] (figura 1), actualmente más conocidos como familias de canales homólogos. Hoy se piensa que la diversidad de canales de iones surge en procesos sucesivos de duplicación génica, seguido por mutaciones y selección desde un canal ancestral en común. [Hille (2)].



**Figura1:** representación de las relaciones de aminoácidos de la región del poro de las superfamilias de canales iónicos activados por voltaje; en este esquema se muestran 7 grupos de familias de canales iónicos y su topología en la membrana (3). En azul destaca la familia de los canales de calcio y sodio activados por voltaje (3).



**Figura 2:** en este esquema se muestran las subunidades accesorias del canal  $Ca_v$ , y las posiciones aproximadas en las que interactúan con la unidad principal  $\alpha_1$ . En rojo  $\alpha_2$  y  $\delta$ , en azul  $\alpha_1$  la unidad constituyente del poro,  $\beta$  y  $\gamma$ .

Los canales de  $Ca^{+2}$  activados de voltaje, están constituidos básicamente de la subunidad  $\alpha_1$ , la cual es la unidad formadora del poro; adicionalmente existen tres subunidades accesorias denominadas  $\alpha_2$ ,  $\delta$  y  $\beta$  (figura 2).

Estructuralmente, la subunidad  $\alpha_1$  comprende cuatro dominios altamente homólogos que están conectados por lazos citoplasmáticos. Cada uno de estos cuatro dominios monoméricos contiene seis segmentos transmembranales organizados en un dominio sensor de voltaje (S1-S4) y un poro (S5-S6) [Catterall, 1991 (5)]. Existen varios subtipos de subunidades  $\alpha_1$ , las cuales se asocian a diferentes tipos de corrientes de  $Ca^{+2}$ , estas se dividen en dos tipos de súper familias: la de activación a voltajes altos (HVA) y la de activación a voltajes bajos (LVA). Dentro de la familia LVA, se encuentran las corrientes tipo T, y sus variantes  $\alpha_{1G}$ ( $Ca_v3.1$ ),  $\alpha_{1H}$ ( $Ca_v3.2$ ),  $\alpha_{1I}$ ( $Ca_v3.3$ ); las cuales dan cuenta de corrientes transitorias de bajo umbral [Nilius, B. et al. 1985 (6)] y una suave sensibilidad a 1,4-dihidropiridinas (DHPs) tales como nifedipina o nimodipina [Cohen and McCarthy, 1987(7)]. Por otra parte se encuentra la familia HVA, en donde se han descrito corrientes tipo P, las cuales corresponden a la subunidad  $\alpha_{1A}$ ( $Ca_v2.1$ ); las corrientes tipo Q, en donde se encuentra la subunidad

$\alpha_{1A}$ (Ca<sub>v</sub>2.1). Ambos tipos de corrientes son sensibles a  $\omega$ -agatoxina. Otro tipo de corriente es la tipo N, la subunidad que la genera es  $\alpha_{1B}$ (Ca<sub>v</sub>2.2), y es sensible a  $\omega$ -conotoxina. Las corrientes tipo L, en donde se encuentran  $\alpha_{1C}$ (Ca<sub>v</sub>1.2),  $\alpha_{1D}$ (Ca<sub>v</sub>1.3),  $\alpha_{1F}$ (Ca<sub>v</sub>1.1), son sensibles a las dihidropiridinas, y finalmente las tipo R, las subunidad que la subyace es  $\alpha_1$ (Ca<sub>v</sub>2.3), la cual es sensible a SNX-482.

**Tabla 1.-** Tabla resumen de clasificación de los canales de Calcio sensibles a voltaje.

	Tipo de Corriente	Subunidad $\alpha_{\square}$	Nombre	Antagonistas característicos
LVA	Tipo-T	$\alpha_{\square G}$	Cav3.1	1,4-dihidropiridinas (DHPs)
		$\alpha_{\square H}$	Cav3.2	
		$\alpha_{\square I}$	Cav3.3	
HVA	Tipo-P	$\alpha_{\square A}$	Cav2.1	$\omega$ -agatoxina IVA
	Tipo-Q	$\alpha_{\square A}$	Cav2.1	$\omega$ -agatoxina IVA
	Tipo-N	$\alpha_{\square B}$	Cav2.2	$\omega$ -conotoxina IVA
	Tipo-L	$\alpha_{\square C}$	Cav1.2	Dihydropyridines
		$\alpha_{\square D}$	Cav1.3	
		$\alpha_{\square F}$	Cav1.4	
		$\alpha_{\square S}$	Cav1.1	
Tipo-R	$\alpha_{\square E}$	Cav2.3	SNX-482	

El flujo de Ca<sup>+2</sup> a través de los canales de Calcio sensibles a voltaje genera una gran diversidad de respuestas intracelulares que según el contexto fisiológico y tipo celular incluyen: desencadenar la contracción del músculo esquelético [Adams et al., 1990(8)], cardiaco [Tanabe et al., 1990 (9)] y liso [Klößner y Isenberg, 2002 (10)], transcripción de genes dependientes de calcio [Dolmetsh et al., 2001(11)], la activación de enzimas dependientes de calcio[Borodinsky et al., 2003 (12); Lilienbaum y Israel, 2003 (13)], la liberación de neurotransmisores desde el terminal presináptico [Atwood y Karunanithi, 2002 (14)] y la secreción de hormonas [Kurjak et al., 2002 (15)].

## Propiedades dinámicas de los Canales de Calcio

Los canales de Calcio activados por voltaje, regulan la entrada de Calcio de manera dependiente de potencial. Una sola apertura del canal de  $\text{Ca}^{+2}$  permite la entrada cientos o miles de iones de  $\text{Ca}^{+2}$  que fluyen al citoplasma, generando un aumento local de la concentración que desencadena la respuesta fisiológica [Tsien, R.W. 1990 (4)]. Típicamente los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  se abren (activación) por uno o algunos milisegundos al depolarizarse la membrana, y se cierran (deactivación) en una fracción de milisegundos al repolarizarse la membrana. Durante una despolarización mantenida Algunos canales también pueden cerrarse por un proceso de *Inactivación*. Los canales de calcio son altamente *selectivo* a este ion, por sobre otros como iones metálicos monovalentes, pero también permite el paso de otros iones divalentes como bario y estroncio. En ausencia de divalente puede transportar cationes monovalentes sin distinguir entre sodio, potasio y litio.

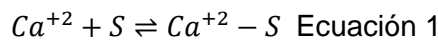
Las características básicas de la apertura y cierre del canal (generalmente referidas al “gating” del canal), a la selectividad a  $\text{Ca}^{+2}$  y la permeación son propiedades intrínsecas de todos los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  dependientes de voltaje y altamente conservados en la evolución. [Carafoli, E. et al. 1999 (16)].

En condiciones fisiológicas, el flujo de calcio que se alcanza es más modesto, aunque suficiente para causar un largo incremento en  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  ( $>1\mu\text{M}$ ) cerca de la boca del canal abierto.

## La teoría versus lo experimental

Al aplicar una diferencia de potencial más positiva que el reposo sobre una membrana, aumenta la probabilidad de que un canal de calcio activado por voltaje, se encuentre en estado abierto. La concentración de calcio en las cercanías del extremo interno del poro del canal es menos de 1 nM, mientras que en la solución extracelular alcanza valores en el orden  $\mu\text{M}$ , lo cual genera un gradiente electroquímico que impulsa al calcio a entrar. Pero este ion no se encuentra solo, sino que éste se encuentra rodeado por una capa de moléculas de agua que lo recubren (estado *hidratado*), por lo que es necesario “desmantelarlo” de estas aguas. Al acercarse al poro del canal, los aminoácidos carboxílicos contribuyen a que este paso sea energéticamente favorable,

ya que estabilizan el  $\text{Ca}^{+2}$ . Sin embargo si lo comparamos con la entrada de un ion sodio, vemos que este es varias veces menos permeable a pesar de que calcio y sodio tienen el mismo diámetro (2Å). ¿Cómo puede entonces el canal seleccionar  $\text{Ca}^{+2}$  por sobre  $\text{Na}^{+}$  en una razón de 1000:1? Ya descartamos una selectividad basada en el tamaño de los iones. Por otro lado el poro contiene sitios que unen  $\text{Ca}^{+2}$  a muy bajas concentraciones ( $10^{-6}\text{M}$ ) y no a otros iones fisiológicos como potasio y sodio. Esta alta afinidad en la unión de calcio predice una alta selectividad pero una muy lenta disociación del ion de  $\text{Ca}^{+2}$  del sitio de unión como lo muestra la ecuación 1, (S=sustrato). [Sather W. A. and McCleskey E. W, 2003 (17)].



Dado que en esta reacción la constante de disociación ( $K_d=10^{-6} \text{ M}$ ) está dada por la razón entre la velocidad de unión ( $K_{on}$ ) y salida ( $K_{off}$ ), si  $\text{Ca}^{+2}$  entra en el sitio tan rápido como la difusión lo permita ( $\sim 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), luego la constante de velocidad de salida ( $K_{off}$ ) sería de no más de  $10^3$  iones por segundo o 1 ión por milisegundo. Los canales de calcio conducen corrientes en el orden de los picoamperes que corresponde a cerca de  $10^6$  iones por segundo. Esto genera una gran paradoja: *¿Cómo pueden los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  permear  $\text{Ca}^{+2}$ , 1000 veces más rápido que la constante de velocidad de salida teórica del sitio de unión con el requisito de la afinidad?* La propuesta clásica para resolver esta contradicción es la existencia de 2 sitios de unión a calcio donde la salida del calcio desde el sitio más interno es promovida por repulsión electrostática con el ion que se une al sitio más externo.

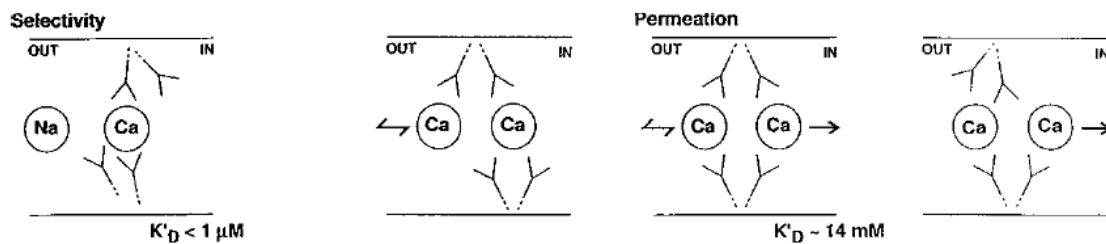
El problema es que pareciera ser que existe un único locus (EEEE) de alta afinidad a  $\text{Ca}^{+2}$ . La explicación que surge es que con cuatro glutamatos es posible neutralizar la carga de dos iones  $\text{Ca}^{+2}$  [Yang J. et al (4)].

Sin embargo Yang et al. (4) y Ellinor et al. (18) demostraron que cada mutación puntual realizada en el locus reduce sustancialmente su unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , por lo que los cuatro glutamatos son requeridos para una alta afinidad de unión, y ellos parecen formar un único sitio de alta afinidad. Diversos grupos estudiaron el efecto de mutantes puntuales en este locus, sustituyéndolo por aspartatos o glutaminas en donde se

observa una disminución en la afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , por sobre 20 veces [Yang J. et al, 1993 (4); Ellinor P. T. et al., 1995 (18)].

### Modelo de dos sitios

Yang J. et al (4), proponen, una estructura flexible en el que los glutamatos del locus podrían estar actuando en parejas uniéndose a cada  $\text{Ca}^{2+}$ , figura 3.



**Figura 3** Descripción hipotética de una estructura flexible en el locus EEEE. [Sather W. A. and McCleskey, 2003 (17), Yang J. et al, 1993 (4)]

Cada glutamato del anillo descrito contribuye con una afinidad a los cationes divalentes en diferentes magnitudes; se cree que las diferentes afinidades son producto de la movilidad de los glutamatos otorgada por los carbonos  $\alpha$  orientándolos en diversas posiciones, por lo que su contribución tendría directa relación con la orientación o negatividad de cadenas carboxílicas en el espacio.

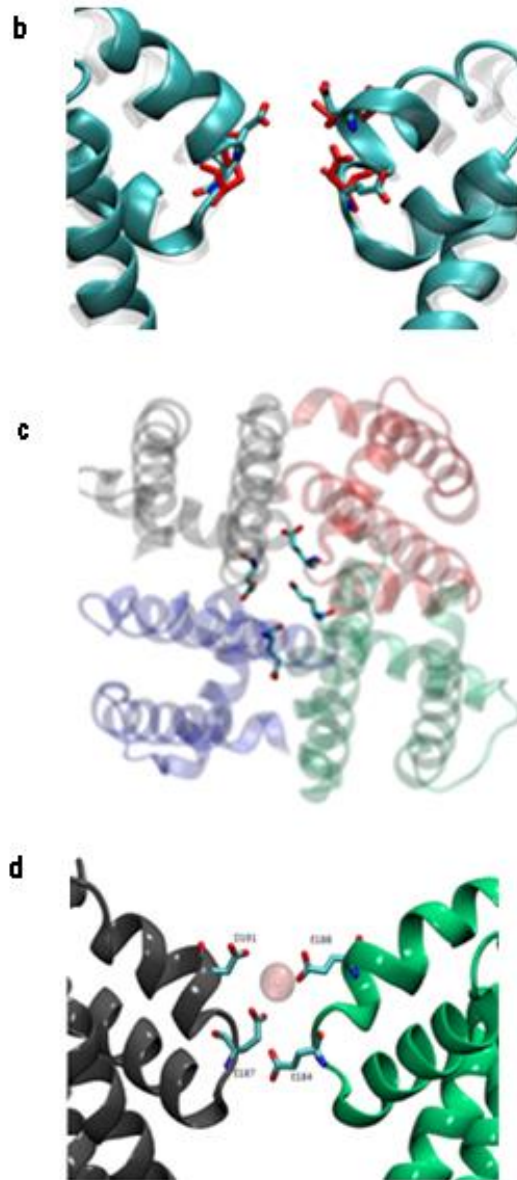
Una alternativa no excluida completamente por la evidencia experimental es la existencia de un segundo sitio de unión para calcio en el filtro de selectividad. Considerando que existe un canal bacteriano ( $\text{Na}_v\text{Ab}$ ) que presenta el mismo motivo de glutamatos en el filtro de selectividad, pero en un canal selectivo a sodio y no calcio [Kalypso Charalambous and B. A. Wallace, 2011 (19)]. Se refuerza la idea que este motivo estructural no sería suficiente para explicar la selectividad al calcio. En una colaboración con el Dr. Danilo González, hemos desarrollado un modelo estructural del canal de calcio que nos permitió identificar un segundo anillo de amino ácidos carboxílicos, en la cercanía de la tétrada de glutamatos.

## Modelo molecular por homología Na<sub>v</sub>Ab-Ca<sub>v</sub>1.2

Se realizó un alineamiento de los canales Na<sub>v</sub>Ab y Ca<sub>v</sub>1.2 (figura 4a), en donde se puede observar un alto porcentaje de identidad entre ambos. Al corroborar esta información, se tomó la estructura del canal Na<sub>v</sub>Ab, como templado para el canal Ca<sub>v</sub>1.2, para el cual se realizó un modelo por homología y se afinó la estructura por dinámica molecular. Este trabajo fue realizado por el grupo del Dr. Danilo González. En este modelo se detectó la presencia de otro anillo de aminoácidos con ácidos carboxílicos en su cadena lateral hacia la cara externa del poro del canal Ca<sub>v</sub>1.2, estos aminoácidos corresponden a D397, D737, E1149 y D1450.

**a**

Dominio I	Ca <sub>v</sub> 1.2	FQCITMEGWTDVL
	Na <sub>v</sub> Ab	FQVMTLESWSMGI
Dominio II	Ca <sub>v</sub> 1.2	FQILTGEDWNSVM
	Na <sub>v</sub> Ab	FQVMTLESWSMGI
Dominio III	Ca <sub>v</sub> 1.2	FTVSTFEGWPELL
	Na <sub>v</sub> Ab	FQVMTLESWSMGI
Dominio IV	Ca <sub>v</sub> 1.2	FRCATGEAWQDIM
	Na <sub>v</sub> Ab	FQVMTLESWSMGI



**Figura 4** (a) Alineamiento del filtro de selectividad  $\text{Na}_v\text{Ab}$  con  $\text{Ca}_v1.2$ . (b) Canal  $\text{Ca}_v1.2$  y  $\text{Na}_v\text{Ab}$  alineados estructuralmente. Aspecto ghost de la proteína y aminoácidos de color rojo, corresponden a  $\text{Na}_v\text{Ab}$ . (c) Vista intracelular de  $\text{Cav}1.2$ , modelado con  $\text{Na}_v\text{Ab}$  como molde. (d) Vista lateral de los dominios I y III de  $\text{Cav}1.2$ .

## **IV Hipótesis y Objetivos**

### **Hipótesis**

Existe un anillo de residuos ácidos DDED, ubicado hacia la cara externa del poro del canal  $Ca_v1.2$ , que contribuye a la selectividad a calcio del canal.

### **Objetivo General**

Estudiar el efecto de mutantes del anillo DDED, en la selectividad a calcio del canal  $Ca_v1.2$ .

### **Objetivos Específicos**

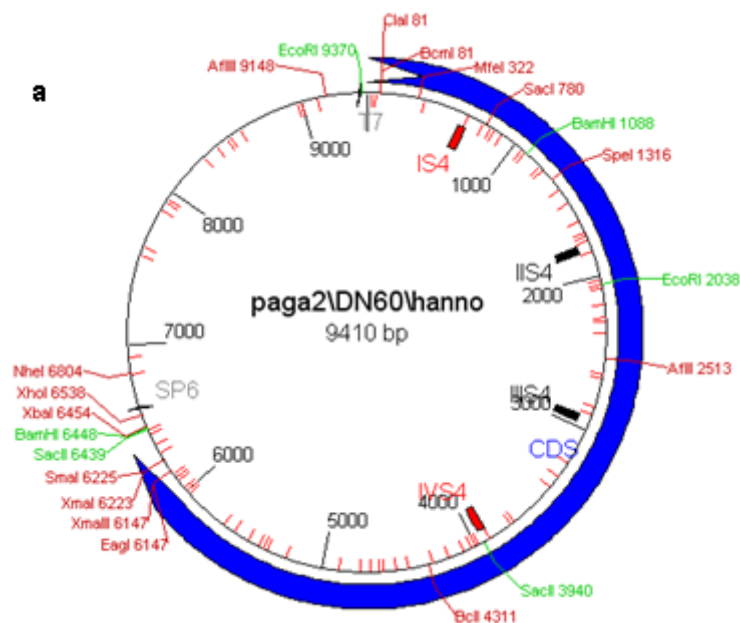
1. Reproducir la conducta del canal silvestre y del glutamato 393 reportado en la literatura.
2. Determinar el efecto del mutante E1149A (anillo externo) en la permeabilidad selectiva del canal en diferentes condiciones iónicas.
3. Comparar el efecto de ambos mutantes en la permeabilidad selectiva del canal.

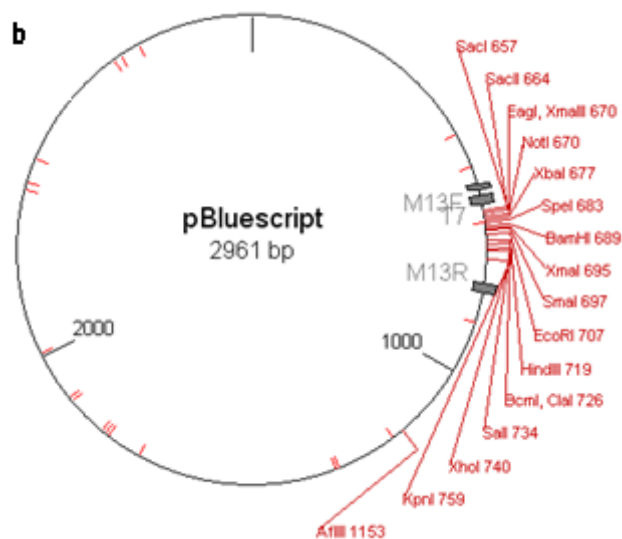
## V Estrategia Experimental y Metodología

### Preparación de mutantes

Para todas las mutantes se utilizó como templado una variante de Ca<sub>v</sub>1.2 que carece de los primeros 60 aminoácidos del amino terminal  $\Delta$ N60Ca<sub>v</sub>1.2 (DN60) subclonado en el vector pAGA-2 (figura 5a) [Wei et al., 1996 (20)]. Se eliminaron los sitios de corte SacII 3439 y EcoRI 9370; generando un nuevo vector llamado DN60-ES.

Cada mutante puntual se realizó extrayendo el segmento codificante del poro del canal para cada uno de los dominios y se ligaron en el vector pBluescript (figura 5b). Por ejemplo, para generar mutantes en el dominio I (constructo pBs\_DN60ploopD1), se construyó cortando el cDNA de DN60-ES con las enzimas SacI y SpeI y ligando esta secuencia en el vector pBluescript. Una vez generada la mutación se realizó la subclonación en el vector DN60-ES. Todos los mutantes generados fueron confirmados por secuenciación.





**Figura 5:** a, Vector pAGA-2 secuenciado en Hannover, contenía la variante del canal Cav1.2 completa (DN60-ES). b, Vector pBluescript usado para adherir segmentos del canal y generar los mutantes.

### Cultivo de bacterias

La cepa bacteriana que se usó es XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA USA). Los cultivos se crecieron en un medio líquido a 37°C, con agitación a 220 rpm, en un agitador orbital. El medio que se utilizó es LB (Luria-Bertani) [Sambrook and Russell, 2001 (21)]. Los cultivos en medio sólido, se hicieron en medio LB suplementado con Agar-agar al 1,5% [Sambrook and Russell, 2001 (21)]. Los medio se esterilizaron a 125°C y 15 psi por 20 minutos. La selección de las bacterias fue realizada con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL (ampicillin trihydrate, Sigma).

### Transformación de bacterias

Se añade 1 ng de DNA plasmidial a 50 µL de bacterias competentes y se incubó en hielo durante 30 minutos, estas se mantuvieron a 42°C durante un minuto y por último se dejaron por dos minutos en hielo. Estas bacterias crecen en 3 mL de medio SOC sin antibiótico por 1 hora, para la expresión del plásmido que contiene la resistencia al antibiótico, en este caso ampicilina [Sambrook and Russell, 2001 (21)]. El cultivo se sembró en placas con medio LB sólido suplementadas con ampicilina a una

concentración final de 100 µg/mL, las que fueron incubadas a 37°C por 12 a 16 horas. De estas placas se seleccionaron clones para crecerlas en medio líquido por 12 horas.

### **Obtención y purificación del DNA plasmidal**

El DNA plasmidial fue extraído de las bacterias en cultivo por lisis alcalina y purificado mediante el método de columna utilizando QIAGEN Plasmid Kit Purification (QIAGEN). El DNA, luego de ser precipitado con 2-propanol se lavó con etanol al 70%, finalmente se resuspendió en agua. El DNA se verificó según patrón de migración electroforético en gel de agarosa al 1%. El peso molecular se estima por comparación con patrones de peso molecular. La pureza y la concentración del DNA se midieron por espectrofotometría ultravioleta (UV).

### **Transcripción in vitro**

El DNA purificado fue linealizado con la enzima de restricción HindIII (New England Biolabs). A partir del DNA linealizado de  $\Delta N60Ca_v1.2$  (y mutantes) se sintetizó RNA *in vitro* utilizando el kit "Message-Machine" (Ambion Inc., Austin, TX USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La integridad del RNA era analizada por electroforesis en gel de agarosa y cuantificado mediante espectrofotometría UV.

### ***Xenopus laevis***

Se utilizaron ranas hembras de la especie *Xenopus laevis*, proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso. Los ejemplares se mantienen en oscuridad, en contenedores plásticos con agua potable libre de cloro, a una temperatura de  $20 \pm 1$  °C. Las ranas son alimentadas dos veces por semana con corazón o hígado de vacuno.

### **Aislamiento y mantenimiento de ovocitos de *Xenopus laevis***

Los ovocitos (en estado de maduración VI), fueron obtenidos de ranas adultas (*Xenopus laevis*). Las ranas fueron anestesiadas por inmersión en solución de metanosulfonato de 3-amino etilbenzoato al 0,15% por 15 minutos (tricaína, Aldrich Chemical Company, Inc.). Los lóbulos ováricos fueron retirados a través de una pequeña incisión en la pared abdominal (10 a 12 mm), realizada en condiciones estériles. Estos lóbulos, se transfirieron a una solución tipo Ringer libre de calcio (OR-2 Calcium free): 82,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7,6. Posteriormente, estos lóbulos eran cortados en trozos más pequeños. La capa folicular de los ovocitos fue retirada, tratándolos con colagenasa tipo 2 (2 mg/mL) (Worthington Biochemical) por un periodo de 45 a 60 minutos. Los ovocitos se lavaron cinco veces, para retirar el exceso de colagenasa. Los ovocitos fueron incubados a 17°C en solución de mantenimiento SOS (en mM): 100 NaCl, 1,8 CaCl<sub>2</sub>, 1,0 MgCl<sub>2</sub>, 2,5 KCl, 5 HEPES, que además contiene piruvato de sodio (2,5 mM) y amikamicina (50 a 200 µg/µL), por 24 horas antes de ser inyectados.

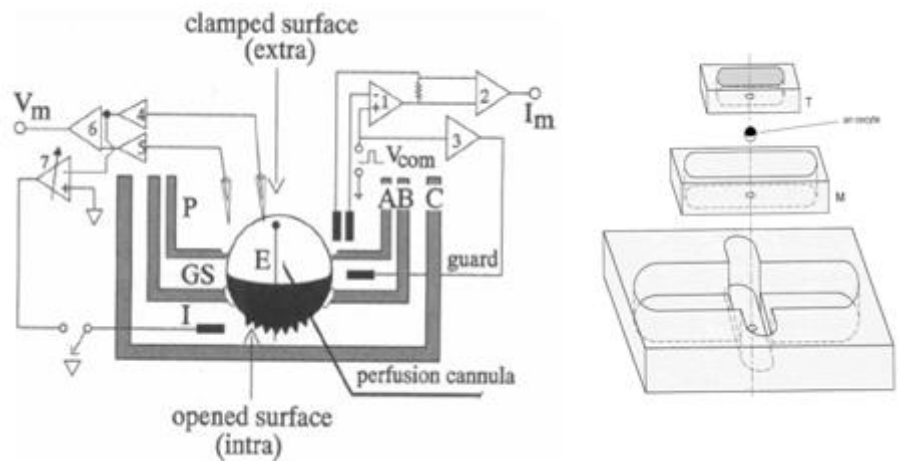
### **Expresión heteróloga de proteínas en ovocitos de *Xenopus laevis***

Los ovocitos eran inyectados con 1 a 3 ng del RNA mensajero sintetizado in vitro (50 a 75 nL). El sistema de micro-inyección estaba compuesto por una lupa binocular (Modelo PZM, World Precision Instrument, Inc., Sarasota, FL, USA), una lámpara de luz con fibra óptica (World Precision Instrument, Inc., Sarasota, FL, USA), por un micromanipulador (Modelo M3301R, World Precision Instrument, Inc., Sarasota, FL, USA), y por un microinyector (Modelo A203XVY, World Precision Instrument, Inc., Sarasota, FL, USA). Para inyectar se utilizaron micropipetas de vidrio (4878, World Precision Instrument, Inc., Sarasota, FL, USA), obtenidas por estiramiento y calor en un estirador horizontal (Micropipette Puller modelo P-97, Sutter Instrument Co., USA). Para lograr que la punta de la micropipeta tenga un diámetro óptimo para realizar la inyección (~ 20 µm), es quebrada con una pinza bajo microscopio. Los ovocitos, se seleccionaban visualmente, y eran depositados en una placa de acrílico con solución de MgSO<sub>4</sub>. Esta placa tiene surcos donde el ovocito quedaba en posición fija durante la micro-inyección. Los ovocitos fueron inyectados con ~50 nL de una mezcla de RNAc el cual contenía una razón 1:1:1 de subunidades  $\alpha 1_c$ ,  $\beta 2\alpha$  y  $\alpha 2$  correspondientemente. Después de la micro-inyección los ovocitos fueron mantenidos, en incubador a 17°C, en solución SOS suplementada con amikacina y piruvato. Los

registros electrofisiológicos fueron realizados dentro de cinco días posteriores a la microinyección.

### **Cut-open voltage clamp**

Los registros de corrientes macroscópicas y de cola, fueron realizados mediante una técnica conocida como cut-open oocyte voltage-clamp (COVG) (figura 6), [Stefani y Bezanilla, 1998 (22)] la cual posee un ruido relativamente bajo ( $\sim 1$  nA rms a 5 kHz), puede cargar la capacidad de la membrana entre 20 a 40  $\mu$ s, y hace posible controlar la perfusión de la solución interna del ovocito. Esta fracción de membrana (20 a 25 % del total) está aislada físicamente y eléctricamente por tres cámaras superpuestas y conectadas por agujeros de 0,5 a 0,8 mm de diámetro, entre los que se asienta el ovocito. El sistema de registro utilizado está formado por: un amplificador CA-1B (Dagan Corp., Minneapolis MN USA), tarjeta de adquisición Digidata 1200 (Axon Instrument Inc., Foster City, CA, USA) y un computador basado en un procesador Intel Pentium II MMX. La cámara de registro fue dispuesta sobre una mesa anti-vibratoria fabricada en el laboratorio, se utilizó como fuente de luz una lámpara led. La lupa binocular utilizada tiene un rango de magnificación de 7 a 45 veces (World Precision Instrument, Inc., Sarasota, FL, USA). La posición y desplazamiento de la pipeta de registro era controlada manualmente, a través de un micro manipulador de tres plataformas con tornillo micrométrico (Modelo M3301R, Worl Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA).



**Figura 6:** Esquema de una cámara y su electrónica. Se observa un oocito de *Xenopus* transversalmente montado en la cámara. Los compartimentos A, B y C están sellados por vaselina y separa eléctricamente cada piscina: el compartimento inferior (I) es usado para abrir y perfundir soluciones al oocito, el compartimento del medio es para las guardas (GS) y el compartimento superior (P) es donde la superficie del oocito es donde se genera el clamp por voltaje. E representa un electrodo [Tagliatela M. et al, 1992 (23)].

### Soluciones y protocolos de registro

Antes de registrar los ovocitos, se dejaron en diálisis en una placa petri con la misma solución de registro interna K/MES, como mínimo durante 30 minutos. Al montar el ovocito en la cámara se permeabilizaba el huevo con una solución de Saponina al 1% (en el compartimento interno I). Todos los registros fueron realizados con la *Solución Interna* K/MES la cual contenía: KOH 1M, Hepes 10mM, EGTA 10mM; y bajo cuatro condiciones bi-ionicas diferentes; *Ca/Na*:  $\text{OH}_2\text{Ca}$  10mM,  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{Na}$  (MES) 96mM, Hepes 10mM y EGTA 0.5mM; *Ca/NMG*:  $\text{OH}_2\text{Ca}$  10mM, NMG 96mM, Hepes 10mM y EGTA 0.5mM; *Ba/Na*:  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  10mM,  $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{Na}$  (NaMES) 96mM, Hepes 10mM y EGTA 0.5mM; *Ba/NMG*:  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  10mM, NMG 96mM, Hepes 10mM y EGTA 0.5mM. Se utilizo Bay K 8644, 10 $\mu\text{M}$  la cual se agregó en la solución externa, al inicio de cada experimento, en el compartimento superior P; para promover el estado abierto del canal. La solución que contenían las pipetas de registro tenían: Tetrametilamonio (TMA) 2M, NaCl 50mM y EGTA 10mM. Todas las soluciones eran ajustadas con ácido Metanosulfónico a pH 7. Los registros de corriente para las curvas IV, fueron obtenidos desde un pre-pulso de -80 mV durante 10 ms, un protocolo con pulsos que van desde

-70 a 100 mV, con un delta de 10 mV, durante 120 ms y finalmente regresa a un potencial mantenido de -50 mV. El protocolo de registros para las corrientes de cola consta 4 ms a -90 mV, luego 8 ms a 70 mV y durante 20 ms pulsos que varían de 10 en 10mV para cada trazo y van desde -120 mV a 10 mV.

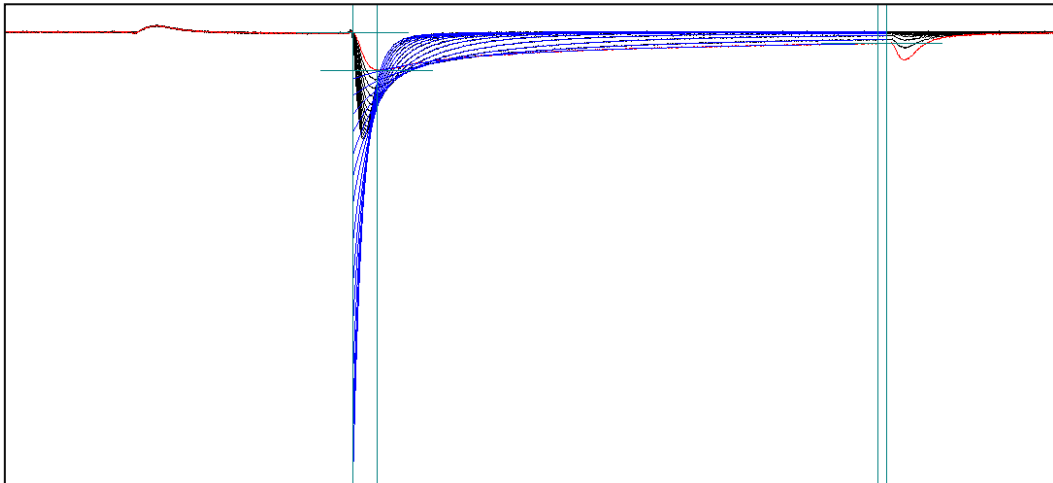
### Análisis de corrientes de cola

Para estudiar el impacto de las mutaciones sobre la conductancia, la corriente instantánea fue estimada a partir de las corrientes de cola.

Los trazos de corriente obtenidos (figura 7) desde las corrientes de cola fueron ajustados a dos exponenciales mediante:

$$i_{inst} = f(t) = A_1e^{-t/\tau_1} + A_2e^{-t/\tau_2} + C \text{ (Ecuación 2)}$$

Mediante el ajuste de los trazos a estas exponenciales se extrapola la amplitud de la corriente a tiempo 0, logrando adquirir los datos de corriente instantánea.



**Figura 7:** trazo representativo de corrientes de colas ajustado con dos exponenciales hasta a tiempo cero.

Luego estos datos de corrientes fueron graficados respecto al voltaje, y sobre estos datos mediante una regresión lineal en las amplitudes obtenidas a potenciales más negativos se calculó la conductancia (pS).

## VI Resultados

Para medir la selectividad del canal silvestre y los canales mutados se registraron las corrientes iónicas para cada una de las cuatro condiciones: Ca/Na, Ca/NMG, Ba/Na y Ba/ NMG, mediante la técnica de cut-open voltage clamp. Los registros fueron obtenidos al quinto día post-inyección.

### Selectividad iónica, Permeabilidades relativas

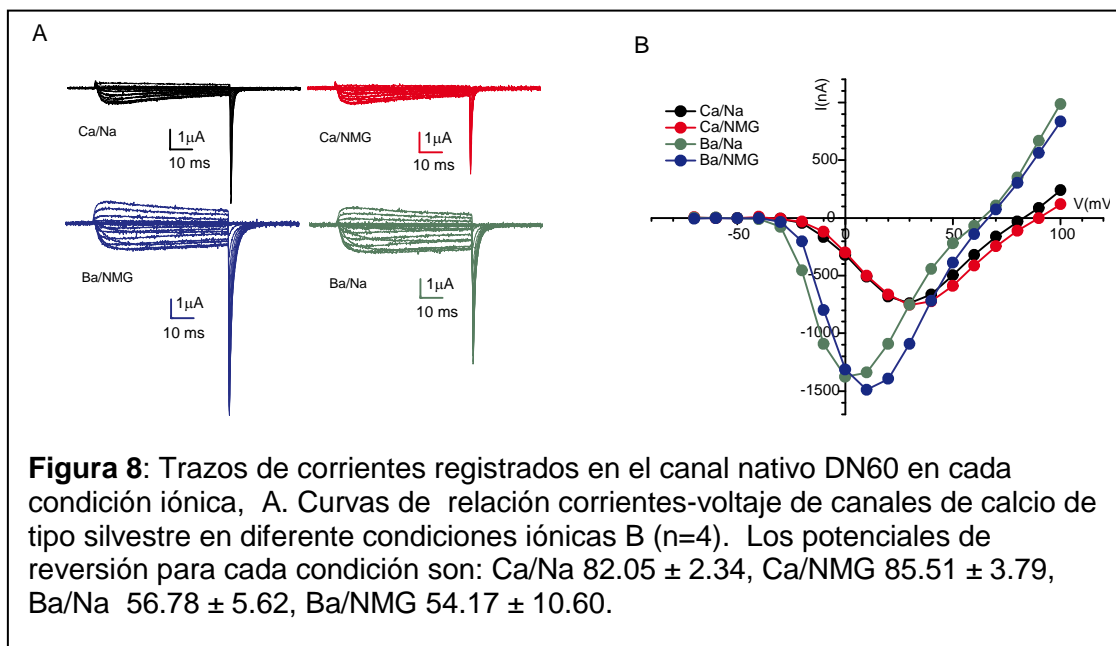
Las curvas de relación corriente-voltaje fueron graficadas a partir de los registros obtenidos en cada condición, extrayendo los datos al tiempo de mayor magnitud de corriente de entrada. Para los experimentos en los que solo Ca o Ba eran los iones permeantes, las relaciones de permeabilidades se calcularon utilizando la fórmula la ecuación de Goldman-Hodging-Katz [Hille, B. 2001(2)]

$$E_{rev} = 58 * \log \left( \frac{[Cat]_o^2}{\frac{P_{Cat}}{P_{Ca}} [K]_i^1} \right) \text{ (Ecuación 3)}$$

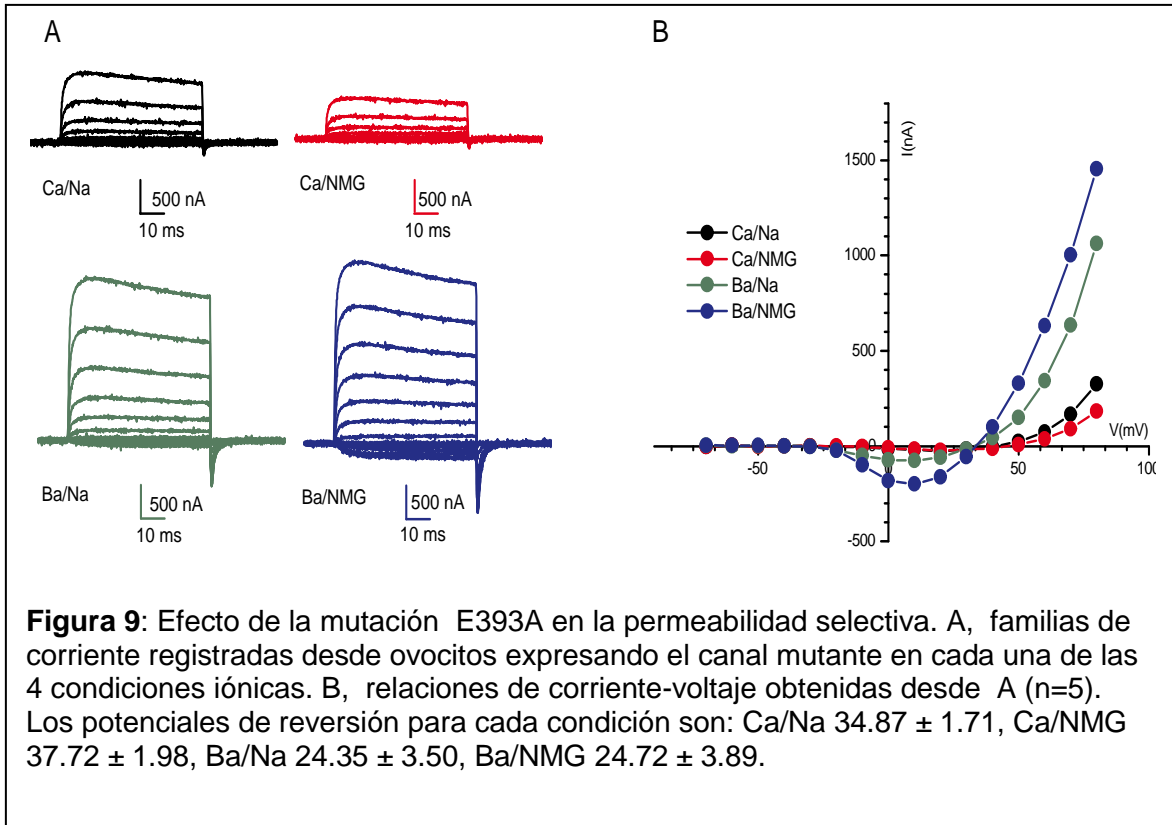
Para los experimentos en los que se determinó la razón de permeabilidad, en condiciones bi-iónicas se utilizó:

$$E_{rev} = 58 * \log \left( \frac{[Ca]^2 * \frac{P_{Na}}{P_{Ca}} [Na]_o^1}{\frac{P_{Cat}}{P_{Ca}} [K]_i^1} \right) \text{ (Ecuación 4)}$$

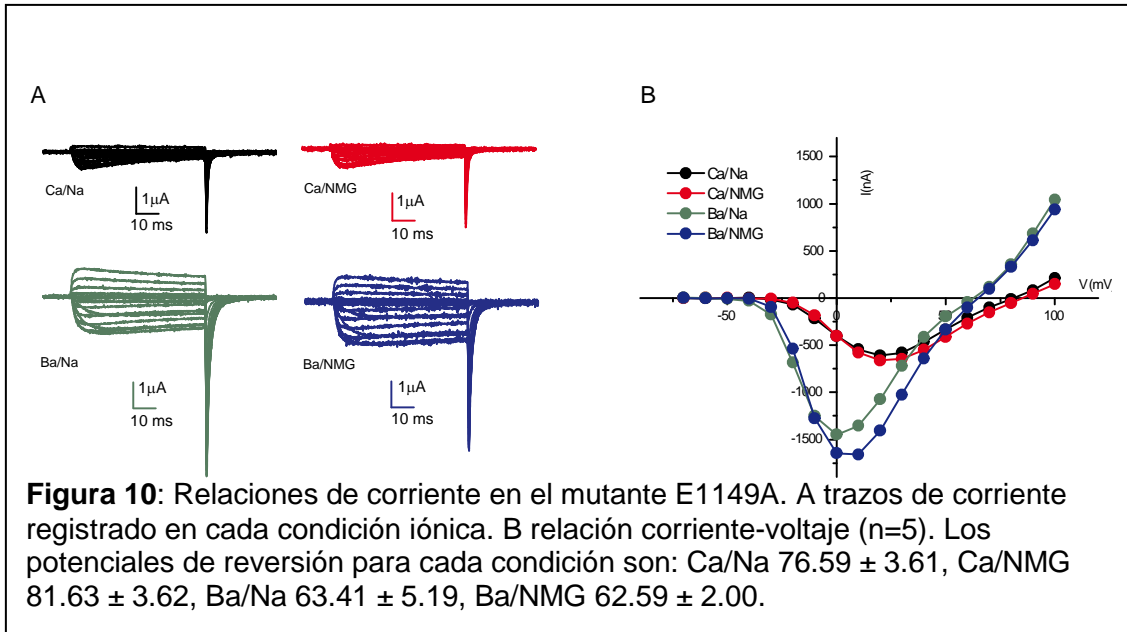
Se observa una alta selectividad del canal por calcio (figura 8a), tanto en presencia como en ausencia de Sodio y por otro lado es explícita la menor selectividad que el canal posee por el Bario (figura 8b). Las razones de permeabilidades obtenidas en el canal nativo son: para Na/Ca  $30.52 \pm 2.82$ , Na/Ba  $11.10 \pm 2.49$  y para Ca/Ba  $3.82 \pm 1.24$ .



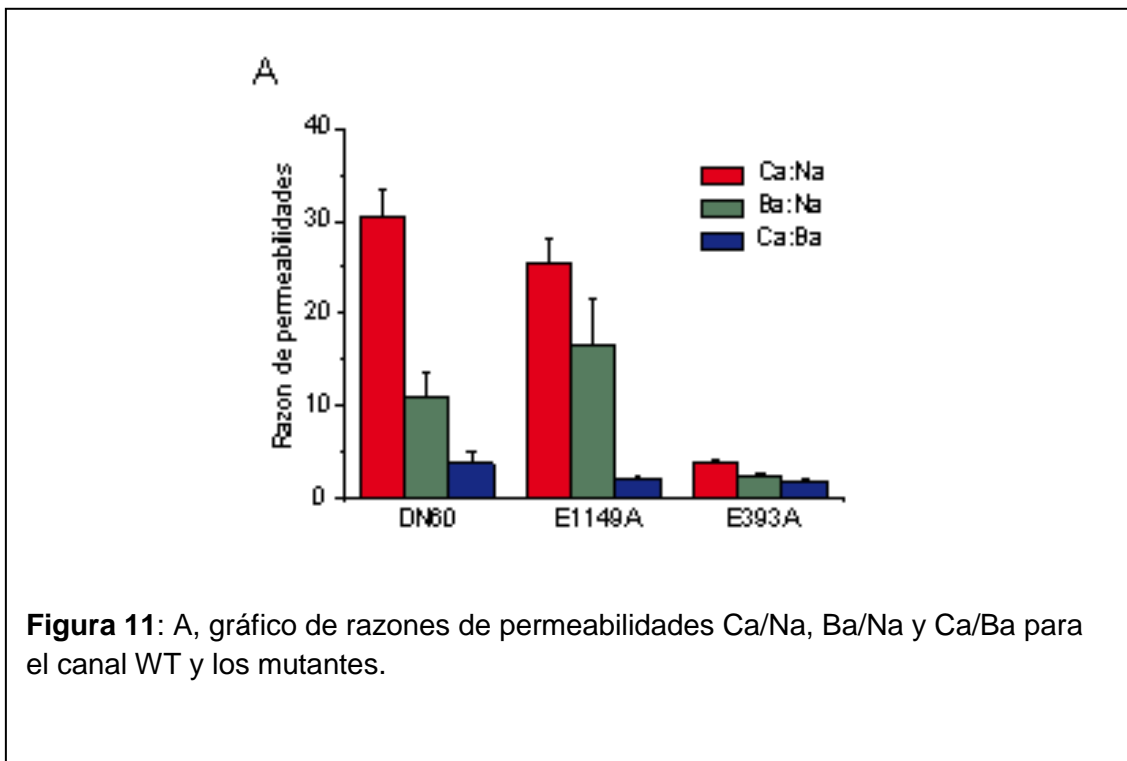
Dada la gran contribución del glutamato 393 a la constante de afinidad reportada en la literatura, se midió el efecto que posee en la permeabilidad cuando éste residuo es cambiado por alanina, bajo las condiciones iónicas anteriormente nombradas. Se pudo medir efectivamente el severo efecto que tiene en la permeabilidad selectiva tanto por calcio como por bario, cambiando drásticamente los potenciales de reversión (figura 9). Los razones de permeabilidad obtenidos para el mutante E393A cada condición son: Na/Ca  $3.88 \pm 0.32$ , Na/Ba  $2.33 \pm 0.37$  y Ca/Ba  $1.76 \pm 0.25$ .



Por último se probó un glutamato perteneciente al anillo propuesto, ubicado en el Dominio III, en la posición 1149, el cual fue mutado por alanina; en el que no se observó significativamente una alteración en la permeabilidad selectiva. En la figura 10b, se aprecia que el potencial de reversión no fue afectado bajo la condición iónica de  $\text{Ca}^{+2}/\text{NMG}$ , ya que el potencial de reversión del canal silvestre era  $+88 \pm 3$  mV y en el mutante E1149A se mantuvo cercano en  $+80 \pm 6$  mV. Los razones de permeabilidad obtenidos para el mutante E1149A cada condición son: Na/Ca  $25.53 \pm 2.47$ , Na/Ba  $16.66 \pm 5.05$  y Ca/Ba  $2.16 \pm 0.11$ .



En la figura 11a, se puede observar en más detalle el gran efecto que tiene en la disminución de la selectividad el mutante E393A, por cuanto en todas las ocasiones las razones de permeabilidades disminuyen notoriamente, respecto del canal silvestre; por otro lado en el mutante E1149A, no se distingue una mayor diferencia en las razones de permeabilidades con respecto al canal silvestre.

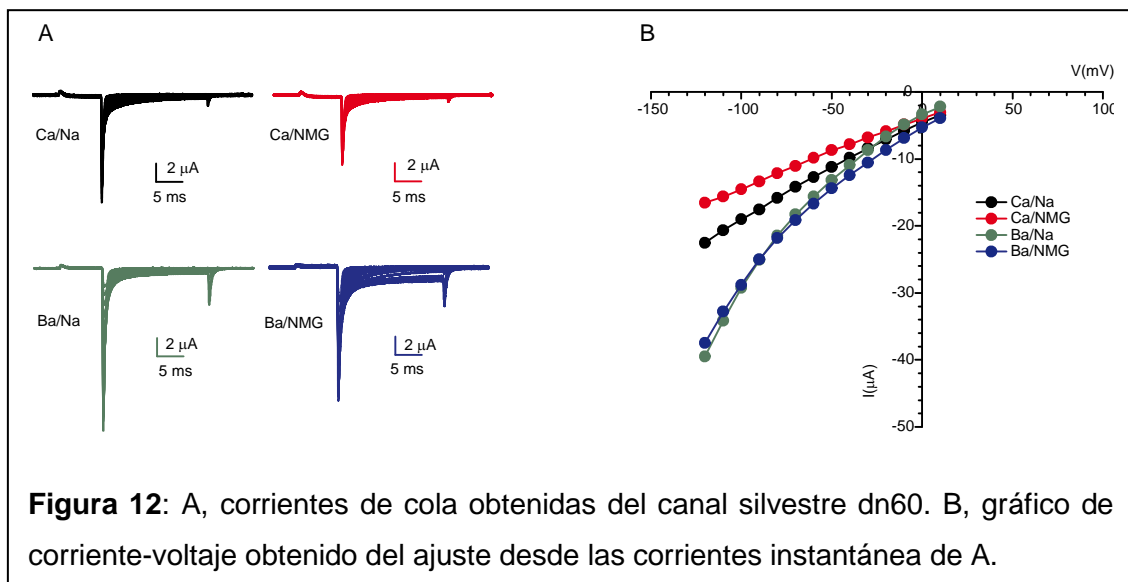


## Corrientes instantáneas y Razones de Conductancias

En búsqueda de la respuesta a nuestro paradigma, decidimos no solo estudiar las razones de permeabilidades, ya que sabemos que los canales de calcio son altamente selectivos, sino que también estudiar si su alta eficiencia conductora se ve alterada de algún modo.

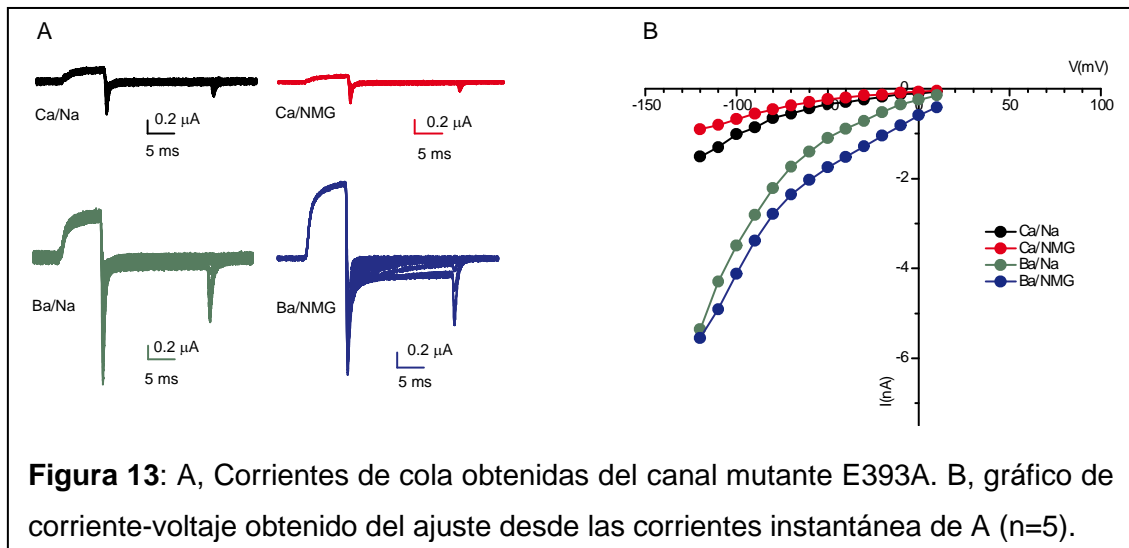
Para esto se utilizó un activador del canal Bay K 8644, proporcionándonos unas colas más lentas, para de este modo poder aproximarnos más a la corriente instantánea.

Comenzamos analizando el canal nativo; en la figura 12A, se muestran las corrientes de cola de las cuales se obtuvieron las conductancias. Las razones de conductancia obtenidas para el canal nativo fueron: Na/NMG en Ca  $1.78 \pm 0.56$ , Na/NMG en Ba  $1.75 \pm 0.32$ , Ba/Ca en NMG  $2.32 \pm 0.71$  y Ba/Ca en Na  $2.26 \pm 0.43$ . Es claro el fenotipo mostrado por el canal ya que mientras menos adherencia tiene el ion permeante por el poro del canal, mas conductancia relativa se observa.

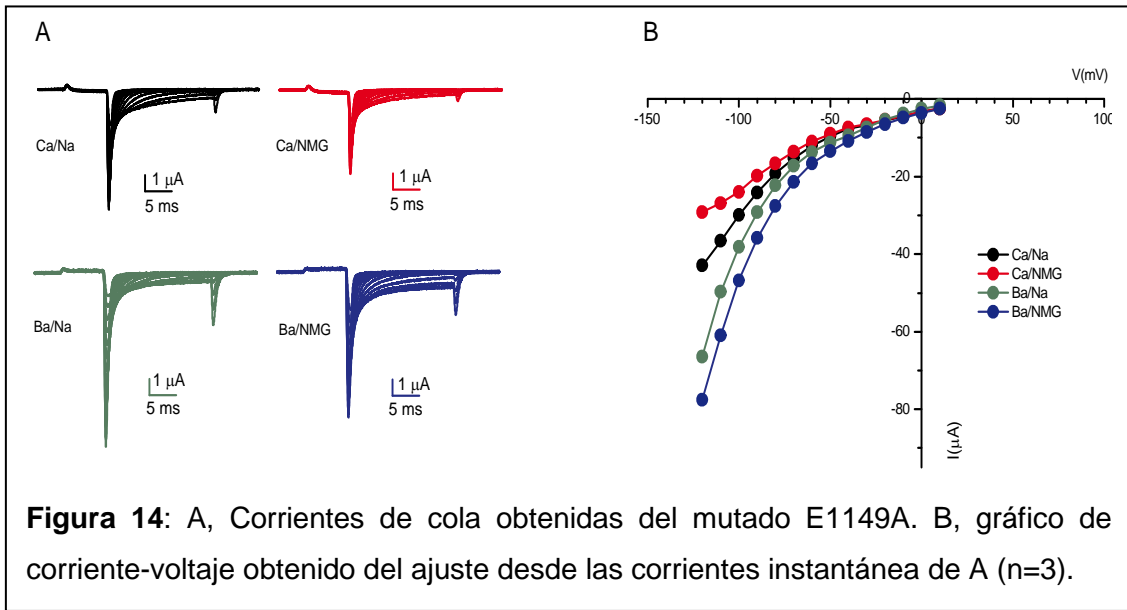


Las corrientes de cola, obtenidas del mutante E393A se muestran en la figura 13a, sin embargo es en el grafico de relación corriente- voltaje (figura 13b) en donde se observa el efecto que causa este mutante en la magnitud de la conductancia. Las

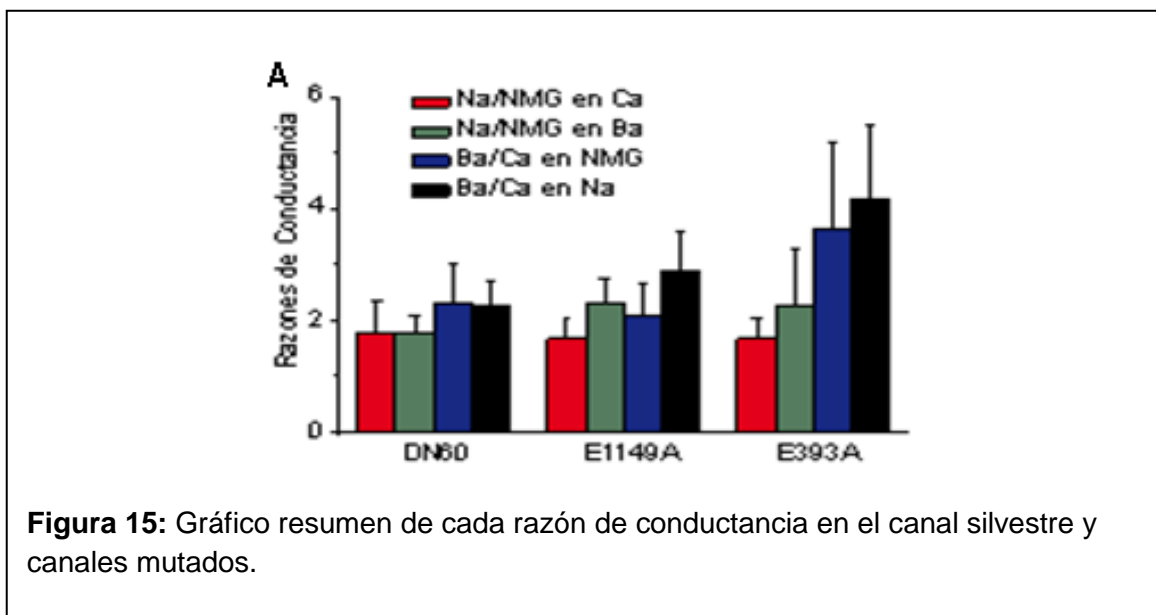
razones de conductancia obtenidas para el canal mutante E393A fueron: Na/NMG en Ca  $1.66 \pm 0.36$ , Na/NMG en Ba  $2.28 \pm 0.98$ , Ba/Ca en NMG  $3.63 \pm 1.55$  y Ba/Ca en Na  $4.15 \pm 1.35$ . Para Ba/Ca en NMG y Ba/Ca en Na se obtuvieron aun mayores conductancias que para el canal silvestre, por cuanto este glutamato tiene una clara afinidad por calcio.



Finalmente, se obtuvieron los trazos de corriente de cola para el canal mutante E1149A (figura 14a). En la figura 14b, se muestran las curvas de relación corriente-voltaje de los cuales se obtuvieron las razones de conductancia: Na/NMG en Ca  $1.67 \pm 0.34$ , Na/NMG en Ba  $2.31 \pm 0.43$ , Ba/Ca en NMG  $2.06 \pm 0.59$  y Ba/Ca en Na  $2.87 \pm 0.73$ . No se observa una mayor diferencia en las razones de conductancia respecto del canal nativo.



En el gráfico de la figura 15, observamos comparativamente que las razones de conductancia entre el canal silvestre y el E1149A, son semejantes. Sin embargo, con el mutante E393A, a pesar de que las razones de permeabilidad se ven notoriamente disminuidas, observamos que las razones de conductancias aumentan considerablemente para Ba:Ca en NMG y Na, por cuanto al mutar este glutamato no solo se disminuyó la selectividad por calcio, sino que aumenta la selectividad por bario.



## VII Discusión

Los mecanismos moleculares que permiten el transporte selectivo de potasio a través de la membrana plasmática parecen resueltos a escala atómica en tanto que para el calcio, ion clave para diversos procesos de señalización, aún no entendemos como se resuelve la paradoja de alta selectividad y transporte. Los modelos de dos sitios propuestos originalmente [Marban E. 1990 (24) y Tsien W. 1986 (25)], siguen sin una contraparte estructural. Aquí a través de modelos moleculares, por alineamiento de secuencias homólogas fuimos capaces de identificar una serie de aminoácidos ubicados en las cercanías del filtro de selectividad que podrían constituir un segundo sitio de unión de calcio. Nuestro objetivo de estudio, inspirado en los trabajos del laboratorio de R. Tsien [Yang et al., 1993 (4)], consistió en ver el efecto de eliminar las cadenas laterales acídicas del supuesto anillo que formarían cada uno de los sitios de unión a calcio. Fuimos capaces de reproducir los resultados originales en sustitución del glutamato 393 por un aminoácido no cargado (alanina) quien reduce la permeabilidad relativa Ca:Na de manera significativa.

En el artículo original [Yang et al., 1993 (4)], calculan la afinidad por calcio a partir de su capacidad de inhibir corrientes de sodios. En nuestras manos fue imposible obtener corriente de sodio en ausencia de calcio libre de corrientes de fuga adicionales. Por razones desconocidas, la exposición de los ovocitos a concentraciones de calcio menores que  $10 \mu\text{M}$  genera corrientes endógenas voltaje-independientes. Esto podría corresponder a hemicanales descritos por (C.G. Nichols, 2003 (26)) que aprovechamos luego para dializar los ovocitos con solución interna. De esta forma, comparamos los potenciales de reversión en distintas condiciones iónicas y obtuvimos las permeabilidades relativas a partir de la ecuación de Goldman-Hodgkin-Katz.

Los resultados muestran que el canal silvestre prefiere Ca sobre Na en una relación 30 a 1 en tanto que la relación es solo de 3 a 1 para E393A. Esto es consistente con el cambio de afinidad de E1145Q reportado por Tsien et al. en 1993 (4). Lo que es un tanto sorprendente y difícil de explicar por un modelo simple de un sitio es que las razones de conductancia en presencia y ausencia de sodio, no se vean alteradas de manera relevante con estas mutaciones.

En una visión un tanto simplista, al generar un mutante en el sitio propuesto por nosotros, esperábamos resultados similares a los obtenidos con el mutante E393A, destruyendo parcialmente la permeabilidad. Sin embargo, tanto en las permeabilidades relativas como en las razones de conductancias no detectamos ninguna diferencia entre E1149A y el canal silvestre. Una posibilidad real es que el modelo molecular este errado y la segunda es que este sitio externo de menor afinidad tiene un impacto muy menor en las permeabilidades relativas. Esperábamos que si eliminábamos un sitio, la conductancia al sodio fuera comparativamente mayor en presencia de un ión de menor afinidad como el Ba en comparación al Ca. Sorprendentemente, las razones de conductancia Ba/Ca en NMG y Na son prácticamente las mismas. Parte del problema es que el segundo sitio puede ser más tolerante a la eliminación de un solo residuo carboxílico por lo que deberíamos explorar la eliminación de más de uno a la vez. También vamos a explorar el impacto de estas sustituciones sobre un canal con el sitio putativo alterado como es E393A. Otro experimento posible es la sustitución de los residuos del anillo DDED por cisteína y explorar su sensibilidad a reactivos oxidantes. Lamentablemente en nuestro primer intento el cuádruple mutante no dio lugar a canales funcionales. Una posibilidad es que la formación temprana de puentes de disulfuro altera el plegamiento normal de la proteína. Probaremos con dobles y triples mutantes.

## **VIII Conclusiones**

Se logro reproducir la conducta del canal silvestre DN60, mostrando una alta permeabilidad selectiva por calcio y a su vez el mutante E393A, quien actuó reduciendo la permeabilidad relativa de manera significativa. No se percibió alguna diferencia entre el canal nativo y el mutante E1149A.

## **IX Referencias**

1. **Latorre, R. and Miller, C.** Conduction and Selectivity in potassium channels. *J Membr Biol* 71: 11-30, 1983.
2. **Hille, B.** *Ion Channels of Excitable Membranes.* Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2001.
3. **Yu F. H., Yarov-Yarovoy V., Gutman G. A. and Catterall W. A.** Overview of Molecular Relationships in the Voltage-Gated Ion Channel Superfamily. *Pharmacological Reviews* 57:387-395, 2005.
4. **Yang J., Ellinor P.T., Sather W. A., Zhang J. F., Tsien R. W.** Molecular determinants of  $Ca^{2+}$  selectivity and ion permeation in L-type  $Ca^{2+}$  channels. *Nature* 366:158-61, 1993.
5. **Catterall, W. A.** Structure and function of voltage-gated Sodium and Calcium channels. *Curr Opin. Neurobiol* 1:5-13, 1991.
6. **Nilius, B, P. Hess, J. B. Lansman, and R. W. Tsien.** A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cell. *Nature* 316: 443-6, 1985.
7. **Cohen, C.J. and R. T. McCarthy.** Nimodipine block of calcium channels in rat anterior pituitary cell. *J. Physiol.* 387: 195-225, 1987.
8. **Adams, B. A., Tanabe, T., Mikami, A., Numa, S., and Beam, K.G.** Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNA. *Nature* 346: 569-572, 1990.
9. **Tanabe, T., Mikami, A., Numa, S., and Beam, K. G.** Cardiac-type excitation-contraction coupling in dysgenic skeletal muscle injected with cardiac dihydropyridine receptor cDNA. *Nature* 344: 451-453, 1990.
10. **Klößner, M., Sennefelder, A., Aigner, M., Schusdziarra, V., and Allescher, H. D.** Characterizing voltage-dependent  $Ca^{+2}$  channels coupled to VIP release and NO synthesis in enteric synaptosomes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 283: G1027-1034, 2002.

11. **Dolmetsh, R. E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J. M. y Greenberg, M. E.** Signaling to the nucleus by an L-type calcium channels-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science* 294: 213-231, 2011.
12. **Borodinsky, L. N., O'Leary, D., Neale, J. H., Vicini, S., Coso, O. A., and Fiszman, M. L.** Gaba-induced neurite outgrowth of cerebellar granule cells is mediated by GABA(A) receptor activation, calcium influx and CaMKII and erk1/2 pathways. *J. Neurochem* 84: 1411-1420, 2003.
13. **Lilienbaum, A., and Israël, A.** From calcium to NF-kappa B signaling pathways in neurons. *Mol. Cell. Biol* 23: 2680-2698, 2003.
14. **Atwood, H. L. and Karunanithi, S.** Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat. Rev. Neurosci* 3: 497-516, 2002.
15. **Kurjak, M., Sennefelder, A., Aigner, M., Schusdziarra, V. and Allescher, H. D.** Characterizing voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels coupled to VIP release and NO synthesis in enteric synaptosomes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 283: G1027-1034, 2002.
16. **Carafoli, E. and Klee, C.** Calcium as a Cellular Regulator. New York, Oxford. Oxford University Press, 1999.
17. **Sather W. A. and McCleskey.** Permeation and Selectivity in Calcium Channels. *Annu. Rev. Physiol.* 65:199-59, 2003.
18. **Ellinor P. T., Yang J., Sather W. A., Zhang J. F., Tsien R.W.** Ca<sup>2+</sup> channels selectivity at a single locus for high-affinity Ca<sup>2+</sup> interactions. *Neuron* 15:1121-32, 1995.
19. **Kalypto Charalambous and B.A. Wallace.** NaChBac: The long lost Sodium Channel Ancestor. *Biochemistry* 50: 6742-6752, 2011
20. **Wei X., Neely A., Olcese R., Lang W., Stefani E. and Birnbaumer L.** Increase in Ca<sup>2+</sup> channels expression by deletions at the amino terminus of the cardiac alpha 1C subunit. *Recept Channels* 4: 205-215, 1996.
21. **Sambrook J. and Russell D. W.** Molecular cloning: a laboratory manual (CSHL Press) 2001.

22. **Stefani E. and Bezanilla F.** Cut-open oocyte voltage-clamp technique. *Meth. Enzymol* 293:300-318, 1998.
23. **Taglialatela M., Toro L. and Stefani E.** Novel voltage clamp to record small, fast currents ion channels in *Xenopus* oocytes. *Biophysical Society* 61:78-82, 1992
24. **David T. Yue and Eduardo Marban.** *J. Gen. Physiol.* 95:911-939, 1990.
25. **Jeffry B. Lansman, Peter Hess and Richard W. Tsien.** *J. Gen. Physiol.* 88:321-347, 1986.
26. **D. Enkvetchakul, L. Ebihara and C. G. Nichols.** Polyamine flux in *Xenopus* oocytes hemi-gap junctional channels. *J. Physiol.* 553.1:95-100, 2003