



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

**Especificidad en la regulación de
endocitosis por subunidades auxiliares del
canal de calcio en ovocitos de *Xenopus
Leavis***

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias
Médicas, mención en Biología Celular y Molecular**

NIEVES NAVARRO QUEZADA

Director de Tesis: Dr. Alan Neely Delgueil

FECHA: Abril, 2017



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

Especificidad en la regulación de endocitosis por subunidades auxiliares del canal de calcio en ovocitos de *Xenopus Leavis*

Nieves Navarro Quezada

Este trabajo se realizó bajo la supervisión del Director de Tesis Dr. Alan Neely Delgueil en el laboratorio de Biología Molecular del Centro Interdisciplinario de Neurociencia de Valparaíso y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Iván Montenegro
Presidente Comisión

Dr. Agustín Martínez
Profesor Informante

Dr. Álvaro Ardiles
Profesor Informante

Dr. Alan Neely Delgueil
Director de Tesis

**Valparaíso, Chile
2017**

DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo de tesis fue desarrollado dentro del proyecto Fondecyt 1161672 "Differential regulation of voltage-sensors in high voltage activated calcium channel" del Investigador responsable Dr. Alan Neely otorgado el año 2016, para el que se obtuvieron las aprobaciones certificadas por el Comité de Bioética y el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso (ver Anexos 1 y 2).

ABREVIATURAS

ABP	: Alpha binding pocket
AID	: Alpha interaction domain
CCAV	: Canales de Calcio activados por voltaje
CFU	: Unidades formadoras de colonias
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
DTT	: Ditioneitol
GK	: Dominio Guanilato Kinasa
HRP	: Horseradish peroxidase
IPTG	: Isopropyl- β -D-thiogalactoside
LB	: Medio de cultivo para bacterias Luria-Bertani
OD	: Densidad óptica
PBS	: Phosphate buffered saline
PD	: Pore domain
RGK	: Proteínas de la superfamilia RAS
RNA	: Ácido ribonucleico
RPM	: Revoluciones por minuto
SDS	: Dodecil sulfato sódico
SH3	: Dominio de homología a Src tipo 3
UFC	: Unidades formadoras de colonias
URL	: Unidades relativas de luminiscencia
VSD	: Voltage sensor domain

ÍNDICE

DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS.....	3
ABREVIATURAS.....	4
ÍNDICE.....	5
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
METODOLOGÍA.....	16
1.- DISEÑO EXPERIMENTAL.....	16
2.- BIOLOGÍA MOLECULAR.....	17
2. 1.- Cultivo de bacterias y obtención de células competentes.....	17
2. 2.- Transformación de bacterias competentes con ADN plasmidial.....	19
2. 3.- Obtención y purificación de ADN plasmidial.....	19
3.- BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS.....	20
3. 1.- Sobreexpresión de proteínas recombinantes.....	20
3. 2.- Cromatografía de afinidad.....	20
3.3.- Cromatografía de Exclusión Molecular.....	21
3.4.- Concentración final de la proteína.....	21
3.5.- Obtención del péptido GST-Dyn.....	22
4.- PREPARACIÓN DE OVOCITOS DE <i>Xenopus laevis</i>	22
4. 1.- Cirugía.....	22
4. 2.- Tratamiento de los ovocitos.....	23
4. 3.- Selección de ovocitos.....	23
5.- INYECCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	24
6.- CAPTACIÓN DE PEROXIDASA DE RÁBANO (HRP).....	24

7.- ENSAYO DE QUIMIOLUMINISCENCIA	25
8.- INMUNODETECCIÓN DE TUBULINA.....	26
9.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
RESULTADOS.....	28
1.- Las isoformas de la subunidad Cav β fueron obtenidas como proteínas recombinantes con alta pureza y concentración.....	28
2.- La subunidad Ca $v\beta_{3X0}$ es capaz de promover el ingreso de HRP desde el medio en ovocitos de Xenopus Leavis	33
3.- El estímulo en la endocitosis generado por las isoformas de la subunidad Cav β del CCAV puede ser interrumpido por la acción del péptido GST-Dyn.	36
DISCUSIÓN.....	38
1.- Las subunidades Cav β poseen variadas funciones a nivel fisiológico	39
2.- Los ovocitos de Xenopus Leavis probaron ser un buen modelo para el estudio de endocitosis.....	40
3.- El diseño experimental propuesto permitió cuantificar de manera confiable la incorporación de HRP al ovocito.....	41
4.- Trabajo futuro.....	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS.....	48
1.- Acta de evaluación Bioética.....	48
2.- Certificado de Bioseguridad.....	49
3.- Protocolo Eutanasia.....	50

RESUMEN

El calcio es uno de los mensajeros intracelulares más abundante, y media múltiples e importantes funciones en la célula. El transporte de calcio está principalmente controlado por los canales de calcio activados por voltaje (CCAV), que son proteínas multiméricas conformadas por una subunidad formadora del poro ($Cav\alpha_1$) y tres subunidades auxiliares (α_2 - δ , β y γ).

La interacción entre $Cav\alpha_1$ y la subunidad auxiliar β ($Cav\beta$) ocurre en un sitio denominado AID (alpha-interaction-domain), la unión de $Cav\beta$ al canal aumenta la expresión funcional del canal, presumiblemente por la liberación de proteínas del canal desde el retículo endoplásmico.

Existe evidencia que $Cav\beta$ no sólo participa del transporte del canal hacia la membrana plasmática, sino también que modula su función, específicamente aumentando la probabilidad de apertura de éste a voltajes fisiológicamente relevantes.

Trabajos anteriores de este laboratorio muestran que $Cav\beta_{2a}$ regula también la remoción de canales desde la membrana plasmática a través de una interacción con dinamina. Esta interacción requiere de la formación de dímeros de $Cav\beta_{2a}$, donde contribuye un puente di-sulfuro entre cisteínas expuestas.

En esta tesis se investigó si la isoforma $Cav\beta_{3x0}$ carente de esta cisteína promueve endocitosis dinamina-dependiente. Para esto se desarrolló un bio-ensayo de endocitosis que consistía en medir la captación de la enzima horseradish peroxidasa (HRP) por ovocitos de *Xenopus* inyectadas con distintas combinaciones de $Cav\beta$ previamente purificadas. Esto nos permitió demostrar que subunidades $Cav\beta$ promueven la endocitosis sin la presencia de la subunidad $Cav\alpha_1$. Se observó que $Cav\beta_{3x0}$ también es capaz de promover endocitosis de manera dinamina-dependiente pero con una eficacia un 50% menor.

Palabras clave: Canales de calcio, canales activados por voltaje, subunidad proteica, endocitosis, peroxidasa.

INTRODUCCIÓN

El Ca^{+2} constituye uno de los principales mensajeros intracelulares. Incrementos de Ca^{+2} citosólico inician una variedad de procesos intracelulares, entre ellos la contracción muscular, la secreción de neurotransmisores, la expresión génica, la modulación de la excitabilidad de la membrana, el crecimiento de neuritas, etc. Una de las vías más importantes para la entrada de Ca^{+2} en las células excitables son los canales de Ca^{+2} activados por voltaje (CCAV). La apertura de estos canales permite el flujo de iones Ca^{+2} , a través de un poro selectivo que da lugar a un incremento local de este mensajero intracelular (1). Los canales de Ca^{+2} son proteínas oligoméricas, constituidas por una subunidad principal, α_1 asociada a varias subunidades reguladoras o auxiliares, tales como las subunidades β , α_2 , $\alpha_2\text{-}\delta$ y γ (2). (Ver figura 1).

La subunidad formadora del poro ($\text{CaV}\alpha_1$) posee la estructura característica de un canal activado por voltaje, es decir, comprende cuatro dominios altamente homólogos que están conectados por lazos citoplasmáticos. Cada uno de estos cuatro dominios contiene seis segmentos transmembranales (S1-S6) organizados en un dominio sensor de voltaje (S1-S4) y un poro (S5-S6) (3), con los extremos amino y carboxilo terminal en el citosol celular (Figura 1). La subunidad accesoria $\text{Cav}\beta$ es codificada por 4 genes diferentes que dan lugar a diferentes variantes $\text{Cav}\beta_{1-4}$, estas variantes poseen una estructura similar, que consiste en dos regiones altamente conservadas, separadas y flanqueadas por secuencias de largos variables (4) (Figura 2). Estudios cristalográficos revelan que la primera región corresponde a un dominio homólogo al tercer dominio de una tirosina kinasa codificada por el oncogen *Src* (SH3), y la segunda, al dominio guanilato quinasa (GK) (5). La presencia de los dominios SH3 y GK en $\text{Cav}\beta$ lleva a relacionarla con las proteínas de andamiaje MAGUK. Esta familia de proteínas guanilato kinasa organizan vías de señalización intracelular mediante múltiples interacciones proteína-proteína.

Estos dos dominios presentes en $\text{Cav}\beta$ aportan una multiplicidad de posibles interacciones proteicas y además aporta la noción de que $\text{Cav}\beta$ es una proteína regulatoria multifuncional (6).

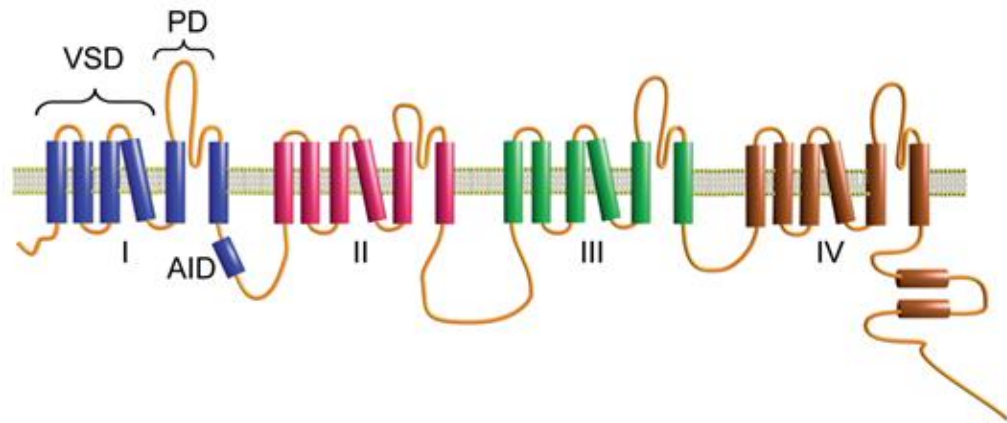


Figura 1: Estructura de la subunidad formadora del poro Cav α_1 . Topología de membrana de la subunidad Cav α_1 donde pueden apreciarse el dominio sensor de voltaje (VSD) y el dominio formador del poro (PD). Además, se destaca el sitio de anclaje de Cav β (AID por "alpha-interaction-domain"). Modificada de (7).

La subunidad Cav α_1 posee un sitio de interacción con la subunidad Cav β , ubicado en el lazo citoplasmático que une los segmentos S1 y S2, y que es conocido como AID (alpha-interaction-domain), a hélice que posee un triptófano esencial para la interacción con la subunidad Cav β (8,9), la unión de Cav β a este sitio produce un aumento en la expresión funcional del canal, presumiblemente facilitando la salida del canal desde el RE (10). La estructura cristalográfica del complejo Cav β con el motivo AID, muestran que este último interacciona con un bolsillo hidrofóbico de Cav β (Alpha binding pocket, ABP) conformado por residuos no contiguos en la secuencia, que forma parte del dominio GK (5,11,12).

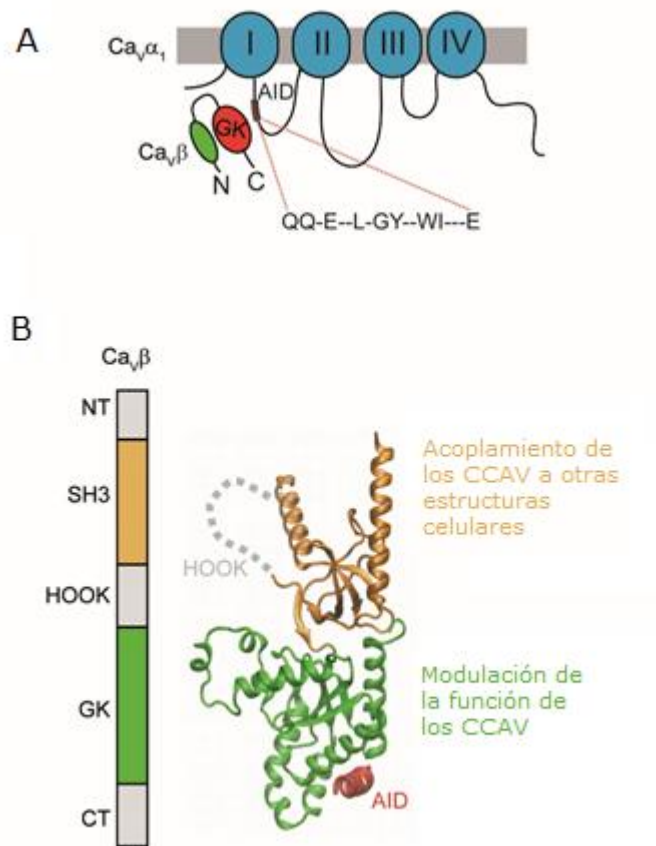


Figura 2: Estructura de la subunidad $Ca_v\beta$. A) Esquema de la interacción entre las subunidades α_1 y β , donde se puede apreciar la secuencia aminoacídica conservada en el sitio AID que se une al dominio GK de la subunidad β . B) Organización de los dominios y estructura tridimensional de la subunidad β . El dominio SH3 está en naranja y el dominio GK en verde unido por un lazo flexible (HOOK). NT se refiere al terminal amino, CT al terminal carboxilo. Modificada de (7)

$Ca_v\beta$ también tiene la capacidad de modular la función del canal, puesto que es capaz de potenciar la corriente iónica sin afectar la densidad aparente de canales en la superficie al ser co-expresada con $Ca_v1.2$ en ovocitos de *Xenopus Leavis* (13). Existe evidencia de la que subunidad $Ca_v\beta$ es capaz de interactuar con una variedad de proteínas, y de regular diversos procesos celulares(6) , desde

expresión de genes (específicamente la subunidad Cav β_{4c} (14)) hasta secreción hormonal (mediante la acción de Cav β_3 en células β pancreáticas de ratón(15)) y endocitosis (16,17). Existe evidencia que sugiere que la subunidad Cav β regula el tráfico hacia la membrana del canal ocluyendo señales de retención del retículo endoplásmico codificadas cerca del AID en las subunidades formadoras del poro (10). Otra hipótesis más reciente es que Cav β puede interactuar con proteínas de la Superfamilia RAS (7). Estas son pequeñas GTPasas que presentan una extensa variedad de funciones que incluyen desde modificaciones a lípidos de membrana hasta regulación de la expresión génica (18). Estas interacciones se suman a un extenso número de blancos regulatorios de Cav β lo que la convierte en crucial para el funcionamiento y regulación tanto de los CCAV como otros procesos fisiológicos (6). Dentro de esta lista se encuentra la interacción con dinamina, una GTPasa citosólica de 100 kDa, que es un componente esencial durante la endocitosis clásica dependiente de clatrina, el reciclaje de vesículas sinápticas y el tráfico vesicular desde y hacia el Golgi, puesto que polimeriza alrededor de la membrana invaginada, formando una especie de collar provocando una fisión y la recaptura vesicular (19,20).

Hasta ahora se han descrito 3 isoformas de dinamina; la isoforma 1 que se encuentra distribuida en neuronas y células neuroendocrinas, la isoforma 2, presente en distintos tipos celulares y la isoforma 3 ubicada en tejido testicular y sistema nervioso central (21). Su estructura primaria está conformada por multidominios (figura 3). En su extremo N-terminal se encuentra el dominio GTPasa que une e hidroliza GTP, además de un dominio homólogo a pleckstrin (PH), constituido por 100 residuos aminoacídicos e implicado en la unión a membranas, preferentemente a fosfolípidos de inositol, lo cual favorece su actividad GTPasa (22); un dominio efector de actividad GTPasa (GED) y un dominio rico en prolina y argininas (PRD) en el extremo C-terminal, el cual contiene varios sitios de unión a dominios con homología a Src3 (SH3) (23), desempeñando un papel importante en la unión a proteínas que presentan dominios SH3 como las que forman parte de la maquinaria endocítica como anfisina, endofilina e intersectina.

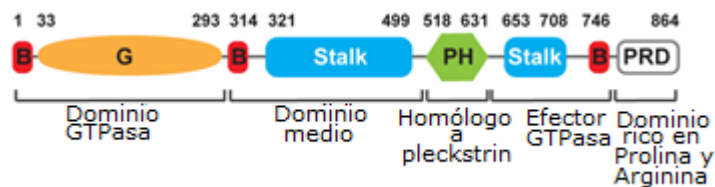


Figura 3: Dominios estructurales y funcionales de dinamina. Se muestran: dominio de hidrólisis de GTP (G), un dominio medio (Stalk 321-499), dominio homólogo a pleckstrin (PH), dominio efector de actividad GTPasa (Stalk 653-708), y dominio rico en prolina y arginina (PRD). Modificado de (24).

Debido a esta interacción entre la subunidad Cav β y dinamina, se estudió el efecto del dominio SH3 aislado sobre la función del canal de calcio y su expresión. El reclutamiento de dinamina por el dominio SH3 de Cav β_{2a} promueve la endocitosis de proteínas de membrana (17); sin embargo, para que esta unión exista, es necesaria la homodimerización de Cav β_{2a} . Experimentos con geles nativos mostraron que en presencia de reductores como el ditioneitol (DTT) desaparece la forma dimérica, lo que sugiere la formación de puentes di-sulfuro entre subunidades. Un mutante del dominio SH3 al que se le sustituyó la cisteína que participa en la dimerización por una alanina (C113A) no sólo no formaban dímeros, sino que tampoco estimulaban la endocitosis (16). Sin embargo, la proteína completa Cav β_{2a} , aún con la sustitución C113A forma dímeros, se une a dinamina y promueve la endocitosis. Esto pareciera indicar que la cisteína en posición 113 de Cav β_{2a} , inexistente en otras isoforma de Cav β , no es necesaria para la formación de dímeros que sería lo importante para unirse a dinamina y promover la endocitosis. En contraste con lo que ocurre con la asociación con dinamina, Cav β se une a la subunidad Cav α_1 en una estequiometría 1:1 (25) pero de manera reversible (26). Entonces cuando Cav β se disocia del canal, forma dímeros que promueven una endocitosis dinamina-dependiente. Esta última se previene con la co-expresión del mutante dominante negativo de dinamina K44A(17), mutación localizada en el dominio GTPasa de la proteína(24). Cav β disociada del canal se puede obtener utilizando un mutante de Cav1.2 al que se le eliminó el sitio de unión AID, o por la presencia de proteína de fusión como GST-AID que contiene el sitio de unión (17,27). Por otro lado, la interacción con dinamina puede ser interferida con GST-Dyn, un péptido que contiene los residuos 829 a 842 del dominio PRD de

dinamina. Estos residuos son esenciales para la interacción con el dímero del dominio SH3 de Cav β_{2a} (17). Al estar presente el péptido GST-Dyn se observó una disminución en la promoción de endocitosis inducida por Cav β_{2a} .

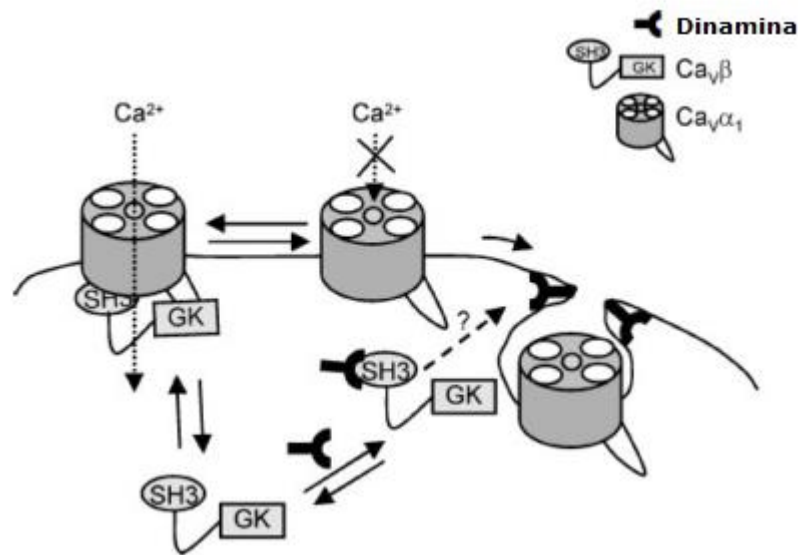


Figura 4: Modelo para la interacción entre Cav β y dinamina. La imagen representa que la asociación de Cav β con la subunidad Cav $\alpha_{1.2}$ oculta el dominio SH3. Una vez que la subunidad Cav β se disocia del canal es capaz de interactuar con dinamina para promover endocitosis. Modificado de (17)

La cisteína que media la formación de dímeros del dominio SH3 de Cav β_{2a} no está conservada en otras isoformas de la subunidad Cav β por lo que surge la interrogante si las subunidades beta que carecen de esta cisteína son capaces de promover la endocitosis. Un rol específico de Cav β_{2a} en una función celular básica como la endocitosis puede ser la responsable del grado de letalidad que produce una ablación de este gen (28), que contrasta con el fenotipo del K.O para Cav β_3 (15). Otra importante particularidad de Cav β_{2a} es que, junto a Cav β_{2e} , se ancla a la membrana. Estas particularidades llevaron a la pregunta de que si la capacidad de promover la endocitosis es compartida por otras subunidades Cav β . Con este fin me propuse investigar si la isoforma Cav β_{3xo} también es capaz de promover la endocitosis. Para este fin desarrollé un

bioensayo sencillo de endocitosis utilizando ovocitos de *Xenopus Laevis* que por su tamaño permiten la inyección de proteínas purificadas con buen control temporal y sin dañar la célula. Luego de explorar diversos métodos diseñé un ensayo sencillo y reproducible que se basa en la capacidad del ovocito de capturar la enzima peroxidasa (HRP) desde la solución. Para evaluar la participación de dinamina en este proceso investigué si la captación de HRP inducida por la inyección de subunidad Cav β_{2a} o Cav β_{3x0} era inhibida por el péptido GST-Dyn.

Este trabajo nos permite demostrar que la subunidad Cav β_{3x0} promueve la endocitosis independiente de la presencia de CCAV.

HIPÓTESIS

“La subunidad Cav β_{3x0} del CCAV tiene la capacidad de promover la endocitosis de una manera dinamina-dependiente”

OBJETIVO GENERAL

Determinar si Cav β_{3x0} es capaz o no de aumentar la endocitosis en la membrana plasmática de ovocitos de *Xenopus Leavis* y si este aumento es dinamina-dependiente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer los métodos para la producción de las subunidades Cav β_{2a} , Cav β_{3x0} y GST-Dyn como proteínas recombinantes.
2. Desarrollar un bioensayo de endocitosis que pueda ser intervenido por la inyección de proteínas recombinantes.
3. Comparar la capacidad de Cav β_{2a} y Cav β_{3x0} para promover la endocitosis y su sensibilidad a GST-Dyn.

METODOLOGÍA

1.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Para poder determinar el efecto que poseen dos isoformas de la subunidad Cav β del CCAV (Cav β_{2a} y Cav β_{3xo}), se elaboró una estrategia experimental que nos permitiera cuantificar la incorporación de una molécula detectable (enzima HRP) desde el medio hacia el interior de un ovocito de *Xenopus Laevis*. Cada ovocito fue inyectado con 50 nL de proteína en tampón de columna 1-1,5 mg/mL o con el mismo volumen de tampón de columna como control. Posteriormente los ovocitos fueron sumergidos en una solución de HRP 2 mg/mL durante diferentes tiempos.

Una vez finalizado el tiempo de incubación en HRP, los ovocitos fueron lavados con BSA al 5% y posteriormente lisados mecánicamente.

El lisado obtenido fue utilizado para medir actividad HRP y como patrón de carga se cuantificó de manera simultánea la cantidad de tubulina en 10 μ L de lisado.

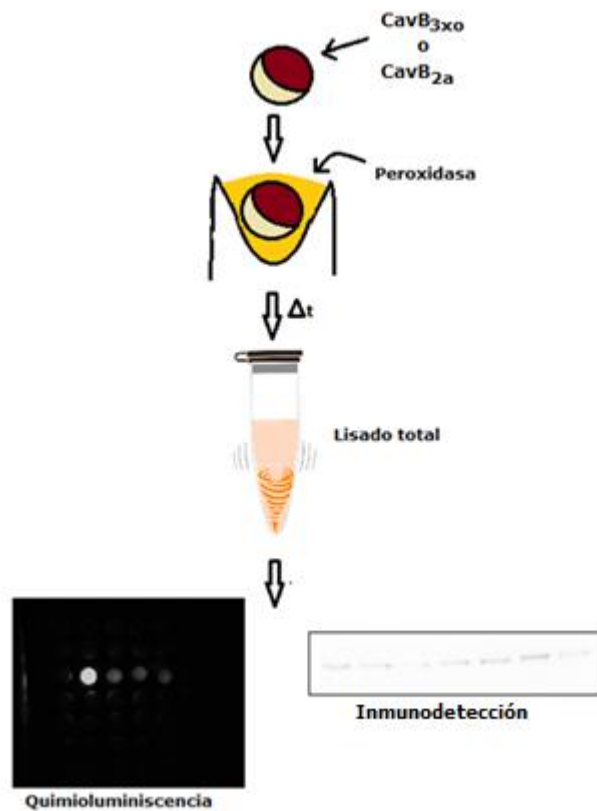


Figura 4: Diseño experimental. Esquema que grafica las etapas básicas del desarrollo de la estrategia experimental que nos permitirá responder a nuestra hipótesis. Imagen creada por Nieves Navarro.

2.- BIOLOGÍA MOLECULAR

2. 1.- Cultivo de bacterias y obtención de células competentes.

Tanto el ADN que codifica la subunidad Cav β _{2a} (Swiss-Prot: Q8VGC3) del CCAV de rata como la subunidad Cav β _{3xo} (Swiss-Prot: Q91629) del CCAV de *Xenopus Laevis* se subclonaron por métodos convencionales de PCR dentro del vector pRSET (invitrogen) para introducir una etiqueta de polihistidina en el extremo N-terminal. Para la amplificación del ADN se utilizó la cepa bacteriana XL1-Blue

(Agilent, USA) de acuerdo a sus características genéticas acordes para la amplificación de las secuencias clonadas en el vector pRset (Invitrogen, USA). Para la sobreexpresión de proteínas recombinantes se utilizó la cepa bacteriana BL21(DE) pLysS (Promega, USA) de acuerdo a sus características genéticas acordes para la sobreexpresión de proteínas clonadas en el vector pRset.

Los cultivos de bacterias se crecieron en un medio líquido Luria Bertani (LB) a 37°C con agitación orbital a 220 rpm. Para cultivo en medio sólido se suplementó el LB con agar-agar al 1,5%.

Todos los medios y materiales a utilizar fueron esterilizados a 121°C, 15 psi por 25 minutos.

Para las transformaciones llevadas a cabo en la cepa BL21(DE) pLysS se utilizaron bacterias competentes comerciales; y las realizadas en la cepa XL1-Blue se llevaron a cabo en bacterias hechas competentes en el laboratorio mediante el protocolo de cloruro de rubidio, que es un refinamiento del método de fosfato de calcio (29). 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 10 mL de medio SOB, incubándose a 37°C, 220 rpm durante toda la noche. Este cultivo fue diluido 1:100 en 100 mL de medio SOB y se dejó crecer hasta una OD (medida de turbidez, cuantificada en espectrofotómetro. Como una bacteria se multiplica en un medio líquido, éste se torna turbio o de aspecto nublado por las células. Aproximadamente de 10 millones a 100 millones de células por mililitro son necesitadas para hacer una suspensión suficientemente turbia para leer en el espectrofotómetro(30)) entre 0,5-0,6 unidades de absorbancia a 550 nm. Los cultivos fueron sedimentados a 4800 g por 15 min a 4°C, luego, se resuspendieron en buffer TbI (30 mM CH₃CO₂K, 50 mM MnCl₂, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 12%(p/v) glicerol, pH 5,8) y se incubaron por 2 h en hielo. Se volvió a sedimentar en las condiciones anteriores y se resuspendió suavemente en buffer TbII (75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 12%(p/v) glicerol, pH 7,0) y se incubaron 90 min en hielo. Posteriormente se alicuotaron y se congelaron en nitrógeno líquido almacenándose a -80°C.

El nivel de competencia de las bacterias obtenidas por este método es de 1×10^8 UFC/ μ g DNA plasmidial.

2. 2.- Transformación de bacterias competentes con ADN plasmidial.

La transformación de bacterias competentes con ADN plasmidial se llevó a cabo por métodos estándares (29) que consiste en descongelar las bacterias en hielo durante 10 minutos para luego agregar 1 ng de ADN plasmidial e incubar en hielo por 30 minutos. Posteriormente, las bacterias fueron sometidas a shock térmico en un baño seco a 42 °C por dos minutos, dejándolas luego en hielo por 2 minutos más. Las bacterias transformadas se incubaron durante 1 hora a 37 °C en medio mínimo con agitación vigorosa. El cultivo fue transferido luego a placas Petri con medio LB más ampicilina 50 µg/mL como medio de selección. Se mantienen a 37°C por 16 horas antes de coleccionar colonia. Se pican dos o tres colonias, y se dejan crecer durante 6-8 horas a 37 °C en 5 mL de medio LB más ampicilina. De este pre-inóculo se toma 1 mL y se diluye en 500 mL de medio fresco. Se deja crecer 16 horas y se continúa con la purificación del ADN plasmidial.

2. 3.- Obtención y purificación de ADN plasmidial

El ADN se extrajo de un cultivo de bacterias de 500mL transformadas con el plásmido de interés y se creció durante toda la noche (12-16 h) a 37 °C a 220 rpm. La extracción se realizó con preparaciones de columnas Maxiprep según indicaciones del fabricante (Qiagen Inc, USA), que permite obtener hasta 1µg de ADN plasmidial por mL de cultivo.

La cuantificación del ADN obtenido es realizada por espectrofotometría, midiendo absorbancia a 260 nm.

3.- BIOQUÍMICA DE PROTEÍNAS

3. 1.- Sobreexpresión de proteínas recombinantes

Para poder sobre expresar y posteriormente purificar las proteínas recombinantes, se utilizaron constructos asociados al vector pRset (Invitrogen, USA), que fue diseñado para generar altos niveles de expresión procariótica, controlados por el promotor T7. La cepa bacteriana utilizada corresponde a la BL21(DE) pLysS (Promega, USA) que posee la secuencia para sintetizar T7 RNA polimerasa bajo el control genético del operón *lac*, inducible por IPTG (ver figura 7).

La proteína de interés se extrajo de un cultivo de bacterias transformadas con el plásmido correspondiente, que se hizo crecer hasta una OD de 0,5 a 550 nm. Una vez alcanzada esta condición se induce la sobreexpresión de la proteína al agregar IPTG a una concentración específica (0,5 mM) y se deja crecer durante 2 horas a 37 °C.

Posteriormente las bacterias son lisadas en tampón de lisis (en mM: 50 NaPO₄, 300 NaCl, pH 8,0, estéril) más inhibidores de proteasas (cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche) mediante sonicación. El homogenado de bacterias es centrifugado a 15000 rpm durante 30 min a 4 °C. Se recupera el sobrenadante para comenzar el proceso de purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad.

3. 2.- Cromatografía de afinidad

Las proteínas purificadas durante el desarrollo de esta tesis poseen una etiqueta de 6 Histidinas (His-tag) que posee afinidad a ciertos metales como el Ni y el Co. Es por esta razón que para realizar la cromatografía de afinidad se utilizó como matriz una resina de agarosa que posee iones níquel inmovilizados (Ni-NTA Agarose, Qiagen) y se siguieron las indicaciones del fabricante. Siguiendo el protocolo sugerido se puede obtener 5 mL de solución con una pureza superior al 90%.

3.3.- Cromatografía de Exclusión Molecular

El objetivo de este procedimiento, es separar la proteína de interés de todas aquellas que pudiesen presentar afinidad por níquel y que quedaron retenidas durante la cromatografía de afinidad.

El principio de la cromatografía de exclusión molecular consiste en separar proteínas por tamaño, de esta manera es posible obtener la proteína con una alta pureza.

Para esto, los 5 mL recolectados como eluato en la cromatografía de afinidad fueron cargados en una columna de dextrano/agarosa que permite separar por exclusión de tamaño molecular (Hiloadd 16/60 Superdex 200 prep grade. Amersham Bioscience), esta columna permite la separación moléculas de entre 10 y 600 KDa. Se eluyó la columna con tampón de columna (en mM: 20 Tris-HCl; 300 NaCl; 1 EDTA; pH 8,0) con un flujo de 1 mL/min. Se colectaron fracciones de 1,5 mL, utilizando el equipo AktaPrime Plus, que mide la absorbancia del eluato a 280 nm en forma continua.

Se recuperaron las fracciones más concentradas y que eluyen en la región correspondiente al péptido en cuestión.

3.4.- Concentración final de la proteína

Para conseguir una mayor concentración de proteína, el eluato obtenido (6-7,5 mL) es sometido a ultrafiltración con filtros cuyo corte era un peso molecular de 30 KDa, aproximadamente 0,5 veces los 55 o 73 KDa de las proteínas de interés (Cav β _{3x0} y Cav β _{2a}, respectivamente) mediante concentradores de proteínas (Amicon Ultra centrifugal filter units Ultra-15, MWCO 30 kDa, Millipore) en centrifugaciones seriadas a 7500 g, de 15 minutos cada una a 4 °C, hasta alcanzar una concentración final mayor o igual a 1 mg/mL de proteína.

3.5.- Obtención del péptido GST-Dyn

El péptido GST-Dyn829-842 corresponde a los residuos 829-842 (PPQVPSRPNRAPPG) del dominio PRD de la dinamina-1 humana (Swiss-Prot entrada: Q05193). La secuencia de nucleótidos que codifica el péptido GST-Dyn829-842 fue ligada al vector pGEX (GE Healthcare Life Sciences). Tanto el vector pGEX vacío (GST solo) y el vector pGEX que contenía la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido GST-Dyn829-842 fueron expresados en bacterias E.Coli BL-21 y purificados utilizando una proteína de fusión glutatión S-transferasa (GST) que interacciona con moléculas de glutatión inmovilizadas en resinas de agarosa(26). Esta construcción fue diseñada en el laboratorio de la Dra. Patricia Hidalgo y replicada por el laboratorio de la Dra. Ana María Cárdenas.

4.- PREPARACIÓN DE OVOCITOS DE *Xenopus laevis*.

4. 1.- Cirugía

Ranas hembras adultas de la especie *Xenopus laevis* fueron anestesiadas por inmersión en 0,5% (p/v) de 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.

Las ranas recién operadas son colocadas en un estanque de recuperación hasta que desaparezcan los efectos de la anestesia.

Cuando las ranas han sido operadas 4 o más veces, o en caso de que produzcan ovocitos de baja calidad, son sometidas a eutanasia según protocolo aprobado por el Comité de Bioética de la UV (ver Anexo3).

4. 2.- Tratamiento de los ovocitos

Los lóbulos son desmembrados manualmente en grupos de 5 a 10 ovocitos y luego defoliculados por digestión enzimática con colagenasa tipo D (Roche, Germany) en OR2 (en mM: 82,5 NaCl, 2,5 KCl, 1 MgCl₂, 5 HEPES, pH 7,6) a 18°C con agitación suave por aproximadamente 50 minutos. Luego son lavados varias veces con SOS (en mM: 100 NaCl, 1MgCl₂, 1,8 CaCl₂, 2,5 KCl, 5 HEPES, pH 7,6), y se dejan en agitación muy suave a 18°C hasta el día del experimento (24 horas).

4. 3.- Selección de ovocitos.

Ovocitos estado V y VI son seleccionados para inyección de proteínas y tampón de columna (como control) con micropipetas de vidrio (WPI, Sarasota, FL. USA) utilizando un nano-inyector (Drummond Scientific Co).

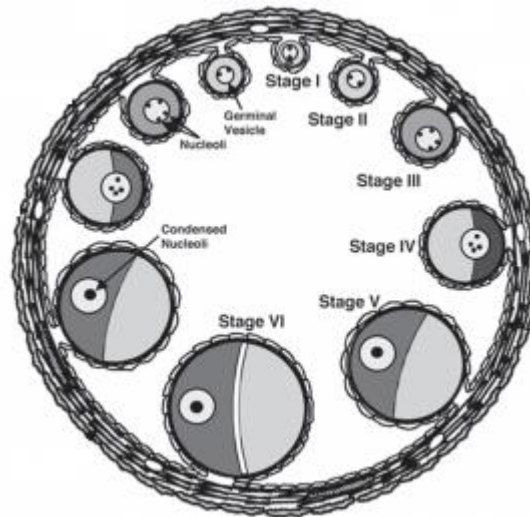


Figura 5: Esquema del desarrollo de ovocitos de *Xenopus Laevis*. Se puede apreciar la evidente diferencia de tamaño entre ovocitos con diferente grado de desarrollo, además de graficar la aparición de la banda ecuatorial entre los hemisferios animal y vegetal en los ovocitos en estado VI.

Modificada de (31)

5.- INYECCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Cada ovocito se inyectó con un volumen de 50 nL de proteína en concentraciones de 1- 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en tampón de columna. Luego de la inyección los ovocitos eran mantenidos en placas Petri a 18°C en un tampón salino con la siguiente composición: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 5 mM Hepes, 2,5 mM NaHCO_3 , 0,7 mM CaCl_2 , pH 7,8).

Se inyectaron varias combinaciones de proteínas diferentes:

- $\text{Ca}_v\beta_{3x0}$ sola
- $\text{Ca}_v\beta_{3x0}$ más GST-Dyn
- $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ sola
- $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ más GST-Dyn
- GST-Dyn sola
- Tampón de columna (como control)*

*Tampón de columna corresponde al buffer utilizado para eluir la proteína durante la cromatografía de exclusión molecular (en mM: 20 Tris- HCl; 300 NaCl; 1 EDTA; pH 8,0)

6.- CAPTACIÓN DE PEROXIDASA DE RÁBANO (HRP)

Para medir la captación de HRP desde el medio se adaptó el método propuesto por (32).

Los ovocitos inyectados (mencionados en el punto 5.-) fueron incubados en presencia de HRP (2 mg/mL en PBS, USBiological) a 18°C. Luego de un tiempo predeterminado los ovocitos se lisan en forma individual en 200 μL de solución salina con la siguiente composición (en mM: 138 NaCl, 3 KCl, 8,1 Na_2HPO_4 , 2,0 KH_2PO_4) con 0,1% Tritón X-100 y son centrifugados 5 min a 500g dos veces. Se dejó un grupo de ovocitos sin exponer a HRP como valor a tiempo 0.

Un volumen de lisado (50 μL) se mezcla con SDS-Loading Buffer 2X, y se guarda para inmunodetección.

7.- ENSAYO DE QUIMIOLUMINISCENCIA

En la cámara de revelado (ver figura 6) se agregan 5 μL del lisado de cada ovocito junto con 10 μL de mezcla de reactivo quimioluminiscente (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific) y se registra intensidad de emisión a los 30 s con el sistema Epichemi 3 Darkroom.

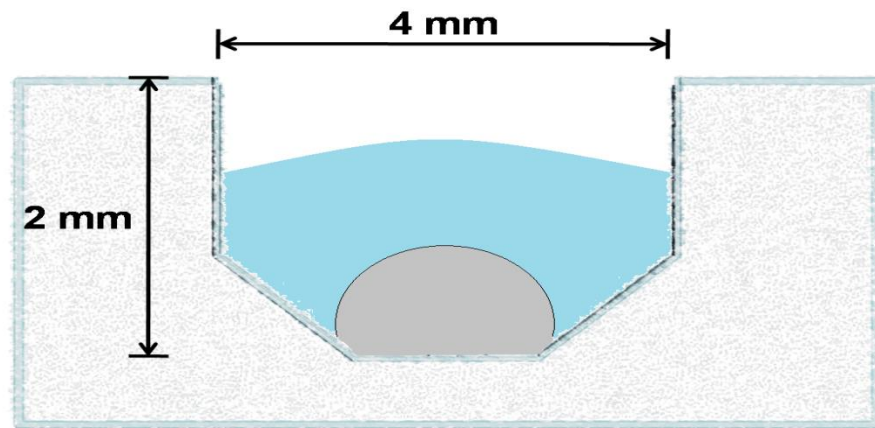


Figura 6: Cámara de revelado para ensayo de quimioluminiscencia. La separación de ambas soluciones (lisado y mezcla de reactivo) es sólo ilustrativa, en el momento del registro ambas soluciones son homogenizadas. Imagen creada por Nieves Navarro.

Se individualiza cada ovocito registrado como muestra para electroforesis y posterior inmunodetección de tubulina.

8.- INMUNODETECCIÓN DE TUBULINA

Se realizó electroforesis de proteínas denaturante en un gel de poliacrilamida al 12% a 100 V durante dos horas aproximadamente.

La proteína a detectar como patrón de carga, tubulina, pesa 55KDa. La cuantificación de luminiscencia del patrón de carga se realizará de manera simultánea a la generada por la HRP de los lisados.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas son transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). La transferencia se realiza en tampón de transferencia (en mM 25 Tris, 192 Glicina, 20% metanol pH 8,3) a 550 mA durante 90 min en hielo.

Una vez que las proteínas son transferidas a la membrana, ésta es bloqueada con una solución de 5% BSA en TBS (en mM: 150 NaCl, 2,8 KCl, 25 Tris, pH 7,4), durante 90 min.

Posteriormente, la membrana es incubada con un anticuerpo primario anti-tubulina (sheep polyclonal antibody, Cytoskeleton) en una dilución de 1:2000 en 5% BSA-TBS durante la noche.

Se lava tres veces durante 10 minutos con TBS al que se le añade 0,1% de detergente Tween 20. Se incuba con anticuerpo secundario (Sheep IgG HRP-conjugated antibody, R&D Systems) en dilución 1:5000 en 5% BSA-TBS durante 90 min. Se lava y se revela con mezcla de reactivo quimioluminiscente (SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific) con el sistema Epichemi 3 Darkroom.

9.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los grupos de datos pertenecientes a cada condición experimental fueron analizados usando la prueba t de Student de dos colas para muestras pareadas. Diferencias estadísticas de $p < 0,01$ fueron consideradas significativas.

RESULTADOS

1.- Las isoformas de la subunidad Cav β fueron obtenidas como proteínas recombinantes con alta pureza y concentración.

EL ADN purificado fue obtenido a concentraciones entre 2,0-3,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. La pureza fue determinada midiendo absorbancia a la solución a 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm corresponde a ácidos nucleicos, y la absorbancia a 280 nm a proteínas, por lo tanto, se espera obtener una razón de absorbancias 260/280 lo más cercana a 2.

Para visualizar que el ADN purificado corresponda sólo al plasmidial buscado, se realiza electroforesis en geles de agarosa al 1% p/v.

Una vez que se obtuvo DNA se transformaron bacterias BL21(DE) pLysS y se procedió a la etapa de sobreexpresión proteica.

Para poder evaluar las condiciones óptimas para la sobreexpresión de cada subunidad se realizaron pruebas de inducción que nos permitieran determinar, en manera específica, en qué condiciones se debería llevar a cabo la inducción. Para esto, se expuso una misma colonia de cultivo bacteriano a distintas condiciones de inducción (figura 7)(concentración IPTG, Tiempo), y de cada una de ellas se tomó una alícuota para correr un gel de acrilamida y teñir con Azul de Coomassie(33), que nos permite teñir de azul todas las bandas de origen proteico en el gel.

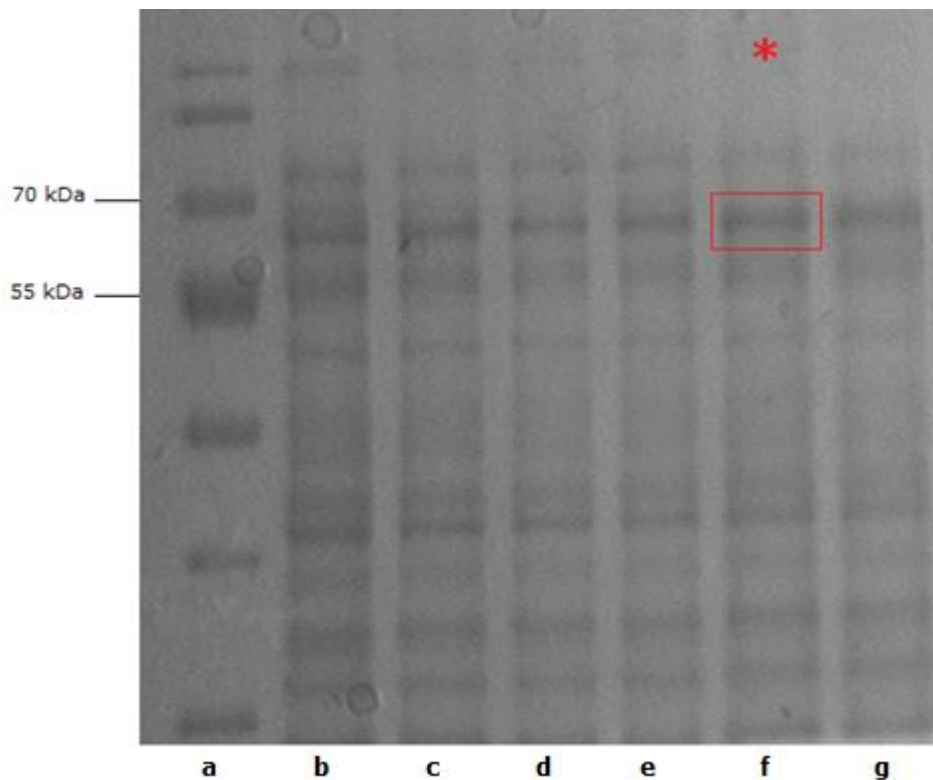


Figura 7: Selección condiciones óptimas de sobreexpresión. Gel de acrilamida al 9% teñido con Azul de Coomassie, donde se pueden apreciar las bandas correspondientes a las cantidades de proteínas obtenidas a distintas condiciones de sobreexpresión: a) Escalera; b) 0,5 mM IPTG por 60 min; c) 1,0 mM IPTG por 60 min; d) 0,5 mM IPTG por 90 min; e) 1,0 mM IPTG por 90 min; f) 0,5 mM IPTG por 120 min; g) 1,0 mM IPTG por 120 min. Todas las pruebas fueron realizadas a 37 °C. Se escogió las condiciones correspondientes al carril identificado con el asterisco rojo(f) que corresponde a una inducción con 0,5 mM de IPTG por 120 minutos.

La estimación de las condiciones óptimas fue realizada según criterios visuales, no se utilizaron herramientas computacionales ni cuantitativas de ningún tipo. Se determinó que las condiciones óptimas de sobreexpresión para ambas subunidades fueron: 0,5mM de IPTG, durante 120 minutos a 37°C (línea f en Figura 7).

Una vez establecidas las condiciones óptimas de inducción se reprodujeron en un cultivo de 500 mL, el que se dejó crecer hasta alcanzar una densidad óptica

OD de 0,5-0,6 a 550 nm, en ese momento se agregó 250 μ L del inductor (IPTG) 1M y se dejó crecer durante 120 minutos a 37°C en agitación de 220rpm. Este cultivo fue lisado de acuerdo a lo descrito en el punto 6.- de Metodologías y durante el proceso de purificación se llevó un control para pesquisar que la proteína no se perdiera durante el proceso. Este consistía en tomar alícuotas de las soluciones donde estaba contenida la proteína en cada etapa del proceso de purificación, y cada una de ellas fue visualizada en un gel de acrilamida al 9% teñido con Azul de Coomassie (ver figura 8).

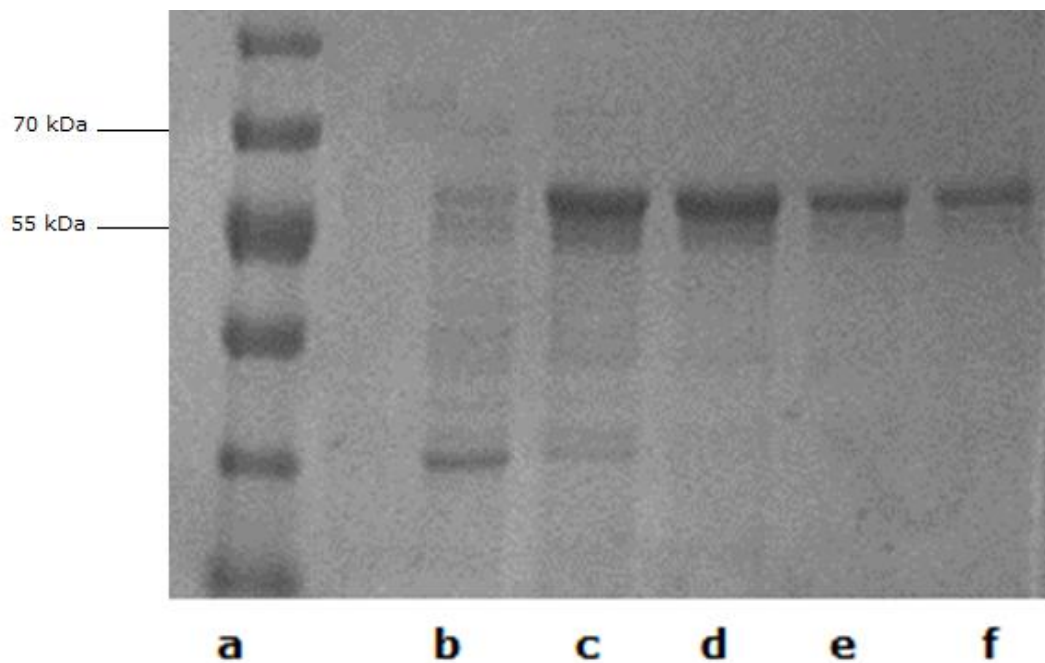


Figura 8: Purificación y concentración de proteínas. Gel de acrilamida al 9% teñido con Azul de Coomassie, donde se pueden apreciar las bandas correspondientes a las diferentes etapas del proceso de purificación. a) Escalera; b) lisado total; c) eluato afinidad; d) proteína concentrada; e) y f) corresponden a alícuotas guardadas y descongeladas, para evaluar estabilidad.

Con el fin de eliminar la contaminación por aquellas proteínas o péptidos que pudiesen presentar también afinidad por Ni, y que pudieron ser eluidos en la cromatografía por afinidad, se realiza una segunda etapa de purificación que consiste en una cromatografía de exclusión molecular, la que nos permitió

separar las proteínas según tamaño, para seleccionar así las que correspondían a la proteína buscada.

El eluato de la cromatografía de afinidad es cargado en la columna de exclusión (superdex 200 HR 10/30) y se eluye según lo indicado anteriormente para obtener un perfil de elución. La subunidad $\text{Ca}_v\beta_{3x0}$ eluye aproximadamente en 72 mL. En la zona de elución de $\text{Ca}_v\beta_{3x0}$ se observan dos picos, el primero (y el más pequeño) corresponde a la forma multimérica, mientras que el segundo corresponde a la forma monomérica de la proteína; para determinar esto se utilizó como referencia los perfiles de elución obtenidos para otras subunidades $\text{Ca}_v\beta(4,17,34)$.

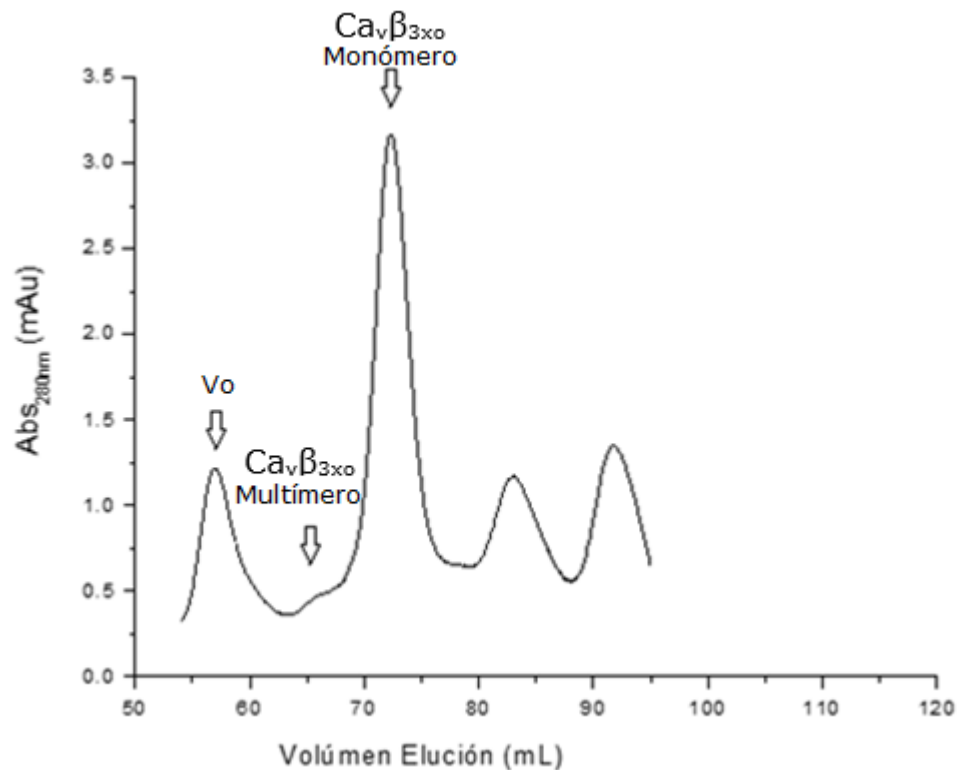


Figura 9: Perfil de elución de la subunidad $\text{Ca}_v\beta_{3x0}$. En la curva se observan los picos correspondientes al volumen muerto de la columna (Superdex 200 HR), y los picos correspondientes a la elución de $\text{Ca}_v\beta_{3x0}$. El pico de la forma multimérica es apenas apreciable, pero existe.

Para determinar que la estabilidad en la estructura y plegamiento de la proteína no se vea afectada por el congelamiento y posterior descongelamiento se cargó una muestra congelada a -80°C durante al menos un mes en una columna Superdex 200 5/150 (Amersham Bioscience) de exclusión molecular, que posee un V_0 de 3 mL, lo que permite utilizar un volumen de muestra mucho menor, comparado con la columna Superdex 200 HR, cuyo V_0 supera los 55 mL.

Tal como se esperaba, no se aprecian modificaciones en el perfil de elución de $\text{Ca}_v\beta_{3x0}$ post congelamiento, lo que nos da garantías de que la proteína que se inyecta en los ovocitos mantiene su plegamiento nativo.

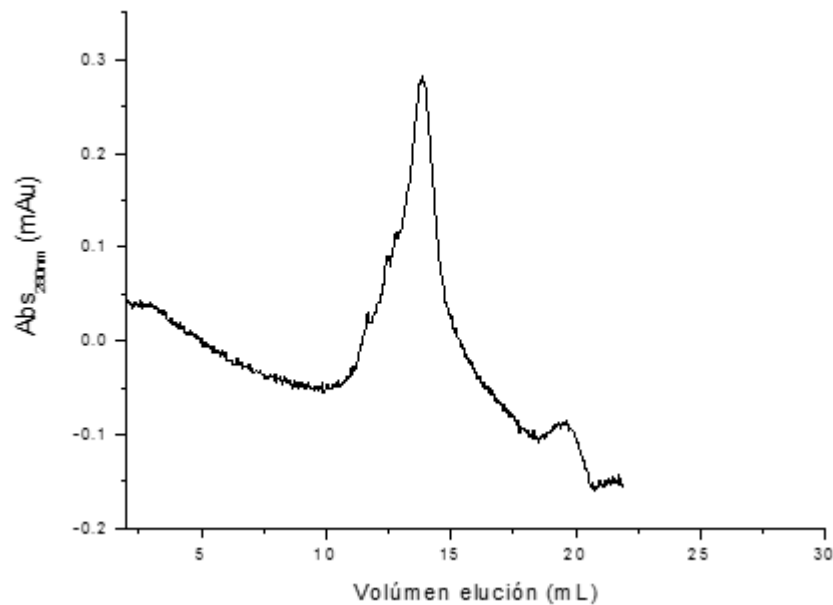


Figura 10: Perfil de elución subunidad $\text{Ca}_v\beta_{3x0}$ post- congelación. En el perfil de elución post-congelación se observa una distribución monodispersa, lo que supone mantención de la estructura proteica intacta

2.- La subunidad $\text{Ca}_v\beta_{3Xo}$ es capaz de promover el ingreso de HRP desde el medio en ovocitos de *Xenopus Leavis*

Como método experimental inicial, se propuso cuantificar la expresión de CCAV en superficie de ovocitos de *Xenopus Leavis* utilizando un constructo de $\text{Cav}\alpha_1$ que contenía un epítotope HA en el lazo extracelular entre los segmentos S5 y S6 del dominio II (26). Luego los ovocitos eran inyectados con las proteínas $\text{Cav}\beta$. Con el fin de poder inmunodetectar la cantidad de canales que permanecían en la membrana, los ovocitos eran fijados en formaldehído 4% para posteriormente realizar el protocolo de inmunodetección.

Sin embargo, luego de muchos intentos se obtuvieron valores inconsistentes, donde ovocitos con muy baja expresión del CCAV presentaban valores muy altos de luminiscencia a pesar de no haber permeabilizado los ovocitos. Se buscó en bibliografía (35–37) y nos percatamos de que el formaldehído y prácticamente todos los reactivos utilizados en la fijación de tejidos y células generan pequeñas fisuras en la membrana, las que eran lo suficientemente grandes como para permitir el acceso del anticuerpo primario a los canales cercanos a la membrana, pero no activos.

Para ver si la fijación con formaldehído dañaba la membrana del ovocito, ovocitos fijados fueron sometidos a tinciones con el colorante vital Azul de Tripano y se pudo corroborar que un alto porcentaje de ovocitos fijados dieron positivo.

Por esta razón, para poder determinar de manera cuantitativa si las subunidades $\text{Cav}\beta$ son capaces de promover endocitosis, se diseñó una estrategia experimental modificada de Mukhopadhyay A, et al. 1997(32). Ésta consiste en realizar un ensayo enzimático de HRP, que ingresa del medio al interior de los ovocitos vía endocitosis, a través de una reacción con sustrato quimioluminiscente que posee luminol. En presencia de HRP y peróxido, el luminol se oxida y forma un producto de estado excitado que emite luz a 455nm(38), a medida que desciende hasta el estado fundamental. Los fotones emitidos son captado a través de un sistema de adquisición de imágenes de alta sensibilidad provisto de una cámara CCD enfriada a $-40\text{ }^\circ\text{C}$ que permite integrar la energía captada por tiempos prolongados para mejorar la sensibilidad

(Epichemi 3 Darkroom, UVP) con el software LabWorks 4.6 (Media Cybernetics, Inc). Para nuestro ensayo se integraron las imágenes durante 30 s.

Se obtuvieron así señales de luminiscencia variables para cada condición y de manera individual para cada ovocito.

En el trabajo de Mukhopadhyay (32), normalizan la intensidad de señal por ovocito; sin embargo, debido a que los ovocitos no son del mismo tamaño, y todos son lisados en el mismo volumen de buffer de lisis, se decidió realizar un Western Blot para tubulina que es revelado en el mismo sistema y de manera simultánea (ver figura 11). La luz cuantificada en la imagen del western blot se usó como patrón de carga.

Tanto para el ensayo de luminiscencia como para la inmunodetección se utilizaron volúmenes constantes de lisado para todos los ovocitos (5 μ L en luminiscencia, y 10 μ L en la inmunodetección).

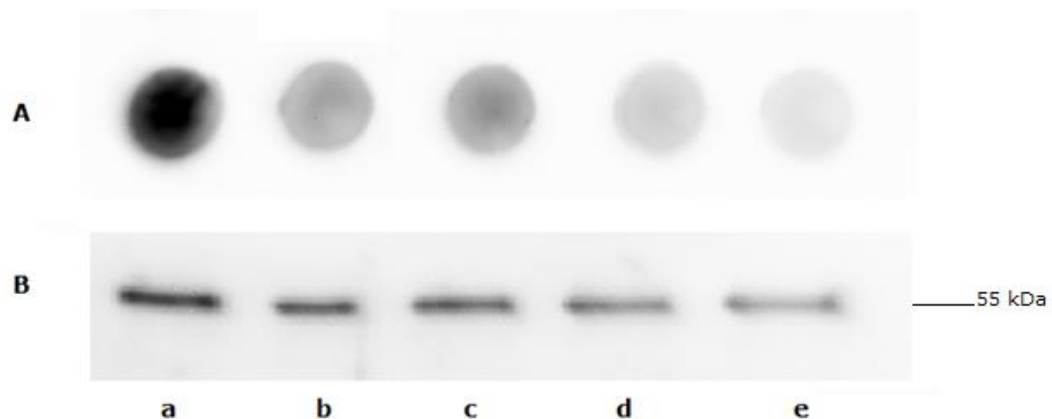


Figura 11: Imagen representativa de la detección de luminiscencia (A) y de inmunodetección contra tubulina (B) del lisado del mismo ovocito.

a, lisado de ovocito inyectado con Cav β_{2a} ; b, lisado de ovocito inyectado con Cav β_{2a} + GST-Dyn; c, lisado de ovocito inyectado con Cav β_{3x0} ; d, lisado de ovocito inyectado con Cav β_{3x0} + GST-Dyn; e, lisado de ovocito inyectado con tampón de columna. Tiempo de Inyección para todas las condiciones: 90 minutos.

Para poder establecer las diferencias entre cada ovocito y comparar así cada una de las condiciones se consideraron las razones (URL peroxidasa/ URL tubulina).

Lo primero que se determinó fue el curso temporal de la incorporación de HRP a los ovocitos mediante procesos de endocitosis al ser éstos inyectados con ambas subunidades del CCAV, $\text{Cav}\beta_{2a}$ y $\text{Cav}\beta_{3x0}$ (ver figura 12). Tal como se ha mencionado anteriormente, la inyección de la subunidad $\text{Cav}\beta_{2a}$ induce endocitosis a través de su interacción con dinamina (17). En nuestras condiciones experimentales observamos que $\text{Cav}\beta_{2a}$ induce la incorporación de HRP vía endocitosis (Figura 12). Esta incorporación fue significativa a partir de los 30 minutos de incubación con HRP. Interesantemente, encontramos que $\text{Cav}\beta_{3x0}$ también induce la incorporación de HRP aunque en una menor magnitud a como lo hace la $\text{Cav}\beta_{2a}$, la cual sólo fue significativamente diferente del control luego de 90 minutos de incubación con HRP.

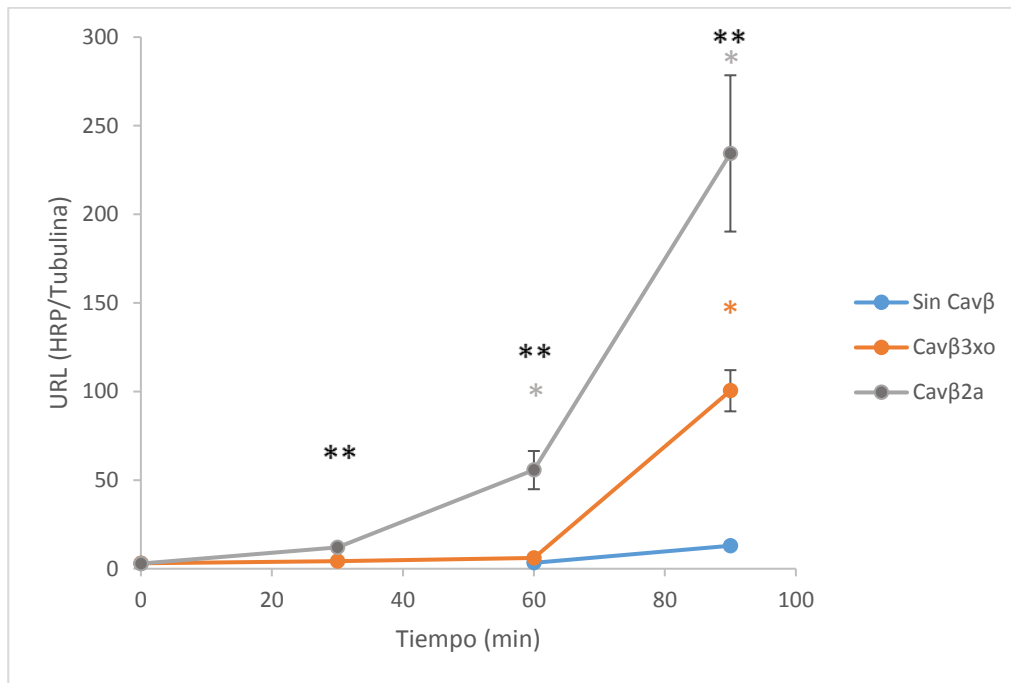


Figura 12: Efecto de isoformas de Cavβ en el ingreso de HRP. La gráfica muestra el aumento en los niveles de HRP en lisado de ovocito inyectado con dos isoformas de la subunidad Cavβ del CCAV. * indica diferencias significativas respecto del control, ** indica diferencias significativas entre ambas isoformas (Test de student $p < 0.01$).

3.- El estímulo en la endocitosis generado por las isoformas de la subunidad Cavβ del CCAV puede ser interrumpido por la acción del péptido GST-Dyn.

Con el fin de evaluar si la subunidad Cavβ_{3xo} promueve la endocitosis en una manera dependiente de dinamina, realizamos mediciones de la incorporación de HRP en presencia del péptido GST-Dyn, el cual compite con dinamina por la unión de la subunidad Cavβ. Como se observa en la figura 13, observamos que la co-inyección de GST-Dyn reduce significativamente la incorporación de HRP a 90 minutos de incubación, inducida por ambas subunidades Cavβ (Figura 13). Así Cavβ_{2a} + GST-Dyn produjo una disminución del 72% mientras que Cavβ_{3xo} produjo una disminución del 42%.

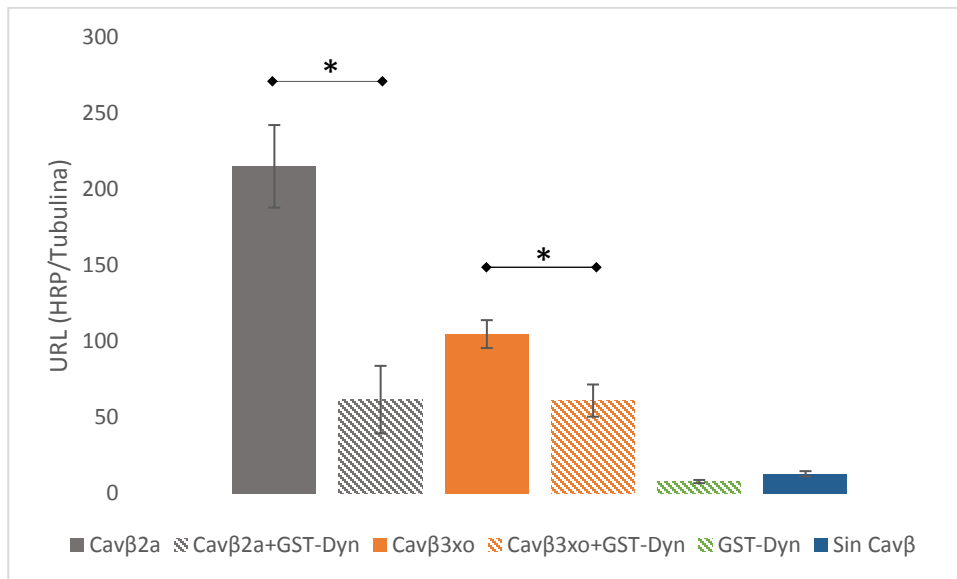


Figura 13: El péptido GST-Dyn disminuye el efecto estimulante de la incorporación de HRP por isoformas de Cavβ. La gráfica muestra las diferencias entre los niveles de actividad HRP en lisado de ovocito inyectado Sin Cavβ (tampón de columna), con la subunidad Cavβ_{2a}, con Cavβ_{2a} +GST-Dyn, con la subunidad Cavβ_{3xo}, con Cavβ_{3xo} + GST-Dyn y con el péptido GST-Dyn (como control) para determinar interacción con dinamina. *indica diferencias significativas. (Test de student $p < 0.01$).

Los datos mostrados en la figura 13 que corresponden al efecto en la incorporación de HRP en ovocitos inyectados sólo con las subunidades Cavβ son los mismos que se utilizaron en la figura 12 para el punto a 90 minutos.

Estos resultados demuestran que ambas isoformas promueven la endocitosis de manera dinamina-dependiente pero que Cavβ_{3xo} es mucho menos efectivo en este proceso a la concentración de trabajo (1-1,5mg/mL).

DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de esta tesis, logramos cumplir con todos los objetivos propuestos, llegando a la conclusión de que la isoforma Cav β_{3xo} es capaz de promover endocitosis, mediante interacción con dinamina, aunque con una eficacia disminuida en comparación con Cav β_{2a} . Este hallazgo es muy interesante, puesto que esta función sólo había sido demostrada para la subunidad Cav β_{2a} ; aportando así el conocimiento de una nueva función atribuible a las subunidades Cav β mediante un mecanismo común a través de su interacción con dinamina. Existe sin embargo una gran diferencia entre ambas subunidades Cav β y es que Cav β_{2a} posee, en su sitio 113 una cisteína fundamental para su dimerización(16), la que no tiene Cav β_{3xo} .

Existe además otra importante diferencia entre ambas subunidades Cav β , el mutante doble knockout para Cav β_{3xo} en ratones, es totalmente viable, no presenta problemas en su desarrollo, es fértil, y al analizar el tejido pancreático, tampoco se aprecia modificaciones en la cantidad de subunidad Cav β_{2a} presentes, lo que hace pensar que no existe algún método compensatorio para las subunidades Cav β . Sólo se reportaron alteraciones en la secreción de insulina (15). Por el contrario, el mutante knockout para Cav β_{2a} , también en ratones, no es capaz de sobrevivir más allá de 11 días de desarrollo embrionario. Estos embriones muestran serias alteraciones en la morfología del corazón en desarrollo. Se observa conductos cardíacos amorfos distorsionados dentro de la cavidad pericárdica, lo que impide el desarrollo y sobrevivencia del individuo(28). Estos antecedentes revelan un rol específico a esta isoforma de la subunidad Cav β que sería interesante ver si se correlaciona con su mayor potencial en la regulación de procesos de tráfico vesicular dependiente de dinamina.

1.- Las subunidades Cav β poseen variadas funciones a nivel fisiológico

Desde su descubrimiento el año 1987 por el equipo de Takahashi (39), la subunidad Cav β ha sido fuente de muchos estudios que han permitido determinar variadas funciones dentro de la célula. Actualmente, existe claridad de que las subunidades β regulan las corrientes de calcio a través de dos vías independientes entre sí: el incremento en la probabilidad de apertura del CCAV y la facilidad de la llegada del canal a la membrana plasmática (6).

La interacción principal con los CCAV ocurre en un sitio específico de éstos denominado AID (10), lo que puede generar un aumento en la eficiencia en el acoplamiento del sistema sensor de voltaje del canal (40). Sin embargo, la subunidad Cav β tiene la capacidad de interactuar con otras proteínas generando diferentes efectos (6). Tal es el caso de la interacción con proteínas de la superfamilia RAS (RGK), pequeñas GTPasas que presentan una extensa variedad de funciones que incluyen desde modificaciones a lípidos de membrana hasta la regulación de la expresión génica(7) dentro de las que se puede destacar la proteína GEM, que es capaz de promover endocitosis de Cav2.1 mediada por dinamina, sin embargo, para que GEM promueva endocitosis es necesaria la interacción de la subunidad Cav β con la Cav2.1 (41). Inicialmente se propuso que la interacción entre Cav β y proteínas RGK impedía la unión de Cav β a la subunidad Cav α_1 , impidiendo su actividad chaperona y limitando el tráfico del canal hacia la membrana (42). Sin embargo, trabajos posteriores han demostrado que las proteínas RGK no interfieren en la interacción α_1 - β y se propone incluso la existencia de complejos α_1 / β /RGK (43).

Con estos antecedentes, el grupo de Colecraft propuso un modelo donde la presencia de Cav β expone un sitio de inhibición al que se une GEM para bloquear la expresión de Cav2.1 (41).

Todos estos análisis hacen referencia de la acción que puede tener la subunidad Cav β sobre la actividad del CCAV, sin embargo, en este trabajo de tesis, hemos demostrado que la subunidad Cav β es capaz de promover endocitosis sin la presencia de la subunidad Cav α_1 , puesto que los ovocitos de *Xenopus* no

presentan actividad endógena de CCAV (13) por lo tanto, podemos proponer que la interacción de Cav β con proteínas de la maquinaria endocítica (como dinamina) no necesita de la existencia de la subunidad Cav α_1 y, considerando estudios de Colecraft se apoya la idea de que esta interacción no ocurre en el sitio ABP de Cav β .

2.- Los ovocitos de *Xenopus Leavis* probaron ser un buen modelo para el estudio de endocitosis

A través de la realización de este estudio hemos evidenciado que los ovocitos de *Xenopus Leavis* constituyen un sistema de trabajo ideal.

Estas células son fácilmente extraíbles, y pueden ser mantenidas en condiciones mínimas (18°C, sin necesidad de gases, en buffer a pH7,4). Además, debido a su gran tamaño, son muy fáciles de manipular. Para poder inyectar las proteínas recombinantes sólo se necesita de un microinyector y una lupa.

Es también importante señalar que, de acuerdo a nuestro diseño experimental, pudimos obtener información de muchos ovocitos en un mismo grupo de estudio. Esto gracias a que fue posible cuantificar tanto la captación de HRP como el control de carga para cada ovocito en forma individual. De esta manera, pudimos evitar las variaciones naturales en la calidad de ovocitos provenientes de diferentes animales.

La principal dificultad del trabajo con ovocitos consiste en la variabilidad en los niveles de expresión de proteínas tanto entre animales, como entre las diferentes épocas del año. Es por este motivo que debimos modificar nuestro diseño experimental. La idea original consistía en expresar la subunidad Cav α_1 y analizar el efecto de Cav β en la densidad de canales en la membrana; fue necesario modificar el diseño experimental y buscar una metodología que nos permitiera hacer los ensayos de manera independiente de la expresión de proteínas. Esta nueva estrategia me permitió establecer que Cav β estimula el proceso de endocitosis sin necesidad de que CCAV esté presente.

Es por esta misma razón que todos los ensayos fueron realizados con inyección sólo de proteínas recombinantes, y no de los mARN. Esto nos permitió cuantificar de manera temporal el efecto de cada una de las proteínas sobre el ovocito de manera agudo y tiempo controlado. La calidad del mARN, viabilidad del ovocito, niveles de expresión, del riesgo de contaminación ni de la fragilidad de la membrana del ovocito no influyen en los resultados.

3.- El diseño experimental propuesto permitió cuantificar de manera confiable la incorporación de HRP al ovocito

Gracias a todas las ventajas antes descritas, se diseñó un experimento que nos permitió controlar la cantidad y calidad de proteína inyectada, el tiempo de exposición del ovocito inyectado a la solución de HRP; además de obtener varios datos por experimento, en todas las condiciones propuestas de manera simultánea. Esto es importante, porque las proteínas recombinantes son muy sensibles a la temperatura, entonces se debía descongelar la alícuota e inyectar al ovocito rápidamente para cada una de las condiciones para poder compararlas.

Cabe señalar también que para llevar a cabo los ensayos de actividad HRP en condiciones óptimas se utilizó como Buffer de lisis PBS, en este buffer la enzima HRP mantiene su actividad intacta.

Como se mencionó en la sección resultados, el diseño experimental utilizado se basó en el trabajo de Mukhopadhyay y colaboradores(32), pero ellos normalizaban los valores obtenidos de actividad HRP por ovocito. Según criterio personal, se consideró más analítico realizar la normalización respecto de un patrón de carga para WB: tubulina. Esto porque si bien se utilizan ovocitos en estado VI de desarrollo, existen diferencias de tamaño y volumen entre ellos, aunque sean pequeñas deben ser consideradas. De esta manera, los valores de intensidad de luminiscencia generados por la actividad HRP de la enzima

incorporada al ovocito mediante procesos de endocitosis mediado por dinamina está normalizado por tubulina para cada ovocito de manera individual.

4.- Trabajo futuro

Con la finalidad de comprobar la interacción proteína-proteína entre la subunidad $\text{Cav}\beta_{3\alpha_0}$ se realizará un ensayo de pull-down contra dinamina en donde se utilizará la subunidad $\text{Cav}\beta_{3\alpha_0}$ -His tag unida a resinas de Ni-agarosa, del mismo modo en que se realizó con la subunidad $\text{Cav}\beta_{2\alpha}$ (17).

Tal como puede apreciarse en la figura 10, existe una pequeña proporción de la subunidad $\text{Cav}\beta_{3\alpha_0}$ que adquiere la forma multimérica durante el proceso de cromatografía de exclusión molecular. Resulta por lo tanto importante determinar si esa baja proporción de proteína homomultimérica es la que interactúa con dinamina para promover la endocitosis. Para ello se debe realizar electroforesis no denaturante para así determinar si la forma multimérica corresponde a un dímero que pudiese ser determinante para la unión a dinamina, como fue demostrado para $\text{Cav}\beta_{2\alpha}$ (16).

BIBLIOGRAFÍA

1. Hille B. Ion Channels of Excitable Membranes. Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA; 2001.
2. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:521–55.
3. Catterall WA. Functional subunit structure of voltage-gated calcium channels. *Science.* 1991 Sep;253(5027):1499–500.
4. Neely A, Garcia-Olivares J, Voswinkel S, Horstkott H, Hidalgo P. Folding of active calcium channel beta(1b) -subunit by size-exclusion chromatography and its role on channel function. *J Biol Chem.* 2004 May;279(21):21689–94.
5. Van Petegem F, Clark KA, Chatelain FC, Minor DLJ. Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain. *Nature.* 2004 Jun;429(6992):671–5.
6. Hidalgo P, Neely A. Multiplicity of protein interactions and functions of the voltage-gated calcium channel β -subunit. *Cell Calcium.* 2007;42(4–5):389–96.
7. Neely A, Hidalgo P. Structure-function of proteins interacting with the α 1 pore-forming subunit of high-voltage-activated calcium channels. *Front Physiol.* 2014;5 JUN(June):1–19.
8. De Waard M, Scott VE, Pragnell M, Campbell KP. Identification of critical amino acids involved in alpha1-beta interaction in voltage-dependent Ca²⁺ channels. *FEBS Lett.* 1996 Feb;380(3):272–6.
9. Berrou L, Klein H, Bernatchez G, Parent L. A specific tryptophan in the I-II linker is a key determinant of beta-subunit binding and modulation in Ca(V)_{2.3} calcium channels. *Biophys J.* 2002 Sep;83(3):1429–42.
10. Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. Calcium channel beta-subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the alpha 1-subunit. *Nature.* 1994 Mar;368(6466):67–70.
11. Chen Y-H, Li M-H, Zhang Y, He L-L, Yamada Y, Fitzmaurice A, et al. Structural basis of the alpha1-beta subunit interaction of voltage-gated

- Ca²⁺ channels. *Nature*. 2004 Jun;429(6992):675–80.
12. Opatowsky Y, Chen C-C, Campbell KP, Hirsch JA. Structural analysis of the voltage-dependent calcium channel beta subunit functional core and its complex with the alpha 1 interaction domain. *Neuron*. 2004 May;42(3):387–99.
 13. Neely A, Wei X, Olcese R, Birnbaumer L, Stefani E. Potentiation by the beta subunit of the ratio of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel. *Science*. 1993 Oct;262(5133):575–8.
 14. Hibino H, Pironkova R, Onwumere O, Rousset M, Charnet P, Hudspeth J, et al. Direct interaction with a nuclear protein and regulation of gene silencing by a variant of the Ca²⁺-channel beta 4 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):307–12.
 15. Berggren PO, Yang SN, Murakami M, Efanov AM, Uhles S, Köhler M, et al. Removal of Ca²⁺ channel β_3 subunit enhances Ca²⁺ oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell*. 2004;119(2):273–84.
 16. Miranda-Laferte E, Gonzalez-Gutierrez G, Schmidt S, Zeug A, Ponimaskin EG, Neely A, et al. Homodimerization of the Src Homology 3 Domain of the Calcium Channel β -Subunit Drives Dynamin-dependent Endocytosis. *J Biol Chem*. 2011 Jun 24;286(25):22203–10.
 17. Gonzalez-Gutierrez G, Miranda-Laferte E, Neely A, Hidalgo P. The Src homology 3 domain of the β -subunit of voltage-gated calcium channels promotes endocytosis via dynamin interaction. *J Biol Chem*. 2007;282(4):2156–62.
 18. Yang T, Colecraft HM. Regulation of voltage-dependent calcium channels by RGK proteins. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2013;1828(7):1644–54.
 19. Urrutia R, Henley JR, Cook T, McNiven MA. The dynamins: redundant or distinct functions for an expanding family of related GTPases? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan;94(2):377–84.
 20. van der Bliek AM. Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol*. 1999 Mar;9(3):96–102.
 21. Hinshaw JE. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:483–519.
 22. Salim K, Bottomley MJ, Querfurth E, Zvelebil MJ, Gout I, Scaife R, et al.

- Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J.* 1996 Nov;15(22):6241–50.
23. Takei K, Yoshida Y, Yamada H. Regulatory mechanisms of dynamin-dependent endocytosis. *J Biochem.* 2005 Mar;137(3):243–7.
 24. Mettlen M, Pucadyil T, Ramachandran R, Schmid SL. Dissecting dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Soc Trans.* 2009 Oct;37(Pt 5):1022–6.
 25. Dalton S, Takahashi SX, Miriyala J, Colecraft HM. A single Cav β can reconstitute both trafficking and macroscopic conductance of voltage-dependent calcium channels. *J Physiol.* 2005;567(Pt 3):757–69.
 26. Hidalgo P, Gonzalez-Gutierrez G, Garcia-Olivares J, Neely A. The α 1- β -subunit interaction that modulates calcium channel activity is reversible and requires a competent α -interaction domain. *J Biol Chem.* 2006;281(34):24104–10.
 27. Gonzalez-Gutierrez G, Miranda-Laferte E, Naranjo D, Hidalgo P, Neely A. Mutations of nonconserved residues within the calcium channel α 1-interaction domain inhibit β -subunit potentiation. *J Gen Physiol.* 2008;132(3):383–95.
 28. Weissgerber P, Held B, Bloch W, Kaestner L, Chien KR, Fleischmann BK, et al. Reduced cardiac L-type Ca²⁺ current in Cav β 2^{-/-} embryos impairs cardiac development and contraction with secondary defects in vascular maturation. *Circ Res.* 2006;99(7):749–57.
 29. Sambrook, E.F. Fritsch TM. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Press CSHL, editor. New York; 1989.
 30. Pelczar MJ. *Microbiology*. GrawHill M, editor. 1982.
 31. Melissa A. Rasar and Stephen R. Hammes. *The Physiology of the Xenopus laevis Ovary*. In: X. J. Liu © Humana Press Inc., Totowa N, editor. *Xenopus Protocols: Cell Biology and Signal Transduction*. 2006.
 32. Mukhopadhyay A, Barbieri AM, Funato K, Roberts R, Stahl PD. Sequential actions of Rab5 and Rab7 regulate endocytosis in the Xenopus oocyte. *J Cell Biol.* 1997 Mar;136(6):1227–37.
 33. Berg JM, Tymoczko JL SL. *Biochemistry*. 5th editio. New York: W H Freeman; 2002.

34. Gonzalez-Gutierrez G, Miranda-Laferte E, Nothmann D, Schmidt S, Neely A, Hidalgo P. The guanylate kinase domain of the β -subunit of voltage-gated calcium channels suffices to modulate gating. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(37):14198–203.
35. Beckstead JH. A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *J Histochem Cytochem*. 1994;42(8):1127–34.
36. Paavilainen L, Edvinsson A, Asplund A, Hober S, Kampf C, Pontén F, et al. The impact of tissue fixatives on morphology and antibody-based protein profiling in tissues and cells. *J Histochem Cytochem*. 2010;58(3):237–46.
37. Montero C, Segura DI. Histochemical blockade of the antigen-antibody reaction using immunoperoxidase demonstration of lysozyme in paneth cells and lamina propria mononucleocytes of human small intestine as a model system. *J Histochem Cytochem*. 1989;37(7):1063–8.
38. Khan P, Idrees D, Moxley MA, Corbett JA, Ahmad F, von Figura G, et al. Luminol-Based Chemiluminescent Signals: Clinical and Non-clinical Application and Future Uses. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014 May 22;173(2):333–55.
39. Takahashi M, Seagar MJ, Jones JF, Reber BF, Catterall WA. Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(15):5478–82.
40. Olcese R, Neely a, Qin N, Wei X, Birnbaumer L, Stefani E. Coupling between charge movement and pore opening in vertebrate neuronal α 1E calcium channels. *J Physiol*. 1996;497 (Pt 3):675–86.
41. Fan M, Buraei Z, Luo H-R, Levenson-Palmer R, Yang J. Direct inhibition of P/Q-type voltage-gated Ca^{2+} channels by Gem does not require a direct Gem/Cavbeta interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(33):14887–92.
42. Sasaki T, Shibasaki T, Béguin P, Nagashima K, Miyazaki M, Seinoi S. Direct inhibition of the interaction between α -interaction domain and β -interaction domain of voltage-dependent Ca^{2+} channels by Gem. *J Biol Chem*. 2005;280(10):9308–12.
43. Yang T, Xu X, Kernan T, Wu V, Colecraft HM. Rem, a member of the RGK GTPases, inhibits recombinant $\text{Ca}_v1.2$ channels using multiple

mechanisms that require distinct conformations of the GTPase. *J Physiol.*
2010;588(10):1665–81.

ANEXOS

1.- Acta de evaluación Bioética



CIBICA
Comité Institucional de Bioética para
la Investigación con Animales

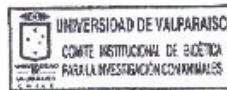
ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA BEA087-2016

I. El Comité Institucional de Bioética para la investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso, en su sesión del 9 de agosto de 2016, declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto BEA058-2016 titulado "Differential regulation of voltaje-sensors in high voltaje activated calcium channels" del investigador responsable Dr. Alan Nooly D. de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso y que se presentó a concurso Fondecyt regular 2016 de Conicyt.

II. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los antecedentes presentados en el formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN".

III. En la valoración bioética del proyecto, el Comité consideró adecuado los aspectos bioéticos indicados en el segundo punto Valoración de Aspectos Éticos del formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN" y que se señalan en las páginas anexas a esta acta.

IV. Por lo anterior, el Comité Institucional de Bioética aprueba el protocolo experimental.



[Handwritten Signature]
Chita Guisado Aranguiz

Presidente

Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales

Blanco 951, Valparaíso Fono-Fax: +56 (02) 2401184
www.uv.cl

2.- Certificado de Bioseguridad



Dirección de Investigación
Comité de Bioseguridad

CERTIFICADO DE BIOSEGURIDAD

BS016/2016


I. El Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso, declara que en su sesión de julio del 2016, evaluó el protocolo experimental del proyecto "Differential regulation of voltage-sensors in high voltage activated calcium channels" presentado por el Prof. Alan Neely D. de la Facultad de Ciencias.

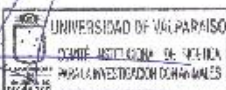
II. Para su evaluación el Comité de Bioseguridad revisó los antecedentes presentados por el interesado en relación a los riesgos y medidas preventivas de las actividades planteadas en el proyecto referido, en aquellas actividades que se realizarán en el centro interdisciplinario de Neurociencias de la Facultad de Ciencias.

III. En la valoración de bioseguridad del proyecto, el Comité consideró apropiados el control de riesgos, las medidas preventivas, la gestión de residuos y el resguardo de la comunidad y del medio ambiente.

IV. Por lo anterior, el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso certifica que este protocolo experimental contempla las medidas de bioseguridad definidas en el Reglamento de Higiene y Seguridad de la UVV y en el Manual de Bioseguridad de CONICYT.

V. Se extiende este certificado para ser presentado al concurso FONDECYT Regular, 2015.


Chito Cusado
Presidente
Comité de Bioseguridad
Universidad de Valparaíso



Valparaíso, 9 de agosto de 2016.

3.- Protocolo Eutanasia



PROTOCOLO EUTANASIA *Xenopus Leavis*

Para el protocolo de eutanasia de *Xenopus leavis* se utiliza el método químico con Tricaína metanosulfonato. Éste es un método rápido no irritante, para el sacrificio de anfibios, cuando se disuelve en el agua en la que están.

Los criterios para decidir si una rana es eutanasiada son los siguientes: los ovocitos producidos no son adecuados para los estudios de expresión heteróloga; el estado post-operatorio de las ranas presente infecciones o heridas importantes para la salud del animal y/o la cantidad de cirugías a la que ha sido sometida el animal. Por lo general, las ranas son operadas hasta cinco veces, con pausas de entre tres a cuatro meses entre cirugía.

El protocolo de eutanasia es el siguiente:

1.- Sumergir la rana en una solución de anestesia, que consiste en diluir una alícuota de 1 ml de Tricaína metanosulfonato (400 mg/ml) en 500 ml de agua de mantención de rana. Procurar que la solución cubra las 3/4 partes de la rana. Incubar la rana en esta solución durante dos a tres horas dependiendo de su tamaño.



2.- Una vez transcurrido ese tiempo, envolver al animal en guantes de látex.



3.- Congelar el cadáver en un freezer -20°C destinado especialmente al mantenimiento de restos animales.



Los restos animales congelados son retirados por una empresa externa: *Stericycle*, quienes se hacen cargo del tratamiento y disposición final de residuos.

Nieves Navarro Quezada
Universidad de Valparaíso
Facultad de Ciencias
Mayo, 2016