



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

“Regulación en la expresión de la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta-1$ de los canales de Ca^{2+} por el factor de crecimiento epidérmico (EGF)”

Proyecto de Doctorado que presenta:

M. en C. Paz Durán de Haro

Directores de Tesis:

Dr. Diego Ricardo Félix Grijalva

Dr. José Alejandro Sandoval Romero

Agradecimientos

Al Departamento de Biología Celular del CINVESTAV por aceptarme en su programa de Doctorado en Ciencias y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el apoyo económico que me otorgó a través de una beca académica durante mis estudios.

Al Dr. Ricardo Félix Grijalva por darme la oportunidad de realizar este proyecto en su laboratorio, por sus enseñanzas, su orientación, su apoyo y por ser parte fundamental de mi formación académica. Mi total agradecimiento al Dr. Alejandro Sandoval Romero por aceptar ser mi cotutor en este proyecto de doctorado, por su valiosa contribución al mismo, por el tiempo invertido en mi formación como investigadora, y su completo apoyo durante la elaboración de esta tesis.

A mis asesores, los Dres. Antony Boucard Jr., Enrique O. Hernández González, José Segovia Vila y Eduardo Monjaraz Guzmán, por sus importantes contribuciones a este trabajo de tesis. A la Bióloga Mercedes Urbán Nuñez por su ayuda en los cultivos celulares y al Ing. Hugo Cadena García por su ayuda técnica. Al Dr. Ricardo González Ramírez y al Dr. Natanael Zarco por su tiempo y colaboración en este proyecto. A la Dr. Lizbeth Grimaldo, Dr. Kimberly Gómez y la Dr. Aída Calderón por su ayuda y consejos dentro y fuera del laboratorio.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 55; Alejandra Corzo y David Muñoz por su apoyo y su amistad. A todos mis amigos, en especial a Alejandra, Luis y Alfredo.

A Ricardo Lule por su amor incondicional, y por siempre creer en mí.

A mi familia por ser el soporte de mi vida, por brindarme su apoyo y motivarme siempre a seguir mis sueños. Todo esto es gracias a ustedes.

Prefacio	5
Resumen	7
Abstract	8
1. Introducción	9
1.1 Estructura y función de los canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje	9
1.2 Acople excitación-secreción	16
1.3 Canales de Ca ²⁺ en células hipofisarias: cambios inducidos por el EGF	19
1.4 Cambios en la expresión de Ca _v α ₂ δ-1 inducidos por el EGF	23
2. Planteamiento del problema	28
3. Hipótesis de trabajo	29
4. Objetivos	30
4.1 Objetivo general	30
4.2 Objetivos específicos	30
5. Materiales y métodos	31
5.1 Cultivo celular	31
5.2 Extracción de proteínas e inmunoelectrotransferencia (<i>Western blot</i>)	31
5.3 Biotinilación de proteínas de superficie celular	33
5.4 Transfección transitoria para el silenciamiento de ELK-1 y CREB	34
5.5 Clonas de ADNc y transfección transitoria de las células GH3	35
5.6 Ensayos de actividad del promotor	37
5.7 Mutagénesis sitio dirigida y secuenciación de clonas	37
5.8 Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-PCR)	40

5.9	Electrofisiología	42
5.10	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	44
5.11	Análisis de los datos	45
6.	Resultados	47
6.1	Efecto del EGF sobre la expresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1	47
6.2	Efecto del EGF sobre la expresión de canales Cav HVA	49
6.3	Determinación de la vía de señalización implicada en el aumento en la expresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1	50
6.4	Efecto del silenciamiento de ELK-1 y CREB	52
6.5	Mutagénesis de los sitios de unión a ELK-1 y CREB	54
6.6	Asociación <i>in vivo</i> de ELK-1 con la región promotora de <i>CACNA2D1</i>	56
6.7	Efecto de la sobreexpresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1 en células las GH3	57
6.8	Efecto de los factores de transcripción sobre la expresión funcional de la subunidad Cav $\alpha_2\delta$ -1	62
6.9	Análisis de la secreción de prolactina	76
7.	Discusión	79
7.1	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje y ontogenia de los lactotropos	79
7.2	Efecto del EGF sobre la expresión de los canales Cav	82
7.3	Factores de transcripción implicados en la respuesta al EGF	83
7.4	Conclusión	86
7.5	Perspectivas	86
8.	Referencias	88

Prefacio

El presente trabajo de tesis tuvo como finalidad estudiar la regulación en la expresión de la subunidad auxiliar $Cav\alpha_2\delta-1$ de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de alto umbral de activación (HVA), por el factor de crecimiento epidérmico (EGF). El trabajo se realizó en el Laboratorio 55 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN). La tesis fue dirigida por el Dr. Diego Ricardo Félix Grijalva, investigador titular del Departamento de Biología Celular del Cinvestav-IPN, y por el Dr. José Alejandro Sandoval Romero, profesor titular de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México. El desarrollo experimental de esta tesis contó con la asesoría del Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán, profesor titular y director del Instituto de Fisiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, del Dr. José Segovia Vila, investigador titular del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Cinvestav-IPN, del Dr. Antony Boucard Jr. y del Dr. Enrique O. Hernández González ambos investigadores titulares del Departamento de Biología Celular del Cinvestav-IPN. Durante el tiempo que duró mi Doctorado fui beneficiada con una beca académica otorgada por del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt).

Parte de los resultados de esta tesis fueron presentados en el Congreso de Investigación Científica *The Ion Channel Regulation Conference: Molecules to Disease* de la Federación de Sociedades Americanas de Biología Experimental (FASEB por sus siglas en inglés) en el trabajo titulado: *Regulation of the Ca^{2+} channel $\alpha_2\delta-1$ subunit expression by epidermal growth factor (EGF)*, el cual se celebró en la ciudad de Lisboa, Portugal en el mes de julio del año 2019. De igual manera, los resultados de esta tesis se presentaron en el Congreso Anual de la Sociedad

Norteamericana de Neurociencias (SfN) en el trabajo titulado: *Epidermal growth factor (EGF) regulates the expression of Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ -1 auxiliary subunit via the ERK/Elk-1 signaling pathway*, el cual se celebró en la ciudad de Chicago, Illinois (Estados Unidos de Norteamérica), en el mes de octubre del año 2019.

Este trabajo fue aceptado para su publicación en la revista *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* con el título “*Regulation of the Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ -1 subunit expression by the Epiderman Growth Factor via the ERK/ELK-1 signaling pathway*”, en el mes de mayo del año 2020.

Resumen

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) se expresan en células endócrinas donde contribuyen a la secreción hormonal. Se sabe que diversos factores de crecimiento, incluido el factor de crecimiento epidérmico (EGF), afectan la expresión de los canales Ca_v . Estudios previos han mostrado que el EGF aumenta las corrientes de Ca^{2+} en la línea celular GH3, proveniente de un adenoma hipofisiario, al aumentar el número de canales Ca_v de alto umbral de activación (HVA) en la membrana plasmática, lo que resulta en una mayor secreción de la hormona prolactina (PRL). Sin embargo, se sabe poco sobre los mecanismos subyacentes a esta regulación. En el presente trabajo de tesis se muestra que el EGF aumenta la expresión de la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$, un componente molecular importante de los canales HVA. El análisis *in silico* del promotor del gen *CACNA2D1* que codifica para la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ reveló la presencia de sitios de unión para factores de transcripción activados por la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK. Los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina y de mutagénesis sitio dirigida mostraron que el factor de transcripción ELK-1 es crucial para la regulación de la expresión de *CACNA2D1* en respuesta al EGF. Además, aquí se presentan evidencias de que el EGF aumenta la expresión membranal de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$, y que la sobreexpresión de ELK-1 incrementa la densidad de la corriente de Ca^{2+} a través de los canales HVA, mientras que el silenciamiento de ELK-1 disminuye la expresión funcional de estos canales. De manera interesante, los ensayos de liberación hormonal revelaron que la sobreexpresión de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ aumenta la secreción de PRL. Estos resultados revelan un nuevo mecanismo molecular por el cual el EGF al activar la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK/ELK-1 puede influir de manera determinante en la expresión de los canales de HVA y en la conducta secretora de las células adenohipofisarias.

Abstract

Voltage-gated Ca^{2+} (Ca_v) channels are expressed in endocrine cells where they contribute to hormone secretion. Diverse chemical messengers including epidermal growth factor (EGF) are known to affect the expression of Ca_v channels. Previous studies have shown that EGF increases Ca^{2+} currents in GH3 pituitary cells by increasing the number of high voltage-activated (HVA) Ca_v channels at the cell membrane, which results in enhanced prolactin (PRL) secretion. However, little is known regarding the mechanisms underlying this regulation. Here, we show that EGF increases the expression of the $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ subunit, a key molecular component of HVA channels. The analysis of the gene promoter encoding $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ (*CACNA2D1*) revealed binding sites for transcription factors activated by the Ras/Raf/MEK/ERK signaling cascade. Chromatin immunoprecipitation and site-directed mutagenesis showed that ELK-1 is crucial for the transcriptional regulation of *CACNA2D1* in response to EGF. Furthermore, we found that EGF increases the membrane expression of $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ and that ELK-1 overexpression increases HVA current density, while ELK-1 knockdown decreases the functional expression of the channels. Hormone release assays revealed that $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ overexpression increases PRL secretion. These results suggest a mechanism for how EGF by activating the Ras/Raf/MEK/ERK/ELK-1 pathway may influence the expression of HVA channels and the secretory behavior of pituitary cells.

1. Introducción

1.1 Estructura y función de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

Los canales iónicos son complejos proteicos presentes en la membrana plasmática que contienen un poro que permite el flujo selectivo de iones. Se conocen distintos tipos de canales iónicos los cuales se clasifican de acuerdo con su selectividad iónica y de acuerdo a los estímulos que los activan (Aidley & Stanfield, 1996; Hille, 2001). Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) son complejos heteromultiméricos que se encargan de regular la entrada de Ca^{2+} a la célula en respuesta a los cambios en el potencial de la membrana. Los canales Ca_v llevan a cabo una doble función de señalización; en primer lugar, la corriente de cationes entrante provoca cambios en el potencial de membrana plasmática en las células excitables y en segundo lugar, son responsables de los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} que activan distintas vías de señalización en el interior celular. Así, el Ca^{2+} que entra a la célula actúa como un segundo mensajero intracelular convirtiendo las señales eléctricas en señales bioquímicas a través de las cuales se regulan una gran variedad de eventos celulares como la contracción muscular, la expresión génica, la regulación enzimática, la fecundación, la secreción de neurotransmisores y hormonas, entre muchas otras (Hofmann *et al.*, 1999; Lacinova, 2005; Catterall, 2011).

Los canales Ca_v están compuestos por una proteína principal conocida como subunidad $Ca_v\alpha_1$ (190-250 kDa), la cual forma el poro conductor de los iones y contiene los elementos moleculares que conforman el sensor de voltaje del canal. En la actualidad se conocen diez isoformas de la subunidad principal $Ca_v\alpha_1$, codificadas por 10 genes distintos, y aunque la estructura molecular es muy similar entre ellas, se les atribuyen distintas características biofísicas y farmacológicas. La subunidad $Ca_v\alpha_1$ tiene una estructura modular formada por cuatro dominios

repetidos (I-IV) los cuales están integrados por seis segmentos transmembranales (S1-S6). La región del poro (PD) está constituida por el asa que une a los segmentos S5 y S6 de cada dominio repetido. Por otro lado, el dominio sensor de voltaje (VSD) lo componen los segmentos S1 a S4 de cada dominio repetido. El segmento S4 es una α -hélice que contiene aminoácidos cargados positivamente los cuales son capaces de detectar cambios en el voltaje transmembranal (Fig. 1; Catterall, 2011).

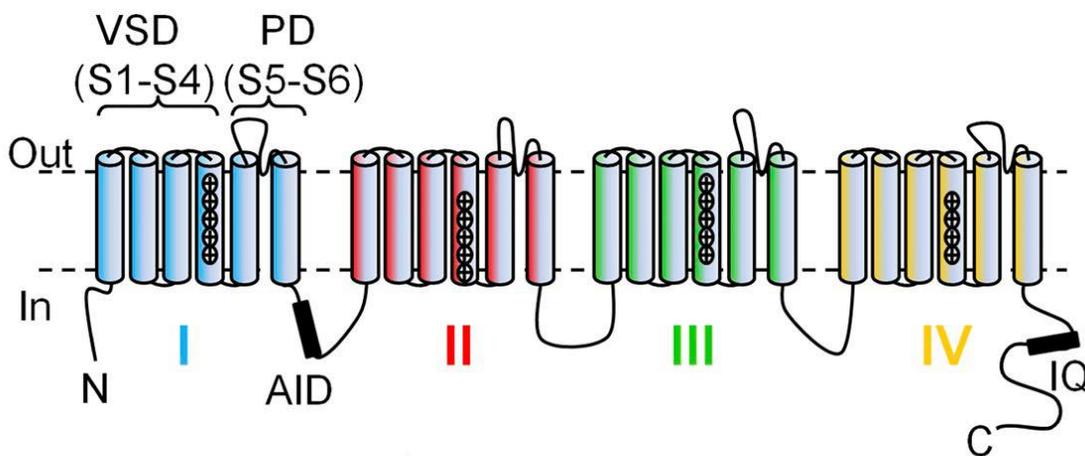


Figura 1. Estructura de la subunidad principal $Ca_v\alpha_1$ de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. La figura muestra un esquema que ilustra la arquitectura molecular de la subunidad formadora del poro $Ca_v\alpha_1$ con sus 4 dominios repetidos (I, II, III, IV). VSD, dominio sensor de voltaje; PD, dominio del poro conductor de iones; AID, dominio de interacción con la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$; IQ, dominio de interacción con calmodulina (modificada de Savalli *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, las subunidades $Ca_v\alpha_1$ están codificadas por 10 genes distintos que pueden ser clasificados a su vez en 3 familias distintas como se describe a continuación. Con base en sus propiedades funcionales elementales, las subunidades $Ca_v\alpha_1$ se clasifican en dos tipos, de bajo umbral (LVA; por sus siglas en inglés), y de alto umbral de activación (HVA; por sus siglas en inglés). Además, conforme a sus propiedades biofísicas y farmacológicas, las subunidades $Ca_v\alpha_1$ se clasifican en cinco tipos conocidos como T, L, P/Q, N y

R (Fig. 2). Dentro de esta clasificación, el tipo T es el único que pertenece a la clasificación de bajo umbral de activación (Hille, 2001; Catterall, 2011).

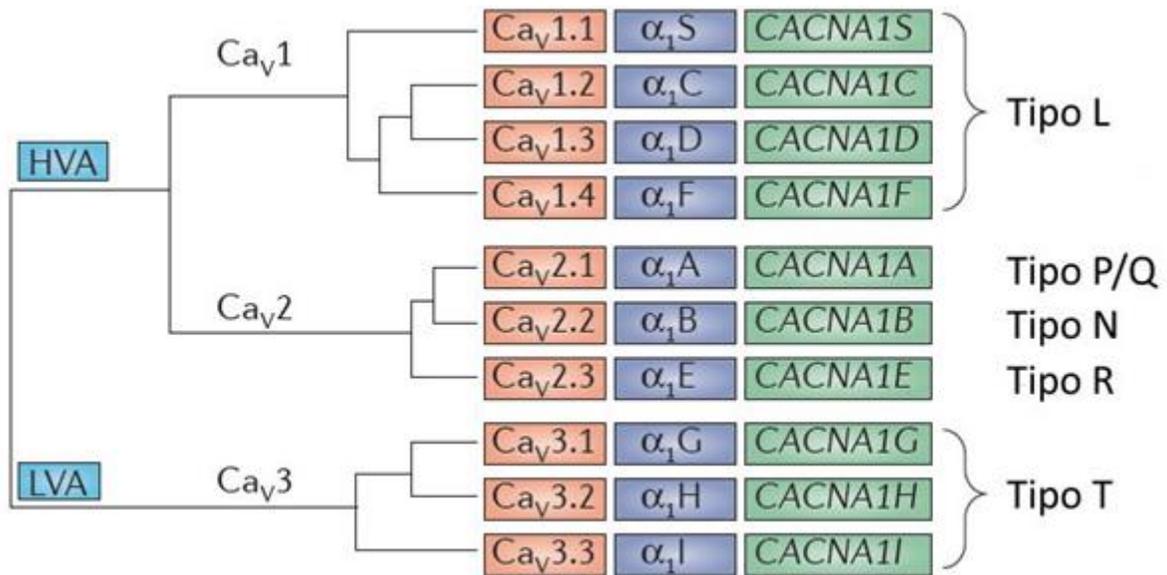


Figura 2. Distintos tipos de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. La subunidad Ca_vα₁ se divide en 3 grupos de acuerdo con la identidad de su secuencia de aminoácidos, conocidos como Ca_v1, Ca_v2 y Ca_v3. Los canales Ca_v1 y Ca_v2 son de alto umbral de activación (HVA) e incluyen a los tipos L, P/Q, N y R. Los canales Ca_v3 son de bajo umbral de activación (LVA) o tipo T. Los nombres con los que se conocía originalmente a las distintas subunidades Ca_vα₁ se muestran en azul, y los nombres de los genes que codifican para cada subunidad se muestran en verde (modificada de Dolphin, 2012).

Las subunidades principales Ca_vα₁ pueden estar reguladas por proteínas que forman parte del complejo del canal, las cuales son consideradas subunidades auxiliares (Ca_vα₂δ, Ca_vβ y en algunas ocasiones Ca_vγ). Estas subunidades se encuentran asociadas solamente con los canales HVA (Fig. 3), pues los canales LVA sólo requieren de la subunidad principal Ca_vα₁ para funcionar correctamente. Así, las subunidades auxiliares regulan distintas propiedades de los canales como su traslado y estabilización en la membrana plasmática, y su degradación. De igual manera,

participan en la regulación de la cinética de la corriente que fluye a través de la subunidad principal formadora del poro conductor (Dolphin, 2012; 2013; Felix *et al.*, 2013).

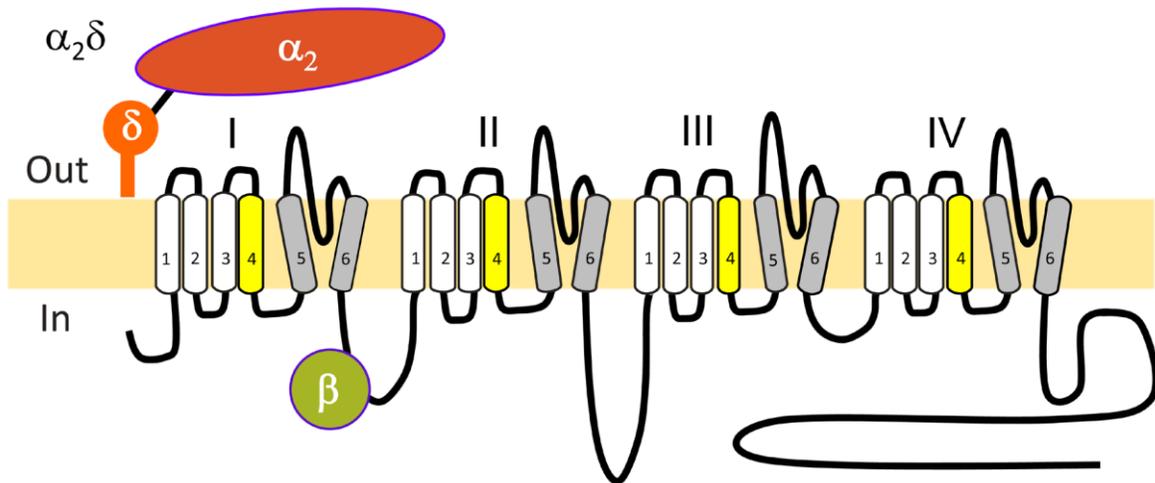


Figura 3. Estructura de los canales Ca_V HVA. La figura muestra un esquema de la estructura molecular de los canales Ca_V HVA con la subunidad principal $Ca_V\alpha_1$, y las subunidades auxiliares $Ca_V\beta$ y $Ca_V\alpha_2\delta$ (tomada de Dolphin, 2018).

La subunidad auxiliar $Ca_V\beta$ (50-65 kDa) es una proteína citoplasmática que interacciona mediante su dominio GK con el dominio de interacción alfa (AID, por sus siglas en inglés) que se localiza en el asa intracelular que une los dominios I y II de la subunidad $Ca_V\alpha_1$ (Catterall, 2011). Se han descrito 4 isoformas de $Ca_V\beta$ ($Ca_V\beta_1$ – $Ca_V\beta_4$) codificadas por 4 genes distintos. Entre sus funciones principales, se ha encontrado que $Ca_V\beta$ tiene efectos sobre las propiedades biofísicas del canal, su envío hacia la membrana plasmática y su degradación generando un aumento en la densidad de la corriente. De igual manera, modula la cinética de la corriente haciendo más rápida tanto su activación como su inactivación (Lacinova, 2005; Gandini *et al.*, 2014; Campiglio & Flucher, 2015).

La subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\gamma$ (~32 kDa) es una glicoproteína con 4 segmentos transmembranales que se expresa en los tejidos muscular y nervioso. Se han encontrado 8 isoformas de esta proteína siendo $\text{Ca}_v\gamma_1$ y $\text{Ca}_v\gamma_2$ las más estudiadas por sus funciones en el músculo estriado y en el cerebro, respectivamente. Se ha observado que $\text{Ca}_v\gamma_1$ tiene efectos inhibitorios sobre la actividad del canal $\text{Ca}_v1.1$ estabilizando el estado inactivo del mismo (Lacinova, 2005; Gandini *et al.*, 2014; Campiglio & Flucher, 2015), mientras que $\text{Ca}_v\gamma_2$ inhibe la expresión funcional de los canales neuronales recombinantes $\text{Ca}_v2.2$ en células HEK-293 (Sandoval *et al.*, 2007).

Por su parte, la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ (~170 kDa) es una proteína extracelular altamente glicosilada que se encuentra anclada a la membrana celular por un enlace glicofosfatidilinositol (GPI). Esta proteína está compuesta por dos péptidos (α_2 y δ) unidos por un enlace disulfuro los cuales están codificados por un sólo gen. Dicho gen da lugar a una pre-proteína que es procesada proteolíticamente para formar los dos péptidos (Ellis *et al.*, 1988; De Jongh *et al.*, 1990; Jay *et al.*, 1991; Gurnett *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 2010). El péptido α_2 contiene cuatro dominios Cache y un dominio similar al factor A de Von Willebrand (VWA) de interacción proteína-proteína, el cual a su vez cuenta con un dominio MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*; Dolphin, 2013; Felix *et al.*, 2013). Gracias a un estudio reciente de la estructura del complejo del canal $\text{Ca}_v1.1$ se determinó que aparentemente los dominios VWA y Cache de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ se unen a las asas extracelulares de los segmentos transmembranales en los repetidos I y III de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$ (Wu *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2016). Es importante recalcar que para que esta subunidad auxiliar cumpla la función de regular los canales Ca_v debe de estar en su forma madura, es decir, que tanto su estructura como sus modificaciones postraduccionales son de suma

importancia para su correcto funcionamiento (Fig. 4). Diversos estudios han mostrado que tanto el péptido α_2 como el δ y su correcto procesamiento proteolítico son importantes para que la subunidad completa ejerza su regulación funcional sobre los canales Ca_v (Gurnett *et al.*, 1996; 1997; Andrade *et al.*, 2007; Kadurin *et al.*, 2016; Ferron *et al.*, 2018). También se sabe que la formación del enlace disulfuro entre cisteínas conservadas en α_2 y δ es necesaria para generar el aumento en la densidad de la corriente de Ca^{2+} (Calderón-Rivera, *et al.*, 2012).

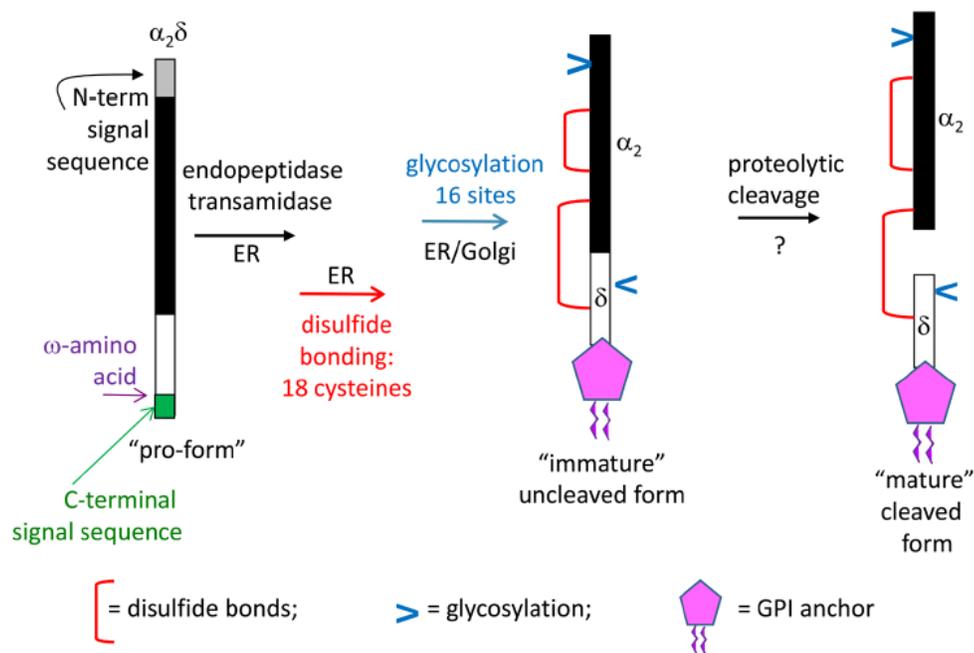


Figura 4. La subunidad auxiliar $Ca_v\alpha_2\delta$ de los canales de Ca^{2+} . La figura representa la estructura de $Ca_v\alpha_2\delta$ y su procesamiento post-traduccional hasta llegar a su forma madura (tomada de Dolphin, 2018).

Existen 4 isoformas de la subunidad auxiliar $\alpha_2\delta$ ($Ca_v\alpha_2\delta$ -1 a $Ca_v\alpha_2\delta$ -4) cada una de ellas codificada por un solo gen (Tabla 1). La subunidad $Ca_v\alpha_2\delta$ -1 fue la primera en ser caracterizada a partir del músculo esquelético y es la más estudiada debido a que se expresa en una amplia variedad de tejidos (Ellis *et al.*, 1988; Brickley *et al.*, 1995; Klugbauer *et al.*, 1999; Qin *et al.*, 2002).

Gen	Proteína	Expresión tisular principal
CACNA2D1	$\alpha_2\delta$ -1	Músculo liso, cardíaco y esquelético. Tejido endócrino. Sistema nervioso central y periférico
CACNA2D2	$\alpha_2\delta$ -2	Sistema nervioso central
CACNA2D3	$\alpha_2\delta$ -3	Sistema nervioso central y periférico
CACNA2D4	$\alpha_2\delta$ -4	Retina. Tejido endócrino

Tabla 1. Clasificación de la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$. Expresión tisular predominante de cada isoforma de la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ (modificada de Dolphin, 2013).

Pese a que no se conoce completamente su relevancia funcional, se sabe que $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ produce un incremento en la densidad de la corriente de Ca^{2+} debido a un aumento en la expresión de canales HVA en la membrana celular, indicando así un posible papel en el tráfico y degradación de los mismos (Felix, 1999; Cantí *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2009; Dolphin, 2013; Campiglio and Flucher, 2015). En cuanto a esta función, se ha observado que en células HEK-293 que expresan el complejo $\text{Ca}_v2.2\alpha_1/\beta_{1b}$ este se internaliza más lentamente cuando se expresa junto con la subunidad $\alpha_2\delta$ -1 (Bernstein & Jones, 2007). Sin embargo, estudios recientes muestran que $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ aparentemente no tiene un efecto sobre la endocitosis de los canales $\text{Ca}_v2.2$ indicando así que el efecto es posiblemente sobre el tráfico de los mismos (Cassidy *et al.*, 2014). En este sentido, se ha observado que la LRP1 (*low density lipoprotein receptor-related protein-1*) y su chaperona RAP promueven la expresión funcional de $\text{Ca}_v2.2$ al favorecer la maduración y tráfico de la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ (Kadurin *et al.*, 2017). Aun cuando existen numerosos reportes acerca del papel de esta subunidad auxiliar sobre el aumento en el número de canales en la membrana, no se conoce de manera precisa el mecanismo molecular de esta función.

Asimismo, se ha observado que $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ participa en la modulación de las propiedades biofísicas de los canales Ca_v al modificar la dependencia al voltaje tanto de su activación como de su inactivación. De manera general, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ genera un desplazamiento en sentido hiperpolarizante en la dependencia al voltaje de la inactivación en estado estacionario, y en algunas ocasiones también causa una hiperpolarización en la dependencia al voltaje de la activación (Felix *et al.*, 1997; Felix *et al.*, 2013; Dolphin, 2018). Se ha reportado que este efecto se debe a que la subunidad auxiliar modula la cinética de activación al unirse a los dominios sensibles al voltaje en $\text{Ca}_v\alpha_1$ (dominios I-III) y modificar su sensibilidad al voltaje (Savalli *et al.*, 2016).

$\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ es también blanco de un grupo de moléculas con efecto analgésico llamados gabapentinoides (GBP) los cuales se unen a una secuencia de tres argininas (RRR) localizada en la región N-terminal del dominio VWA (Gee, *et al.*, 1996; Dolphin, 2012). La unión de gabapentinoides a $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ -1 previene su reciclaje a partir de endosomas positivos para Rab11 hacia la membrana plasmática generando una disminución en la expresión funcional de los canales Ca_v y por lo tanto una reducción en la densidad de la corriente de Ca^{2+} (Tran-Van-Minh & Dolphin, 2010).

1.2 Acople excitación-secreción.

Uno de los múltiples procesos celulares que son regulados por los canales Ca_v es la secreción de hormonas y neurotransmisores. A este mecanismo se le conoce como acople excitación-secreción y es un proceso regulado por Ca^{2+} en el cual el estímulo de las células secretoras tiene como respuesta la liberación de moléculas al medio extracelular. Esta liberación se genera por la fusión de las vesículas secretoras con la membrana plasmática. Se sabe que este proceso celular se

favorece gracias a la interacción funcional que existe entre los canales Ca_v y las proteínas que forman la maquinaria de secreción (Gandini & Felix, 2012).

La liberación de hormonas comienza con un estímulo (excitación) que genera la despolarización de la membrana ocasionando la apertura de los canales Ca_v . El Ca^{2+} que entra a través de estos canales genera un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} principalmente en regiones cercanas a la membrana plasmática en donde se encuentran las vesículas secretoras. El Ca^{2+} se une a distintas proteínas de la maquinaria de secreción provocando la fusión de las vesículas con la membrana plasmática y la subsecuente liberación de su contenido (Gandini & Felix, 2012). Por otra parte, las células endócrinas también pueden secretar hormonas en respuesta a estímulos no excitadores como la unión de ligandos a receptores de membrana acoplados a proteínas G (Misler, 2009).

Existe una amplia variación en la exocitosis de vesículas dependiendo del tipo celular y de factores como sensibilidad al Ca^{2+} , velocidad de fusión de las vesículas dependiente de Ca^{2+} , entre otras. La secreción rápida de neurotransmisores es el proceso más estudiado, sin embargo, se ha descrito también una secreción más lenta la cual se lleva a cabo en células neuroendócrinas y endócrinas. En estas células, debido a que las vesículas secretoras no se encuentran ancladas a la membrana, como es el caso de las células neuronales, para que se active la vía de exocitosis es necesario una despolarización de membrana prolongada. Por lo tanto, en células endócrinas la exocitosis dependiente de Ca^{2+} consta de dos pasos; la unión de las vesículas al sitio de liberación y la fusión de estas vesículas a la membrana plasmática (Martin, 2003; Stojilkovic *et al.*, 2005).

La maquinaria de secreción está compuesta por diversas proteínas las cuales cumplen funciones específicas durante la secreción de neurotransmisores y hormonas, estas proteínas

forman el complejo o familia SNARE (*soluble NSF attachment protein receptor*). Las proteínas SNARE se encargan de regular la fusión de vesículas secretoras a la membrana plasmática. Cuando la concentración intracelular de Ca^{2+} aumenta en respuesta al estímulo, la proteína sinaptotagmina regula la fusión de la membrana celular mediante la asociación de proteínas v-SNARE, ubicadas en las vesículas secretoras, con proteínas t-SNARE en la membrana plasmática (Dhara *et al.*, 2018).

La sinaptotagmina es una proteína que se encuentra en la cara externa de la membrana de las vesículas secretoras que actúa como sensor de Ca^{2+} ya que contiene dos dominios homólogos a la proteína cinasa C (PKC) que unen Ca^{2+} llamados C2A y C2B (Perin *et al.*, 1990; Brose *et al.*, 1992). La fusión y posterior secreción se inicia con la unión de Ca^{2+} a la sinaptotagmina generando un cambio conformacional que interrumpe la interacción de la maquinaria de secreción con $\text{Ca}_v\alpha_1$ y $\text{Ca}_v\beta$ (Fig. 5; Felix *et al.*, 2013). Estudios previos muestran la interacción de la sinaptotagmina con los canales Ca_v en una región denominada *synprint* ubicada en el asa intracelular que une los dominios II y III de la subunidad principal $\text{Ca}_v\alpha_1$. De igual manera, se ha encontrado interacción entre esta región y proteínas del complejo SNARE, las cuales, de manera interesante se unen diferencialmente entre tipos celulares. Se ha reportado que las proteínas SNARE se asocian con los canales tipo P/Q ($\text{Ca}_v2.1$) y tipo N ($\text{Ca}_v2.2$) en neuronas y con los canales tipo L ($\text{Ca}_v1.2$ y $\text{Ca}_v1.3$) en células endócrinas (Mochida *et al.*, 1996; Catterall, 1999). Asimismo, se ha encontrado una interacción entre proteínas de la familia RIM (efectores de Rab3) y los canales tipo P/Q, N y L que afecta la secreción tanto de hormonas en células endócrinas como de neurotransmisores en células nerviosas (Zhong *et al.*, 1999; Kiyonaka *et al.*, 2007; Gandini & Felix, 2012).

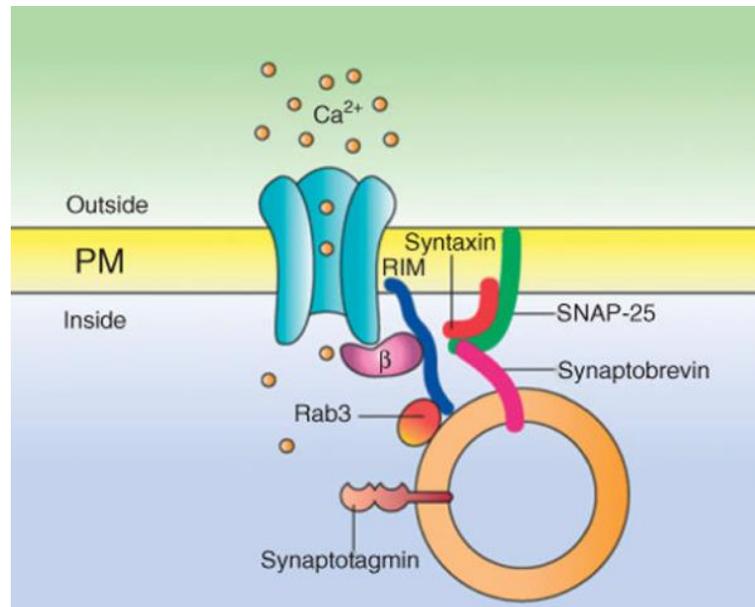


Figura 5. Acoplamiento excitación- secreción. Interacción funcional entre canales Ca_v y la maquinaria de secreción. La proteína RIM interacciona con la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$ y con la GTPasa pequeña Rab3 en las vesículas secretoras. La sinaptotagmina funciona como sensor de Ca^{2+} (tomada de Felix, *et al.*, 2013).

1.3 Canales de Ca^{2+} en células hipofisarias: cambios inducidos por el EGF.

Como se mencionó anteriormente, los canales Ca_v se expresan en una amplia variedad de tejidos como el sistema nervioso, el corazón, el músculo esquelético, el oído interno y las glándulas endócrinas. En las células endócrinas, los canales Ca_v están involucrados en la regulación de procesos como la diferenciación celular, la transcripción de genes y la secreción hormonal, entre otros. La glándula pituitaria o hipófisis es considerada la glándula más importante del sistema endócrino debido a que regula las actividades de las otras glándulas endócrinas en el organismo. Está dividida en dos regiones principales, la neurohipófisis y la adenohipófisis. La primera está compuesta por las terminales nerviosas de las neuronas hipotalámicas sostenidas por células gliales denominadas pituicitos. A lo largo de los axones se transportan las hormonas oxitocina y vasopresina, también llamada hormona antidiurética (ADH), las cuales son liberadas a la

circulación en el lóbulo posterior. La adenohipófisis está compuesta por los lóbulos intermedio y anterior. El lóbulo intermedio lo componen los melanotropos que secretan β -endorfinas y melanotropinas (α - y β -MSH). Por otra parte, el lóbulo anterior está compuesto por seis tipos celulares distintos encargados de secretar diversas hormonas. Los gonadotropos, liberan gonadotropinas (FSH y LH), los lactotropos secretores de prolactina (PRL), los somatotropos productores de hormona de crecimiento (GH), los tirotropos secretores de tirotropina (TSH) y los corticotropos que secretan adrenocorticotropina (ACTH) (Stojilkovic *et al.*, 2010).

Existen distintas líneas celulares provenientes de la hipófisis, una de ellas es la línea celular GH3. Las células GH3, provienen de un adenoma hipofisiario de rata y pertenecen a una población del lóbulo anterior conocida como lactosomatotropos. Una de las características principales de los lactosomatotropos es que tienen la capacidad de secretar tanto hormona de crecimiento (GH) como prolactina (PRL). Sin embargo, estas células pueden diferenciarse en somatotropos clásicos (secretores exclusivos de GH) o lactotropos clásicos (secretores exclusivos de PRL; Stojilkovic *et al.*, 2010). Esta línea celular presenta corrientes de Ca^{2+} a través de canales Ca_v tanto LVA como HVA. Así, se ha identificado la expresión los tres tipos de canales LVA ($Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$; Mudado *et al.*, 2004; Toledo *et al.*, 2012), mientras que de los canales Ca_v HVA, se ha detectado el ARN mensajero para $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$, $Ca_v2.1$ y de las subunidades auxiliares $Ca_v\beta1$, $Ca_v\beta2$, $Ca_v\beta3$ y $Ca_v\beta4$ (Liévano *et al.*, 1994; Safa *et al.*, 2001). Asimismo, existen reportes que muestran la expresión del ARN mensajero para $Ca_v\alpha_2\delta$ en células GH3 (Safa *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2002).

La diferenciación a los distintos tipos celulares de la adenohipófisis depende de varios elementos, uno de ellos es la exposición a factores o estímulos externos como los factores de crecimiento, entre los que destaca el factor de crecimiento epidérmico (EGF; Stojilkovic *et al.*,

2010). El EGF es un polipéptido de 53 aminoácidos que se origina por el procesamiento proteolítico de su precursor, y que posee dos regiones hidrofóbicas, una que contiene un péptido-señal y otra que lo ancla a la membrana celular. El receptor a EGF (EGFR), también conocido como *ErbB1* o *HER1*, es un receptor transmembranal con actividad de tirosina cinasa intrínseca. Cuando el EGF se une a su receptor, éste forma dímeros con otros EGFRs activando su autofosforilación y desencadenando la activación de vías de señalización como Ras/Raf/MEK/ERK, JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR y PLC γ /PKC, las cuales regulan importantes procesos fisiológicos como la proliferación, migración y diferenciación celulares (Zeng & Harris, 2014).

En cuanto al papel de los factores de crecimiento en la hipófisis, diversos estudios han mostrado que el tratamiento con EGF incrementa la síntesis y secreción de PRL (Schonbrunn *et al.*, 1980; Kiino & Dannies, 1981; White & Bancroft, 1983; Prager *et al.*, 1988). Asimismo, Felix y colaboradores (1995) mostraron que el tratamiento crónico con EGF induce la diferenciación de las células GH3 a lactotropos clásicos. Mediante ensayos de inmunocitoquímica, en ese trabajo se muestra un aumento en el número de células GH3 productoras de PRL en respuesta al tratamiento crónico (6 d) con 5 nM de EGF (Fig. 6A). Los resultados de dicho estudio muestran asimismo que este incremento es dependiente del tiempo de incubación con el EGF, y no se asocia con cambios en la cantidad de células productoras de GH (Fig. 6B).

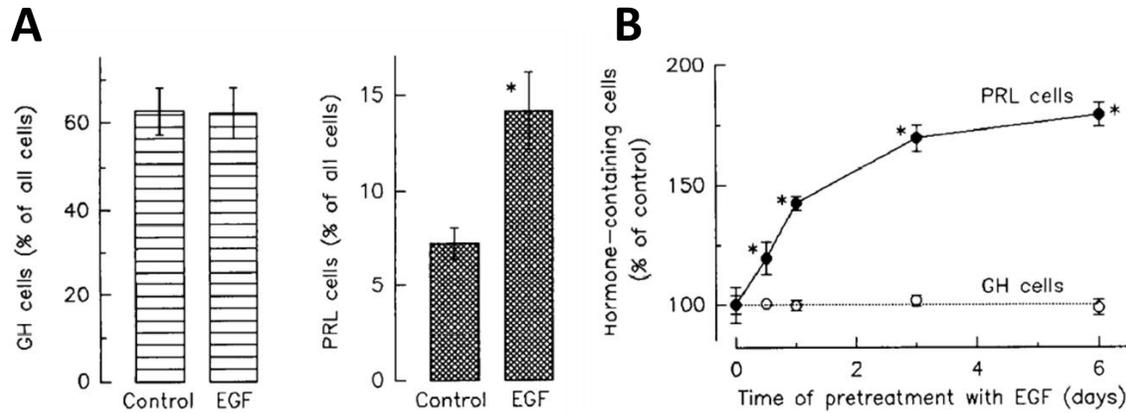


Figura 6. El EGF induce la diferenciación a células productoras de PRL en la línea celular GH3. (A) Porcentaje de células GH3 inmunorreactivas a la hormona de crecimiento (GH) o prolactina (PRL) en condiciones control o después del tratamiento con EGF (5 nM) por 6 d. (B) Curso temporal del efecto del EGF sobre el porcentaje de células GH3 que contienen ya sea GH o PRL (modificado de Felix *et al.*, 1995).

Se sabe, asimismo, que el papel de los canales iónicos en las células hipofisarias se centra en regular tres procesos fundamentales, la transducción de la actividad eléctrica, la señalización por Ca^{2+} y la secreción de hormonas. Los canales Ca_v participan en estos tres procesos al contribuir a determinar cambios transitorios en la concentración intracelular de Ca^{2+} . Sin embargo, estos canales podrían además estar participando en otros procesos celulares como la expresión génica (Stojilkovic *et al.*, 2010).

De manera interesante, se ha reportado que la diferenciación de las células GH3 en respuesta al tratamiento crónico (5-6 d) con EGF, se asocia con un aumento en la densidad de la corriente a través de canales HVA (Felix *et al.*, 1995). Estos estudios muestran también que el incremento en las corrientes es dependiente del tiempo de incubación con el EGF y que el tratamiento con el factor de crecimiento parece no producir alteraciones en las propiedades biofísicas de los canales, como la conductancia y la inactivación en el estado estacionario (Meza

et al., 1994). Por otro lado, al activar las corrientes LVA con pulsos a -30 mV no se observaron cambios entre las condiciones control y de tratamiento con EGF. En conjunto, estos resultados sugieren que el aumento en la densidad de corriente a través de canales HVA generado por el tratamiento con EGF podría estar relacionado con un incremento en el número de canales funcionales en la membrana celular (Fig. 7).

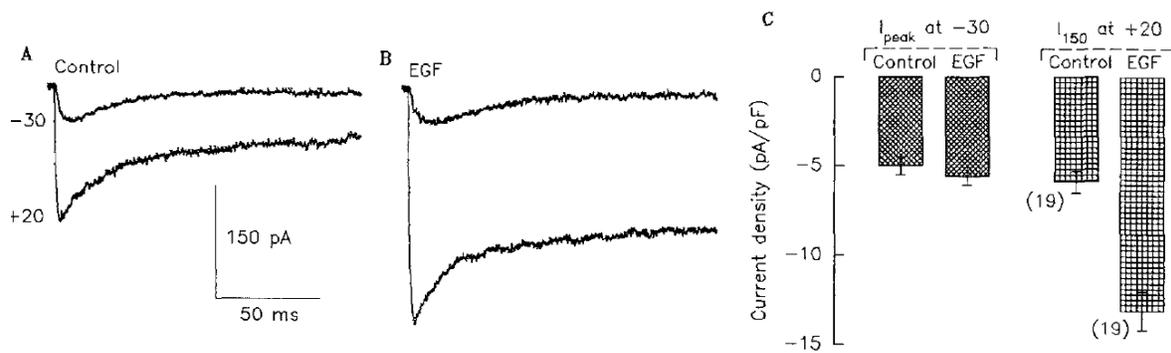


Figura 7. El EGF incrementa la densidad de las corrientes de Ca^{2+} (HVA) en las células GH3. Trazos representativos de las corrientes de Ca^{2+} inducidas por pulsos a -30 y +20 mV en células control (A) y en células tratadas por 5 d con 5 nM de EGF (B). (C) Densidad de corriente máxima a -30 y +20 mV en células control o incubadas por 5-6 d con 5 nM de EGF (modificado de Meza *et al.*, 1994).

1.4 Cambios en la expresión de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ inducidos por el EGF.

Como se mencionó anteriormente, el tratamiento crónico con EGF induce un cambio en la proporción de células con un fenotipo secretor dual de PRL y GH (lactosomatotropos) a uno de células exclusivamente secretoras de PRL (lactotropos) en cultivos de la línea celular GH3. Asimismo, se sabe que el tratamiento con EGF se asocia con un incremento en la proporción de canales HVA funcionales en la membrana plasmática de las células GH3 y también se sabe que una de las funciones principales de la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ es aumentar el número de

canales de Ca^{2+} HVA en la membrana plasmática. Por ello resulta razonable plantearse el papel que pudiera estar jugando el EGF sobre la expresión de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$.

De igual manera, dado que se sabe que las vías de señalización activadas por EGF pueden resultar en la transcripción de diversos genes (Al Moustafa *et al.*, 2012; Roskoski, 2014; Zeng & Harris, 2014), en el laboratorio estamos interesados en determinar si el tratamiento con EGF de las células GH3 pudiera generar, específicamente, un incremento en la actividad transcripcional del gen *CACNA2D1* que codifica para la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$. En este sentido, cabe mencionar que, en trabajos previos del laboratorio se caracterizó la secuencia de este promotor y se clonó en un vector que contiene un gen reportero (pGL3 basic) para estudiar su actividad transcripcional mediante ensayos de luciferasa (Martínez-Hernández *et al.*, 2013). Más recientemente, en el laboratorio se midió el efecto del EGF (5 nM) sobre la actividad transcripcional del gen *CACNA2D1* en células GH3, y los resultados muestran un aumento en la actividad transcripcional, con una actividad máxima después de 5 min de incubación (Fig. 8).

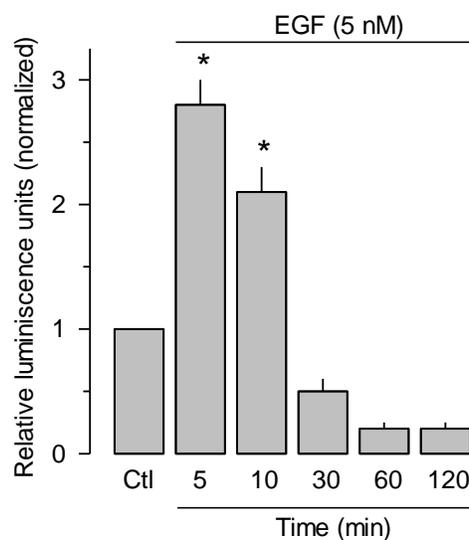


Figura 8. El EGF incrementa la actividad transcripcional del promotor del gen *CACNA2D1* en células GH3. Actividad transcripcional del promotor para $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ en células GH3 transfectadas

con el plásmido que contiene al promotor de *CACNA2D1* clonado en el vector reportero pGL3-Basic en condiciones control o incubadas con 5 nM de EGF a distintos tiempos. La gráfica de barras indica la actividad de luciferasa expresada en unidades relativas de luz normalizada con respecto al control ($n=4$ experimentos independientes; $*p < 0.001$ ANOVA de una vía) (Duran *et al.*, 2020).

De igual manera, se decidió determinar si las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR y la vía de señalización de las MAPKs se estaban activando en respuesta a los tratamientos con EGF en esta línea celular. Para ello, se incubaron las células GH3 con 5 nM de EGF a distintos tiempos y se midió el nivel de fosforilación de AKT y de ERK 1/2 respectivamente (Fig. 9). Los resultados mostraron un aumento en los niveles de fosforilación tanto para AKT como para ERK 1/2. De manera interesante, el curso temporal de la fosforilación de ERK 1/2 es similar al observado para la actividad transcripcional del promotor de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ (Figs. 8 y 9A), lo cual sugiere que la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK puede ser la responsable de activar la transcripción de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ en respuesta al EGF en las células GH3.

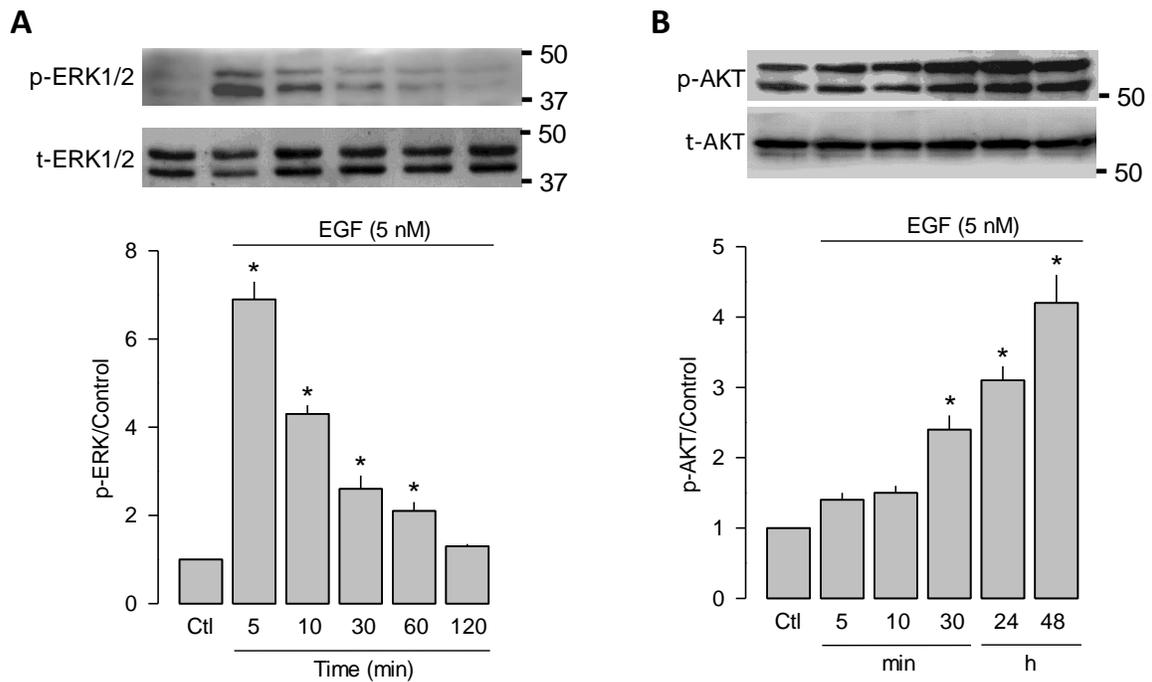


Figura 9. El EGF induce la fosforilación de ERK 1/2 y AKT en células GH3. (A) Nivel de fosforilación de ERK 1/2 en células GH3 tratadas con 5 nM de EGF a distintos tiempos, detectado por ensayos de *Western blot* usando anticuerpo un anti-fosfo-ERK 1/2 (p-ERK1/2) y anti-ERK total (t-ERK1/2) (panel superior). La gráfica de barras muestra la cuantificación de la señal de fosforilación de ERK 1/2 normalizada con respecto al control ($n=3$ experimentos independientes) (B) Nivel de fosforilación de AKT en células GH3 tratadas con 5 nM de EGF a distintos tiempos, detectado por ensayos de *Western blot* usando un anticuerpo anti-fosfo-AKT (p-AKT) y otro anticuerpo anti-AKT total (t-AKT) (panel superior). La gráfica de barras muestra la cuantificación de la señal de fosforilación de AKT normalizada con respecto al control ($n=3$ experimentos independientes; * $p < 0.001$ ANOVA de una vía) (Duran *et al.*, 2020).

Asimismo, para determinar los posibles factores de transcripción involucrados en la transcripción de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ en respuesta al EGF, en el laboratorio se han identificado mediante herramientas bioinformáticas las secuencias consenso para distintos factores de transcripción activados por la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK. Específicamente, la atención se ha centrado en CREB y ELK-1 debido a que estos factores son activados por ERK 1/2 y a que se han visto involucrados en procesos de diferenciación (Shaywitz & Greenberg, 1999; Roskoski, 2012). Así, se identificaron dos posibles sitios de unión para CREB y un sitio para ELK-1 (Fig. 10; panel superior). Con el fin de estudiar la participación de estos factores de transcripción como responsables de activar la transcripción de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ en respuesta al EGF, se usaron las diferentes construcciones obtenidas anteriormente en el laboratorio mediante eliminaciones secuenciales de la construcción del promotor completo del gen *CACNA2D1* (Martínez-Hernández *et al.*, 2013), con la finalidad de medir su actividad transcripcional en respuesta al factor de crecimiento (Fig. 10). Los resultados muestran una disminución significativa en los niveles de transcripción al eliminar una región de 600 pares de bases (construcción p0.9) en donde se encuentra ubicado el primer posible sitio de unión para CREB, denominado CREB (1), y el sitio de unión a ELK-1 (Fig.

10). Estos resultados sugieren que los posibles sitios de unión a estos factores de transcripción son importantes para generar el aumento en la transcripción de Cav $\alpha_2\delta$ -1 en respuesta al EGF.

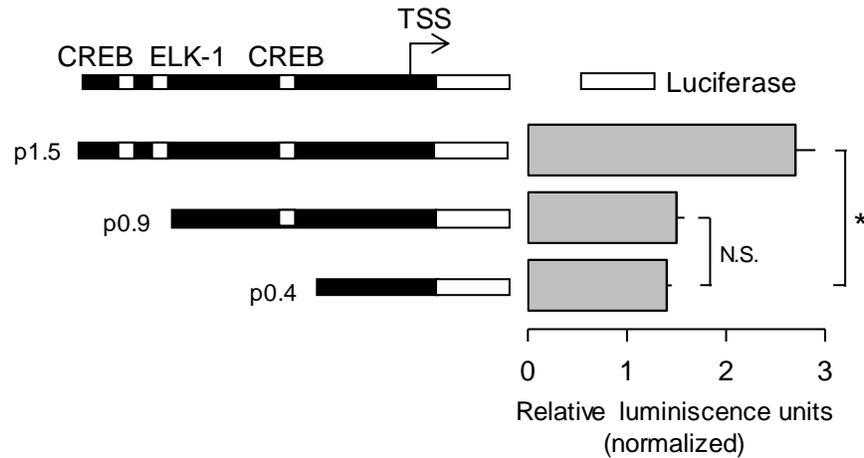


Figura 10. El EGF incrementa la actividad transcripcional del promotor del gen *CACNA2D1* en células GH3. Actividad transcripcional del promotor para Cav $\alpha_2\delta$ -1 en células GH3 transfectadas con el plásmido que contiene al promotor de *CACNA2D1* completo (p1.5) o fragmentos del mismo (p0.9 y p0.4) y tratadas con 5 nM de EGF por 5 min. La gráfica de barras indica la actividad de luciferasa expresada en unidades relativas de luz normalizadas con respecto al control ($n=5$ experimentos independientes; * $p < 0.001$ ANOVA de una vía) (Duran *et al.*, 2020).

2. Planteamiento del problema

Los canales Cav tienen funciones relevantes en muy diversos tipos celulares incluyendo los del sistema endócrino en general y la hipófisis en particular. En este contexto, se sabe que los canales Cav contribuyen a la generación de potenciales de acción, la liberación de hormonas y la señalización por Ca^{2+} . Sin embargo, poco se conoce acerca de su regulación a nivel molecular en estas células. Reportes previos muestran que el tratamiento crónico de EGF resulta en un aumento en la cantidad de PRL secretada asociado a un incremento en el número de lactotrofos clásicos en la línea celular GH3. Asimismo, se ha reportado un aumento en las corrientes de Ca^{2+} a través de los canales Cav HVA, probablemente debido a un incremento en el número de canales funcionales en la membrana celular. Estudios realizados en nuestro laboratorio sugieren que este aumento pudiera deberse a un incremento en la cantidad de subunidad $Cav\alpha_2\delta-1$ expresada en respuesta al tratamiento con el factor de crecimiento. Sin embargo, los mecanismos moleculares por el cual esto ocurre aún se desconocen.

3. Hipótesis de trabajo

En este trabajo de tesis se investiga el posible mecanismo por el cual el EGF regula la expresión funcional de los canales Cav HVA en células adenohipofisarias secretoras de PRL, empleando como sistema modelo de estudio a las células GH3. La hipótesis del presente trabajo predice que el EGF aumenta la expresión de la subunidad Cav $\alpha_2\delta$ -1 a nivel transcripcional y dado que $\alpha_2\delta$ -1 favorece la localización membranal de los canales HVA, un incremento en su expresión podría explicar los cambios en la densidad de corriente en respuesta al tratamiento con el factor de crecimiento.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Determinar el mecanismo molecular por el cual el EGF regula la expresión de la subunidad auxiliar $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$ de los canales de Ca^{2+} de alto umbral de activación (HVA).

4.2 Objetivos Específicos

1. Determinar si los factores de transcripción ELK-1 y CREB se activan en respuesta al tratamiento con EGF en la línea celular GH3.
2. Describir la participación de ELK-1 y CREB en la regulación de la actividad transcripcional de $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$ en respuesta a EGF.
3. Identificar los sitios de unión en el promotor del gen *CACNA2D1*, que codifica para la subunidad $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$, a los factores de transcripción ELK-1 y CREB activados por EGF.
4. Demostrar la importancia funcional de los factores de transcripción ELK-1 y CREB sobre las propiedades de las corrientes a través de canales Ca_v en la línea celular GH3.
5. Investigar la posible repercusión funcional del aumento en la expresión de la subunidad $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$ por EGF sobre la secreción de prolactina usando cultivos de células GH3.

5. Materiales y métodos

La estrategia experimental que se siguió para determinar el mecanismo molecular por el cual el factor de crecimiento epidérmico (EGF) regula la expresión de la subunidad auxiliar Cav $\alpha_2\delta$ -1 se conforma por dos partes principales. En la primera parte se investigó el mecanismo molecular usando métodos bioquímicos y de biología molecular, y en la segunda se evaluó la repercusión funcional usando electrofisiología y métodos de biología celular.

5.1 Cultivo celular.

Todos los experimentos se realizaron usando la línea celular GH3 (ATCC, CCL-82.1) la cual proviene de un adenoma de hipófisis de rata. Las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino, 2 mM L-glutamina, penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 μ g/mL). Las células se incubaron en una atmósfera de 5% CO₂ a una temperatura de 37°C.

5.2 Extracción de proteínas e inmunoelectrotransferencia (Western blot).

Las células GH3 sembradas en cajas Petri de 60 mm se lavaron con PBS y posteriormente se trataron con 250 μ L de *buffer* de lisis RIPA (100 mM Tris-HCl [pH 8], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA [pH 8], 1% Triton x-100, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 1 mM fluoruro de fenil-metil-sulfonil [PMSF] y Protease inhibitor cocktail (cOmplete) 1X [Roche]), y se incubaron en hielo por 30 min. El lisado celular se recuperó después de centrifugar la muestra por 2 min a 12000 x *g* y recolectar el sobrenadante. Para analizar y medir la expresión de las proteínas se realizaron ensayos de inmunoelectrotransferencia (Western blot) como se describe a continuación.

El análisis de las proteínas se realizó bajo condiciones reductoras y desnaturizantes. Para ello se utilizaron 50 μ g de proteínas mezcladas con el *buffer* Laemmli 1X (1.6% SDS, 0.1 M 2-

mercaptoetanol, 5% glicerol, 0.083 M 4X Tris-Cl/SDS pH 6.8 y 0.002% azul de bromofenol). Las muestras se calentaron a 95°C por 5 min y las proteínas se separaron electroforéticamente (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 8%, en una cámara de electroforesis (Biorad) utilizando un *buffer* de electroforesis con SDS (0.025 M Tris-base, 0.192 M glicina, 0.1% SDS). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron (usando un *buffer* de transferencia, 48 mM Tris-base, 39 mM glicina, 20% metanol) a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μ m (Biorad) por 2 h a \sim 20 V.

Para confirmar la correcta transferencia de las proteínas, las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau. Posteriormente se lavaron con *buffer* TBST (10 mM Tris base [pH 7.6], 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20) y se bloquearon con leche sin grasa al 5% en *buffer* TBST por 2 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron a 4°C por 1 h con el anticuerpo primario anti-cadherina (1:20000, ThermoFisher Scientific) o toda la noche con los anticuerpos primarios; anti-Ca ν α $_2\delta$ 1 (1:1000, 015 Alomone Labs); anti-CREB (1:1000, 86B10 Cell Signaling); anti-p-CREB (1:1000, 87G3 Cell Signaling); anti-ELK-1 (1:1000, 355 SantaCruz Biotechnology); anti-p-ELK-1 (1:500, 135646 SantaCruz Biotechnology); anti-HA (1:1000, 7392 SantaCruz Biotechnology); anti-FLAG (1:1000, 8146 Cell Signaling); anti-ERK 1/2 (1:500, 81492 SantaCruz Biotechnology); anti-p-ERK 1/2 (1:500, 135900 SantaCruz Biotechnology); anti-actina (1:200, generosamente proporcionado por el Dr. Manuel Hernández, Depto. de Biología Celular, Cinvestav), disueltos en TBST. Al día siguiente, se realizaron lavados secuenciales de 15, 10 y 5 min con TBST y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) anti-ratón (1:5000 Invitrogen, en TBST) o anti-conejo (1:5000 Invitrogen, en TBST con leche al 5%). A continuación, se realizaron lavados secuenciales de 15, 10 y 5 min con TBST y se realizó la inmunodetección de

las proteínas con el reactivo *Immobilon Western* (Millipore). Las señales de quimioluminiscencia emitidas se detectaron con el equipo Odyssey Fc (LI-COR).

5.3 Biotinilación de proteínas de superficie celular.

La separación de las proteínas expresadas en la superficie celular se realizó mediante la técnica de biotinilación. A partir de una caja Petri de 35mm de diámetro previamente sembrada con células GH3 a una confluencia del ~80% se realizó un tratamiento por 48 h con EGF (5 nM, Sigma E9644). Posteriormente, las células se lavaron con PBS/CaCl₂/MgCl₂ (17.4 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM NaH₂PO₄, 0.9 mM CaCl₂, 3.5 mM KCl, 0.9 mM MgCl₂, 137 NaCl, pH 7.4) y se incubaron en agitación suave por 30 min a 4°C con 800 µL de Sulfo-NHS-SS-Biotin (0.5 mg/mL en PBS/CaCl₂/MgCl₂; PG82078 Pierce). Se retiró la solución con la biotina y se realizaron 3 lavados de 5 min en agitación suave a 4°C con 800 µL de 50 mM de glicina (en PBS/CaCl₂/MgCl₂). A continuación, se lavaron las células con PBS/CaCl₂/MgCl₂ y se realizó la extracción de proteínas con 120 µL de *buffer* de lisis RIPA. Para la extracción de las proteínas de membrana las células se sonicaron 5 veces por 10 s manteniéndolas en hielo y con un descanso de 5 min entre cada pulso. La muestra se centrifugó 15 min a 16,000 x *g* para recuperar el lisado de proteínas de membrana en la fracción soluble.

Para separar las proteínas de la superficie celular marcadas con biotina, el lisado de proteínas totales se incubó en rotación por 2 h a 4°C con 40 µL de NeutroAvidin Agarose (29201 Pierce) previamente lavadas con *buffer* de lisis RIPA. Terminado el tiempo de incubación, se centrifugó la muestra por 2 min a 16,000 x *g*, se desechó el sobrenadante y se lavó la agarosa 5 veces con 500 µL de *buffer* de lisis RIPA. Para separar las proteínas de membrana de la agarosa se agregaron 30 µL de buffer de carga reductor (62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8], 5% glicerol, 1% SDS) y 3 µL de DTT (0.5 M) y se incubó en rotación constante por 1 h a temperatura ambiente. Por último,

se centrifugó por 2 min a 16,000 x *g* y se recuperó la fracción soluble para ser analizada por *Western blot* semicuantitativo. El análisis se llevó a cabo mediante la medición de la intensidad de las bandas con ayuda del programa *ImageJ* (NIH 1.51j8).

5.4 Transfección transitoria para el silenciamiento de ELK-1 y CREB.

El silenciamiento de los factores de transcripción ELK-1 y CREB se realizó usando el método de interferencia del ARN el cual consiste en disminuir la cantidad de ARN mensajero mediante su degradación por medio de la transfección de diversas moléculas. Debido a que el silenciamiento experimental de genes usando ARNs pequeños de interferencia (siRNAs) es una técnica muy utilizada y a que éstos pueden disminuir la expresión de un gen hasta un 85%, se decidió usar estas moléculas para este trabajo experimental.

Así, para el silenciamiento de ELK-1 y CREB, las células GH3 se transfectaron con siRNAs específicos para los factores de transcripción (Tabla 2), y siRNAs inespecíficos o *scramble* (Sc-37007, SantaCruz Biotechnology) como control negativo, marcados con Cy3. El marcaje de los siRNAs se realizó con el propósito de evaluar la eficiencia de transfección y para identificar las células transfectadas para el registro electrofisiológico de las corrientes de Ca²⁺. El marcaje se realizó usando el paquete comercial *Silencer siRNA Labeling Kit* (AM1632 Life Technologies) siguiendo el protocolo correspondiente.

Nombre	Blanco	Secuencia del oligonucleótido
<i>siRNA ELK-1</i>	Sitio de unión en ELK-1	5'-GAAGCAGCCGGAUUGAAUA-3' 5'-UAUUCAUUCGGCUGCUUC-3'
<i>siRNA CREB 1a</i>	Sitio de unión en CREB	5'-CAGCCAUCAGUUAUUCAGU-3' 5'-ACUGAAUAACUGAUGGCUG-3'
<i>siRNA CREB 1b</i>	Sitio de unión en CREB	5'-GAGCAAUACAGCUGGCUAA-3' 5'-UUAGCCAGCUGUAUUGCUC-3'

Tabla 2. Secuencias de siRNAs empleados para el silenciamiento de los factores de transcripción ELK-1 y CREB. Se muestra el nombre de la secuencia, el blanco molecular y las secuencias de los siRNAs empleados.

En el registro electrofisiológico se usaron células GH3 cultivadas en cajas Petri de 35 mm a una confluencia de ~70% transfectadas mediante la técnica de lípidos catiónicos usando el paquete comercial *Lipofectamine RNAiMAX* (Invitrogen) con 75 pmol de siRNAs marcados. Para los ensayos de actividad del promotor, se transfectaron las células GH3 cultivadas en cajas Petri de 35 mm a una confluencia de ~70% mediante la técnica de lípidos catiónicos usando el paquete comercial *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) con 75 pmol de siRNAs marcados, 2 µg de los plásmidos que contienen el promotor del gen *CACNA2D1* y 400 ng del plásmido pRL-CMV (Promega) que contiene la secuencia que codifica para la luciferasa de *Renilla* que se usó para normalizar los datos y eliminar la eficiencia de transfección como una variable.

5.5 Clonas de ADNc y transfección transitoria de las células GH3.

La expresión heteróloga de la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta-1$ se realizó en células GH3 cultivadas en cajas Petri de 35 mm a una confluencia de ~80%, usando la técnica de polímeros catiónicos siguiendo las instrucciones del paquete comercial *Turbofect* (ThermoFisher Scientific). Se usó 1.6 µg de la construcción de ADNc que codifican para $Ca_v\alpha_2\delta-1$ (ID: M86621), donada por el Dr. Kevin P. Campbell del Departamento de Fisiología y Biofísica de la Universidad de Iowa, EUA. De igual manera, se co-transfectó como gen reportero 1 µg de la construcción pGreen Lantern-1 (Gibco/BRL) de ADNc que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP).

Para los ensayos de actividad del promotor, se transfectaron las células GH3 cultivadas en cajas de 96 pozos mediante la técnica de lípidos catiónicos usando el paquete comercial

Lipofectamine with Plus reagent (Invitrogen) con 200 ng de los plásmidos que contienen el promotor del gen *CACNA2D1* y 30 ng del plásmido pRL-CMV (Promega) que contiene la secuencia que codifica para la luciferasa de *Renilla* que se usó para normalizar los datos y eliminar la eficiencia de transfección como una variable.

La expresión heteróloga del factor de transcripción ELK-1 para la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) se hizo en células GH3 cultivadas en cajas Petri de 100 mm a una confluencia de ~70%, usando la técnica de lípidos catiónicos siguiendo las instrucciones del paquete comercial *Lipofectamine Plus* (Invitrogen). Se usaron 10 µg de la construcción de ADNc pCGN-ELK-1 (27156 Addgene), y como gen reportero 2 µg de la construcción pGreen Lantern-1 (Gibco/BRL) que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP).

Asimismo, se realizó la transfección transitoria de los factores de transcripción ELK-1 y CREB para el registro electrofisiológico en células GH3 cultivadas en cajas Petri de 35 mm a una confluencia de ~70%, usando la técnica de lípidos catiónicos siguiendo las instrucciones del paquete comercial *Lipofectamine Plus* (Invitrogen). Se usó la construcción de ADNc que codifica para ELK-1 de humano con una bandera de hemaglutinina (HA; YPYDVPDYA); 2.5 µg de pCGN-ELK-1 (27156 Addgene), y la construcción de ADNc que codifica para CREB de rata con una bandera FLAG (DYKDDDDK); 2.5 µg de pCF-CREB (22968 Addgene). En todos los casos se incluyó en la mezcla de transfección 1 µg de la construcción pGreen Lantern-1 (Gibco/BRL) que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), como gen reportero. Para realizar el registro electrofisiológico, las células GH3 transfectadas se sembraron en cajas de cultivo de 35 mm sobre cubreobjetos de vidrio estériles de ~3 x 9 mm pre-tratados con poli-L-lisina.

5.6 Ensayos de actividad del promotor.

Las células GH3 se transfectaron con las diferentes construcciones del promotor del gen *CACNA2D1* silvestre o con mutaciones en los sitios de unión a ELK-1 y CREB, clonadas en el plásmido reportero pGL3-Basic (Promega), en conjunto con el plásmido pRL-CMV como control de transfección. Siguiendo el protocolo del paquete comercial *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega), 48 h después de la transfección se realizó un tratamiento de 5 min con EGF (5 nM), y posteriormente las células se trataron con el reactivo *Dual-Glo Luciferase*, para finalmente incubarse 10 min a temperatura ambiente. A continuación, se midió la luminiscencia de la reacción de la enzima luciferasa de luciérnaga usando un luminómetro (Modulus-Turner Biosystems). Después, se agregó el reactivo *Dual-Glo Stop & Glo* y se incubaron 10 min a temperatura ambiente. En seguida, se midió la luminiscencia de la reacción de la enzima luciferasa de *Renilla* usando un luminómetro (Modulus-Turner Biosystems). Para normalizar los datos de luminiscencia se calculó la relación de medición de luz de luciérnaga (reportero experimental) contra los de *Renilla* (reportero control) para cada muestra.

5.7 Mutagénesis sitio dirigida y secuenciación de clonas.

Para realizar las mutaciones en las clonas de ADNc de la región promotora del gen *CACNA2D1* se usó el paquete comercial *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies) y se siguió el protocolo correspondiente. La amplificación por PCR de las clonas de ADNc se realizó empleando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 3. La mezcla de reacción para la mutagénesis de las clonas de la región promotora de *CACNA2D1* fue la siguiente: 5 µL del *buffer* de reacción (5X), 1 µL de la mezcla de dNTP, 3 µL del reactivo *QuikSolution*, 125 ng de cada oligonucleótido (sentido y antisentido respectivamente), 150 ng de la clona silvestre como

muestra y se completó con agua estéril hasta un volumen de 50 μL y se agregó 1 μL de la polimerasa de ADN *PfuUltra* HF (2.5 U/ μL).

Gen	Mutación	Secuencia del oligonucleótido
<i>CACNA2D1</i>	Sitio de unión a ELK-1	5'-GTTTTATCTCCAGACTCAGATTTAGCAGTGGCGG GCTTTCTCCTT-3'
		5'-AAGGAGAAAGCCCGCCACTGCTAAATCTGAGTCT GGAGATAAAAC-3'
<i>CACNA2D1</i>	Sitio de unión a CREB	5'-GTAGTGTATGAGAATACTTTTGACATGAAAGGCAGA GAATACAATTTGTGATGACTATC-3'
		5'-GATAGTCATCACAAATTGTATTCTCTGCCTTTCATGTC AAAAGTATTCTCATACACTAC-3'

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la amplificación y mutación sitio dirigida de la región promotora de *CACNA2D1*. Se muestra el nombre del gen, la mutación correspondiente y la secuencia del oligonucleótido diseñada en sentido y antisentido respectivamente.

El protocolo de amplificación por PCR consistió en 18 ciclos de amplificación, desnaturalización a 95°C por 50 s, alineamiento a 60°C por 50 s y extensión a 68°C por 7 min, contando con un paso inicial de 1 min a 95°C y un paso final de 7 min a 68°C. Después de la amplificación por PCR se dejó la mezcla de reacción en hielo por 2 min, posteriormente se agregó 1 μL de la enzima *DpnI* (10 U/ μL) y se dejó incubando 1 h a 37°C. La mezcla de reacción se utilizó para transformar bacterias *Escherichia coli* competentes *Top10* (Invitrogen) por medio de una transformación química. El protocolo de transformación es el siguiente: las bacterias competentes se mantienen en hielo y se agregan el total de la mezcla de reacción y se deja incubando en hielo por 30 min. Posteriormente, se aplica un choque térmico al incubarlas por 2 min a 42°C y después 2 min en hielo. Se agregan 800 μL de medio Luria Bertani (LB) y se incubaron por 60 min a 37°C en agitación constante. Se siembran 200 μL de bacterias transformadas en cajas

con LB agar con 100 µg/mL de ampicilina y se dejan incubando por 16 h a 37°C. Las colonias obtenidas se resiembran en medio LB con 100 µg/mL de ampicilina y se incuban por 16 h a 37°C en agitación constante. Para seleccionar las clonas con el inserto deseado, los plásmidos se extraen por lisis alcalina y se realiza la digestión de los mismos con 1 µL de la enzima *BglII*.

Para la secuenciación automática de las clonas de ADNc de la región promotora del gen *CACNA2D1* con las mutaciones al sitio de unión de ELK-1 y CREB, se usó el paquete comercial *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) y se siguió el protocolo correspondiente. La amplificación por PCR de las clonas de ADNc se realizó empleando el oligonucleótido que se muestra en la Tabla 4. La mezcla de reacción para la secuenciación de las clonas de la región promotora de *CACNA2D1* fue la siguiente: 8 µL del *buffer* de reacción *Terminator Ready Reaction Mix*, 3.2 pmol de oligonucleótido, 150 ng de la clona como muestra y se completó con agua estéril hasta un volumen final de 20 µL.

Gen	Número de acceso a GenBank	Secuencia del oligonucleótido
<i>CACNA2D1</i>	NG_009358.2	5'-CAGAGAGCTGGAAAATTCAT-3'

Tabla 4. Oligonucleótido empleado para la amplificación y secuenciación de la región promotora de *CACNA2D1*. Se muestra el nombre del gen, el número de acceso en la base de datos *GenBank* y la secuencia del oligonucleótido diseñada.

El protocolo de amplificación por PCR consistió en 25 ciclos de amplificación, desnaturalización a 96°C por 10 s, alineamiento a 50°C por 5 s y extensión a 60°C por 4 min, contando con un paso inicial de 1 min a 96°C. Los productos de la reacción se precipitaron con

EDTA/etanol y se secuenciaron automáticamente con el secuenciador (Applied Biosystems) en el Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav.

5.8 Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-PCR).

Las células GH3 se transfectaron con el plásmido pCGN-ELK-1 para la sobreexpresión del factor de transcripción ELK-1. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se realizó un tratamiento con EGF (5 nM) por 10 min. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se agregó *buffer* PBS con formaldehído al 0.75% para provocar el entrecruzamiento de proteínas con el ADN. Las muestras se incubaron por 10 min a temperatura ambiente en agitación suave. Posteriormente, para detener el entrecruzamiento, se agregó glicina (a una concentración final de 125 mM) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente en agitación suave. Al terminar, las células se lavaron con PBS y se prosiguió con la extracción de los núcleos.

Para la extracción de los núcleos celulares, las células se trataron con una solución TM2 (10 mM Tris-HCl [pH 8], 2 mM MgCl₂, 0.5 mM PMSF y 1X cComplete) y se incubaron en hielo por 10 min. A continuación, se agregó Triton x-100 (a una concentración final de 1%) y se incubó en hielo por 10 min. Posteriormente, se hizo pasar la mezcla siete veces a través de una aguja calibre 22 y se observó al microscopio una alícuota de 10 µl sobre un portaobjetos. Una vez que se verificó la presencia de los núcleos libres de citoplasma, se centrifugó a 2,000 x *g* durante 5 min y se eliminó el sobrenadante que corresponde a remanente citoplasmático. Los núcleos se resuspendieron en *buffer* de lisis FA (50 mM HEPES-KOH [pH 7.5], 140 mM NaCl, 1 mM EDTA [pH 8], 1% de Triton x-100, 0.1% de desoxicolato de sodio, 0.1% de SDS, 0.5 mM de PMSF y cComplete 1X) y se sonicaron 4 veces por 15 s a una amplitud del 70%. A continuación, se centrifugó a 8,000 x *g* durante 1 min y se recuperó el sobrenadante que corresponde a la cromatina. Para determinar la integridad y

correcta fragmentación del DNA, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (50 ng/ μ L). Por último, se cuantificó la cantidad de proteínas por el método de Bradford (Biorad) y se prepararon alícuotas que se almacenaron a -70°C .

En los ensayos se emplearon 25 μ g de proteínas nucleares que se incubaron por 1 h a 4°C en agitación constante con 20 μ l de Proteína G agarosa (Roche). Para evitar la unión inespecífica se usó BSA (1 μ g/ μ L) y ADN de esperma de salmón (1 μ g/ μ L), y se incubó durante toda la noche con 3 μ g del anticuerpo anti-ELK-1. Posteriormente, las muestras se lavaron 3 veces con *buffer* de lavado A (20 mM Tris-HCl [pH 8], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA [pH 8], 1% de Triton x-100 y 0.1% de SDS), una vez con *buffer* de lavado B (20 mM Tris-HCl [pH 8], 500 mM NaCl, 2 mM EDTA [pH 8], 1% de Triton x-100 y 0.1% de SDS), y una vez con *buffer* de lavado C (10 mM Tris-HCl [pH 8], 250 mM LiCl, 1 mM EDTA [pH 8], 1% de NP-40 y 1% de desoxicolato de sodio). Todos los lavados se realizaron por 10 min a 4°C en agitación constante y centrifugando por 1 min a $2,000 \times g$.

Con la finalidad de eluir el ADN, a las muestras se agregaron 150 μ L de *buffer* de elución (100 mM NaHCO_3 y 1% de SDS) y se incubaron por 30 min a 65°C . A continuación, se centrifugó por 5 min a $2,000 \times g$ y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf nuevo. Para revertir el entrecruzamiento de las proteínas con el ADN, a las muestras se agregaron 400 μ L de *buffer* TBS (25 mM Tris y 150 mM NaCl a pH 7.2) y 5 μ l de Proteinasa K (20 mg/mL) y se incubaron toda la noche a 65°C . Posteriormente, se precipitó el ADN mediante el protocolo de fenol:cloroformo, se resuspendió en 100 μ L de agua inyectable y las muestras se cuantificaron usando un NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific). La amplificación por PCR se realizó empleando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 5. La mezcla de reacción de PCR fue la siguiente: 12.5 μ L de *SYBR Green/ROX qPCR Master Mix 2X* (ThermoFisher Scientific), 1.25 μ L del

oligonucleótido sentido y antisentido respectivamente (10 μ M), 50 ng de ADN obtenido y se completó con agua estéril hasta un volumen final de 25 μ L.

Producto de PCR	Número de acceso a GenBank	Secuencia del oligonucleótido	Tamaño esperado (pb)
c-FOS	AY786174.1	5'- CCTCCTTTACACAGGATGTCCA-3' 5'- AGGATTCGGGGATGGTTCC-3'	96
GAPDH	NM_017008.4	5'- GTTACCAGGGCTGCCTTCTC-3' 5'- GATGGTGATGGGTTTCCCGT-3'	177
Ca ν α $_2\delta$ -1	AF286488.1	5'- TTCTCCCCAGGGTGGAGGTAA-3' 5'- AGCGTGAACACAGAACCGAG-3'	104

Tabla 5. Oligonucleótidos usados para la amplificación de c-FOS, GAPDH y Cav α $_2\delta$ -1. Se muestra el nombre del gen, el número de acceso en la base de datos GenBank, la secuencia del oligonucleótido diseñada en dirección sentido y antisentido, respectivamente, y el tamaño esperado del producto amplificado.

El protocolo de amplificación por PCR consistió en 30 ciclos de amplificación, desnaturalización a 94°C por 45 s, alineamiento a 55°C por 30 s y extensión a 72°C por 30 s, contando con un paso inicial de 2 min a 94°C. Para identificar los productos amplificados se corrieron 20 μ L de la reacción a electroforesis en un gel de agarosa a 1.5% teñido con bromuro de etidio (50 ng/ μ L).

5.9 Electrofisiología.

El estudio de las corrientes de Ca $^{2+}$ se realizó por medio de la técnica de registro electrofisiológico de *patch clamp* en la modalidad de célula completa (Hamill *et al.*, 1981). Las células GH3 sembradas previamente en cubreobjetos pre-tratados con poli-L-lisina se colocaron en una cámara de registro con 500 μ L de solución externa (véase soluciones de registro). La observación

de las células se realizó con la ayuda de un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE300) adaptado con una lámpara de mercurio para la emisión de luz UV, con la finalidad de identificar las células GH3 que expresan la proteína GFP, o los siRNAs marcados con Cy3. Las micropipetas para el registro se fabricaron a partir de tubos capilares de vidrio de borosilicato (Kimble) en un estirador vertical (Sutter Instruments) y se pulieron en una microforja (Narishige). Las micropipetas llenas con la solución interna (véase soluciones de registro) tuvieron una resistencia de 2-3 M Ω y se sujetaron al electrodo de plata/cloruro de plata conectado a un cabezal CV 203BU (Molecular Devices) cuyo movimiento y posición se controla por un micromanipulador MP-285 (Sutter Instruments). El electrodo de registro estuvo conectado a un amplificador operacional Axopatch 200B (Molecular Devices) enlazado a un convertidor analógico/digital Digidata 1440A controlado por una computadora. Para la generación de los protocolos de pulsos, captura de los datos y análisis de los registros se usó el programa Clampex 10.2 (Molecular Devices).

Después de conseguir la configuración de célula completa, los transitorios capacitativos se eliminaron con la función de cancelación analógica del amplificador. La resistencia en serie por lo general fue de 2-10 m Ω , mientras que la capacitancia de la membrana se determinó como en un trabajo previo (Avila *et al.*, 2004) y se usó para normalizar las corrientes. Para evocar las corrientes a través de los canales nativos se aplicaron pulsos despolarizantes de 140 ms de duración desde el potencial de mantenimiento de -80 mV hasta -10 mV. Los componentes lineales incluyendo la capacitancia parásita se restaron digitalmente aplicando un protocolo estándar P/4.

Para determinar la dependencia al voltaje de las corrientes se aplicó un protocolo de pulsos despolarizantes de 100 ms en incrementos de 5 mV en el rango de -70 mV a 60 mV. El potencial de membrana (V_h) se mantuvo a -80 mV; en cada una de las células registradas se determinó la

corriente al pico para construir las curvas corriente-voltaje (I - V). La corriente máxima para cada voltaje se convirtió a valor de conductancia máxima usando la siguiente ecuación:

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

donde G es la conductancia, I es la corriente, V_m es el potencial de prueba y V_{rev} el potencial de inversión de la corriente. Con los valores obtenidos se construyeron las curvas conductancia-voltaje (G - V), también conocidas como curvas de activación y se ajustaron de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$G = \frac{G_{max}}{1 + \exp\left(\frac{V_m - V_{1/2}}{k}\right)^{-1}}$$

donde G_{max} es conductancia máxima, V_m es el potencial de prueba, $V_{1/2}$ es el potencial al cual se alcanza la mitad de la activación máxima y k es el factor de pendiente. Para medir los cambios en la cinética de inactivación se determinó el porcentaje de corriente total remanente después de un pulso despolarizante de 140 ms (I_{rem140}).

La composición de la solución externa usada durante el registro de las corrientes de las células GH3 fue la siguiente: 10 mM BaCl_2 como acarreador de carga, 125 mM TEA-Cl, 10 mM HEPES y 10 mM glucosa. El pH de la solución se ajustó a 7.3 con TEA-OH y la osmolaridad a ~300 mOsm/L. La composición de la solución interna fue la siguiente: 110 mM CsCl, 10 mM HEPES, 10 mM EGTA, 5 mM MgCl_2 , 4 mM ATP y 0.1 mM GTP. El pH se ajustó a 7.3 con CsOH y la osmolaridad a ~290 mOsm/L.

5.10 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Para determinar la cantidad de PRL secretada en los cultivos de la línea celular GH3 se realizaron ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando el paquete comercial *Rat Prolactin*

ELISA (ALPCO 55-PRLRT-E01) y se siguió el protocolo correspondiente. Para los ensayos de respuesta a EGF, las células GH3 se sembraron en cajas de cultivo de 24 pozos a una densidad de 2×10^4 células por pozo. Un día después de sembradas, las células se expusieron a un tratamiento de 5 nM EGF durante 48 h. Después de aplicar el tratamiento, las células se incubaron con una solución de 5 mM de K^+ (25 mM HEPES, 115 mM NaCl, 24 mM $NaHCO_3$, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2.5 mM $CaCl_2$, 0.1% BSA, pH 7.4) durante 5 min. A continuación, la secreción de prolactina se estimuló mediante la incubación en una solución con alta concentración de 40 mM K^+ (25 mM HEPES, 80 mM NaCl, 24 mM $NaHCO_3$, 40 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2.5 mM $CaCl_2$, 0.1% BSA, pH 7.4) durante 10 min. El medio condicionado se recolectó y se determinó la concentración de prolactina mediante ensayos de ELISA.

Para los ensayos de sobreexpresión, las células GH3 se sembraron en cajas Petri de 35 mm a una confluencia de ~80%. La expresión heteróloga de la subunidad $Cav\alpha_2\delta-1$ se realizó como se mencionó anteriormente. Pasadas 48 h, las células en cultivo se incubaron con una solución de bajo K^+ (5 mM) durante 5 min. A continuación, la secreción de prolactina se estimuló mediante la incubación en una solución con alta concentración de K^+ (40 mM) durante 10 min. El medio condicionado se recolectó y se determinó la concentración de prolactina mediante ensayos de ELISA.

5.11 Análisis de los datos.

Las gráficas que resumen los resultados representan la media \pm el error estándar de los datos obtenidos. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron con la prueba ANOVA ($p < 0.05$) seguida de una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Cuando solamente se

compararon dos condiciones, se usó la prueba t de *Student* ($p < 0.05$). Las gráficas se realizaron con el programa Sigma Plot 12.3.

6. Resultados

6.1 Efecto del EGF sobre la expresión de $Ca_v\alpha_2\delta-1$.

Estudios preliminares en el laboratorio han mostrado que el tratamiento con 5 nM de EGF produce un aumento en la actividad transcripcional del promotor del gen *CACNA2D1* que codifica para la subunidad auxiliar $Ca_v\alpha_2\delta-1$. Tomando estos datos en consideración, a continuación, en el presente trabajo se verificó si dicho aumento en la transcripción tiene un efecto sobre la cantidad total de proteína expresada mediante la técnica de *Western blot* semicuantitativo. Los resultados de la figura 11 muestran que el tratamiento con EGF en cultivos de células GH3 induce un aumento significativo en la expresión total de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ a nivel de proteína después de 24 h de incubación con el factor de crecimiento.

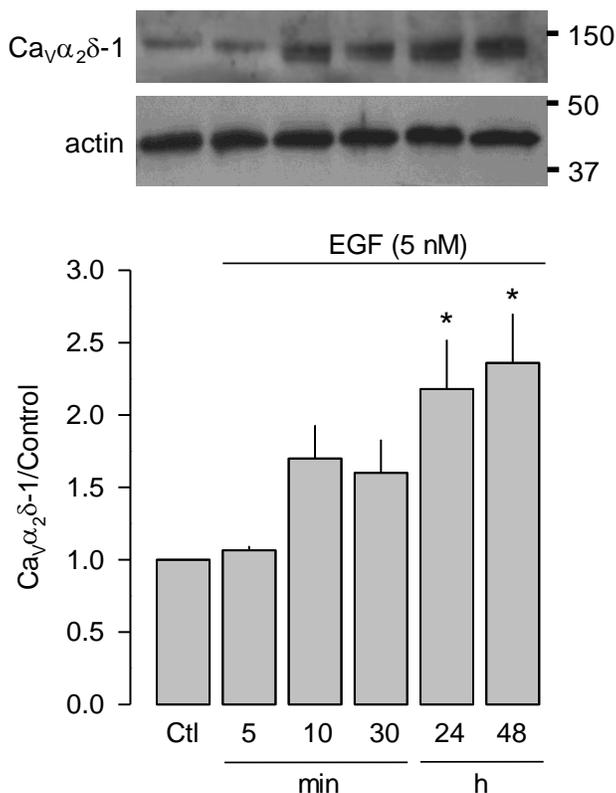


Figura 11. El EGF aumenta la expresión de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ en las células GH3. *Western blot* de la cantidad total de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ expresada en células GH3 tratadas con 5 nM de EGF por 5, 15 y 30

min, 24 y 48 h usando actina como control de carga (panel superior). La gráfica de barras muestra la cuantificación de la señal de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ normalizada con respecto al control (0 min; $n=4$ experimentos independientes, $*p=0.003$ ANOVA de una vía).

Para identificar si este aumento en la expresión total de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ tenía un efecto sobre la cantidad de proteína en la membrana plasmática, se realizaron ensayos de biotilación de proteínas de la superficie celular. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con EGF (5 nM) por 48 h genera un aumento significativo (~60%) en la cantidad de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ tanto total como en la superficie celular (Fig. 12). Debido a que, como se mencionó anteriormente, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ facilita el envío de los canales a la membrana plasmática, estos resultados ayudan a explicar el aumento en la densidad de la corriente de Ca^{2+} previamente reportado en células GH3 en respuesta al EGF (Felix *et al.*, 1995).

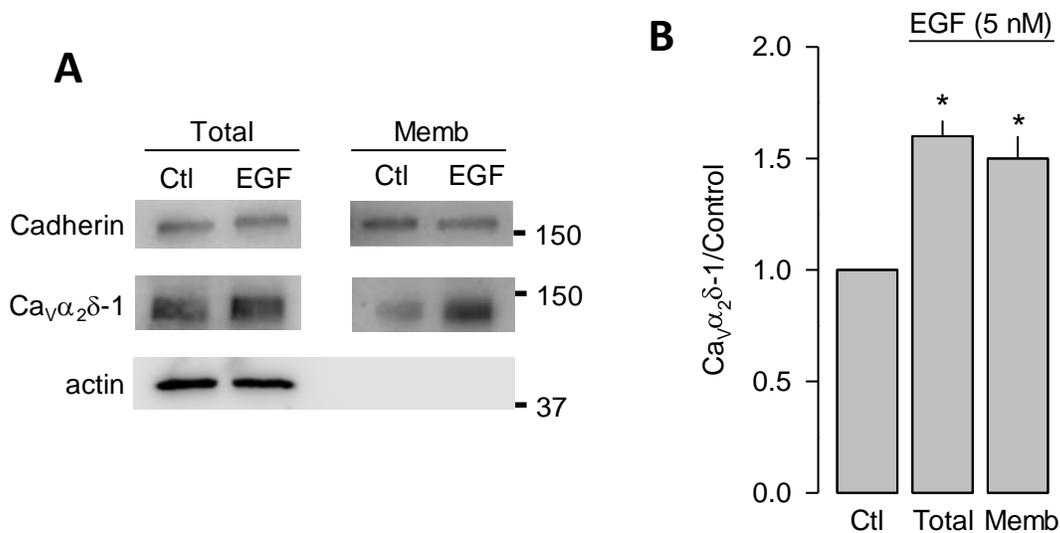


Figura 12. El EGF aumenta la expresión de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ en la superficie celular de las células GH3. (A) *Western blot* representativo de la cantidad de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ total o en membrana plasmática expresado en las células GH3 en condiciones control o tratadas con 5 nM de EGF por 48 h. Se usó actina como control de carga de la proteína total y cadherina como control de carga de las proteínas de membrana. (B) La gráfica de barras muestra la expresión de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ total y en la superficie celular con el tratamiento con EGF normalizada con respecto a su control (total $n=8$

experimentos independientes * $p < 0.0001$ *t*-test; membranal $n = 4$ experimentos independientes; *t*-test * $p = 0.011$).

6.2 Efecto del EGF sobre la expresión de canales Ca_v HVA.

Tomando en consideración que los canales HVA se asocian con la subunidad auxiliar $Ca_v\alpha_2\delta-1$ y que las células GH3 expresan a los canales $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ y $Ca_v2.1$, a continuación se investigó si el tratamiento con EGF ocasionaba un cambio en la expresión de estos canales. Con este fin, se midió la cantidad total de proteína expresada mediante la técnica de *Western blot* semicuantitativo. Los resultados muestran que el tratamiento con EGF en cultivos de células GH3 no genera cambios significativos en la expresión total de los canales HVA ($Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ y $Ca_v2.1$) después de 48 h de incubación con el factor de crecimiento (Fig. 13). Sin embargo, se observa una ligera tendencia al incremento en la cantidad de canales tipo L que expresan estas células ($Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$).

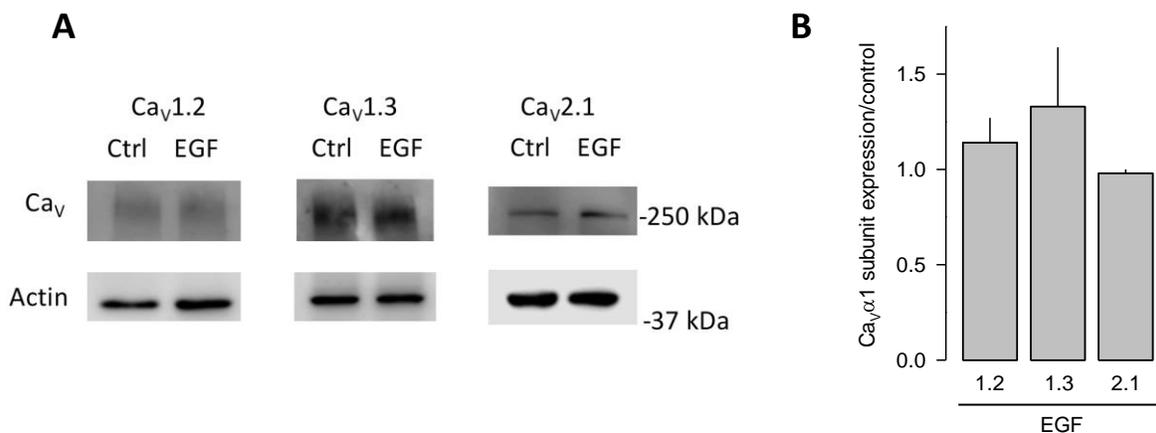


Figura 13. El EGF no cambia significativamente la expresión de los canales Ca_v HVA en las células GH3. (A) *Western blot* de la cantidad total de $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ y $Ca_v2.1$ expresada en células GH3 en condiciones control o tratadas con 5 nM de EGF por 48 h; la actina se usó como control de carga. (B) Cuantificación de la señal relativa de los distintos tipos de canales Ca_v con respecto al control después del tratamiento con EGF ($n = 3$ experimentos independientes).

6.3 Determinación de la vía de señalización implicada en el aumento en la expresión de $Ca_v\alpha_2\delta-1$.

En experimentos previos de nuestro laboratorio, se observó que el tratamiento con EGF en la línea celular GH3 generaba una activación de la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK. Esto se relacionó con la presencia de sitios de unión para los factores de transcripción ELK-1 y CREB, los cuales pueden ser activados por medio de esta vía. Por lo tanto, se decidió determinar si dichos factores de transcripción se activan en respuesta al tratamiento con EGF en esta línea celular. Para ello, se realizaron tratamientos con EGF (5 nM) a distintos tiempos de incubación en cultivos de células GH3 y se midió la fosforilación de ELK-1 y CREB por medio de la técnica de *Western Blot*. La figura 14 muestra los resultados obtenidos de este análisis donde se observa un aumento significativo en los niveles de fosforilación de ELK-1 y CREB en respuesta al EGF a los distintos tiempos de incubación.

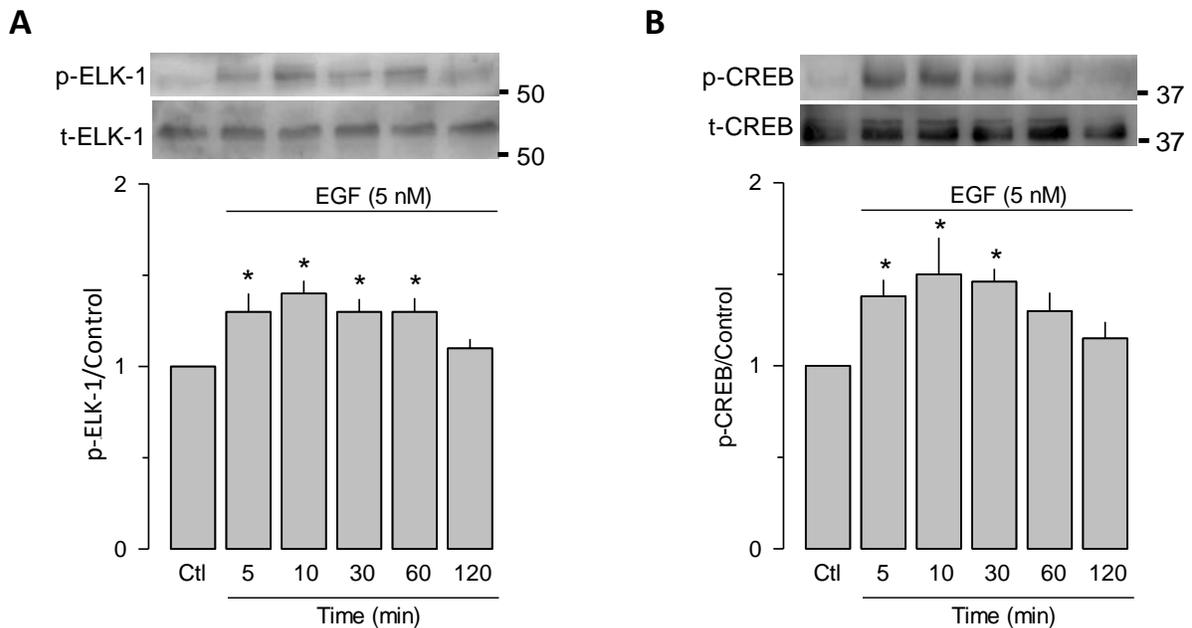


Figura 14. El EGF induce la fosforilación de ELK-1 y CREB en las células GH3. (A) Nivel de fosforilación de ELK-1 en células GH3 tratadas con 5 nM de EGF a los 5, 10, 30, 60 y 120 minutos detectado por ensayos de *Western blot* usando un anticuerpo anti-fosfo-ELK-1 (p-ELK-1) y otro anticuerpo anti-ELK-1 total (t-ELK-1) (panel superior). La gráfica de barras muestra la

cuantificación mediante densitometría de la señal de fosforilación de ELK-1 normalizada con respecto al control (sin EGF) ($n=4$ experimentos independientes, $*p=0.0014$ ANOVA de una vía). (B) Nivel de fosforilación de CREB en células GH3 tratadas con 5 nM de EGF durante 5, 10, 30, 60 y 120 min detectado por ensayos de *Western blot* usando un anticuerpo anti-fosfo-CREB (p-CREB) y otro anticuerpo anti-CREB total (t-CREB) (panel superior). La gráfica de barras muestra la cuantificación por densitometría de la señal de fosforilación de CREB normalizada con respecto al control (sin EGF) ($n=4$ experimentos independientes, $*p=0.023$ ANOVA de una vía).

Posteriormente, para verificar si efectivamente la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK es la que está participando en el mecanismo molecular mediante el cual el EGF regula el aumento en la expresión de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$, a continuación, se realizaron experimentos empleando un inhibidor de la cinasa ERK, llamado CAS 1049738-54-6 (CAS (5Z)-3-(2-aminoethyl)-5-[(4-ethoxyphenyl)methylidene]-1,3-thiazolidine-2,4-dione:hydrochloride). Así, se procedió a evaluar el efecto de la inhibición de ERK sobre la fosforilación de su blanco clásico ELK-1, así como el efecto sobre la cantidad de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ expresada por medio de un *Western blot*. La figura 15 muestra los resultados obtenidos en donde se observa que el pre-tratamiento con 15 μM de CAS impide de manera efectiva la fosforilación de ELK-1 en respuesta al estímulo con 5 nM de EGF. Esta inhibición previene también el aumento en los niveles totales de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ expresado en las células GH3 (Fig. 15B), lo que sugiere que la vía señalización de ERK/ELK-1 participa directamente en este mecanismo molecular.

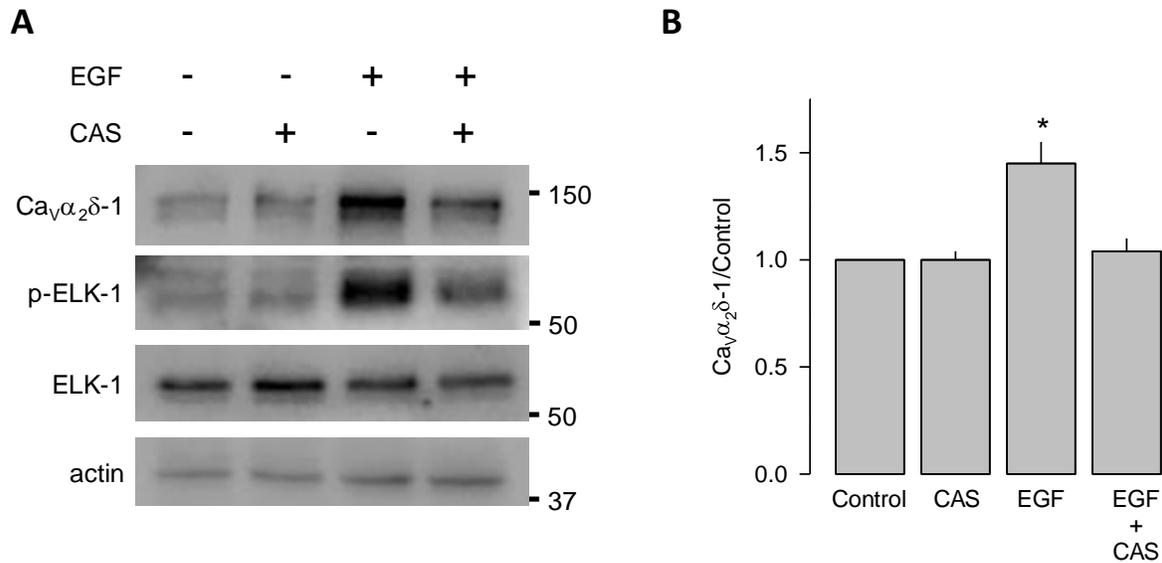


Figura 15. La inhibición de ERK previene el aumento de Ca_vα₂δ-1 en respuesta al EGF en las células GH3. (A) *Western blot* representativo del nivel de fosforilación de ELK-1 y la expresión total de Ca_vα₂δ-1 en células GH3 en condiciones control (sin tratamiento), tratadas con 15 μM del inhibidor de ERK (CAS 1049738-54-6), 5 nM de EGF o pretratadas con 15 μM del inhibidor de ERK y 5 nM de EGF. (B) La gráfica muestra la cuantificación por densitometría de Ca_vα₂δ-1 total normalizada con respecto al control ($n=4$ experimentos independientes, * $p=0.009$ ANOVA de una vía).

6.4 Efecto del silenciamiento de ELK-1 y CREB.

A continuación, se decidió investigar si el silenciamiento de ELK-1 o CREB tenía algún efecto en la regulación de la actividad transcripcional del gen que codifica para Ca_vα₂δ-1 en respuesta al EGF. Con este fin, las células GH3 fueron co-transfectadas con un plásmido reportero bajo el control del promotor del gen *CACNA2D1* clonado previamente (Martínez-Hernández *et al.*, 2013) y con distintos siRNAs específicos contra ELK-1 o contra CREB (se usaron dos diferentes; CREB 1a y CREB 1b), usando siRNAs inespecíficos (*scramble*) como control. Posteriormente se realizaron ensayos de luciferasa para medir la actividad transcripcional de dicho promotor. De manera interesante,

los resultados muestran que el silenciamiento tanto de ELK-1 como de CREB previene el aumento en la actividad transcripcional del promotor de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta\text{-1}$ en respuesta a 5 nM de EGF (Fig. 16).

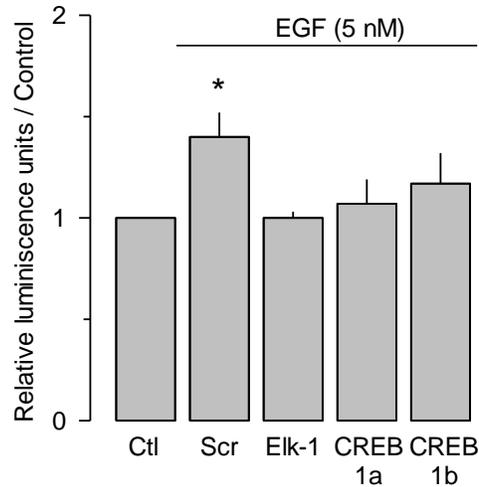


Figura 16. CREB y ELK-1 son necesarios para inducir la actividad transcripcional del promotor de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta\text{-1}$ en respuesta al EGF en células GH3. Actividad transcripcional del promotor para $\text{Ca}_v\alpha_2\delta\text{-1}$ en células GH3 transfectadas con los ARN de interferencia (*siRNA*) específicos para ELK-1 y CREB, junto con el plásmido que contiene al promotor de *CACNA2D1* y tratadas con 5 nM de EGF por 5 min. La gráfica muestra la actividad de luciferasa expresada en unidades relativas de luz normalizadas con respecto al control ($n=4$ experimentos independientes, $*p<0.001$ Kruskal-Wallis ANOVA de una vía).

Con la finalidad de verificar la eficiencia del silenciamiento de ELK-1 y CREB en estos ensayos de luciferasa se midieron los niveles totales de proteína por medio de un *Western Blot* semicuantitativo usando a actina como control de carga. Los resultados mostraron una disminución de ~50% en la cantidad de proteína expresada (Fig. 17).

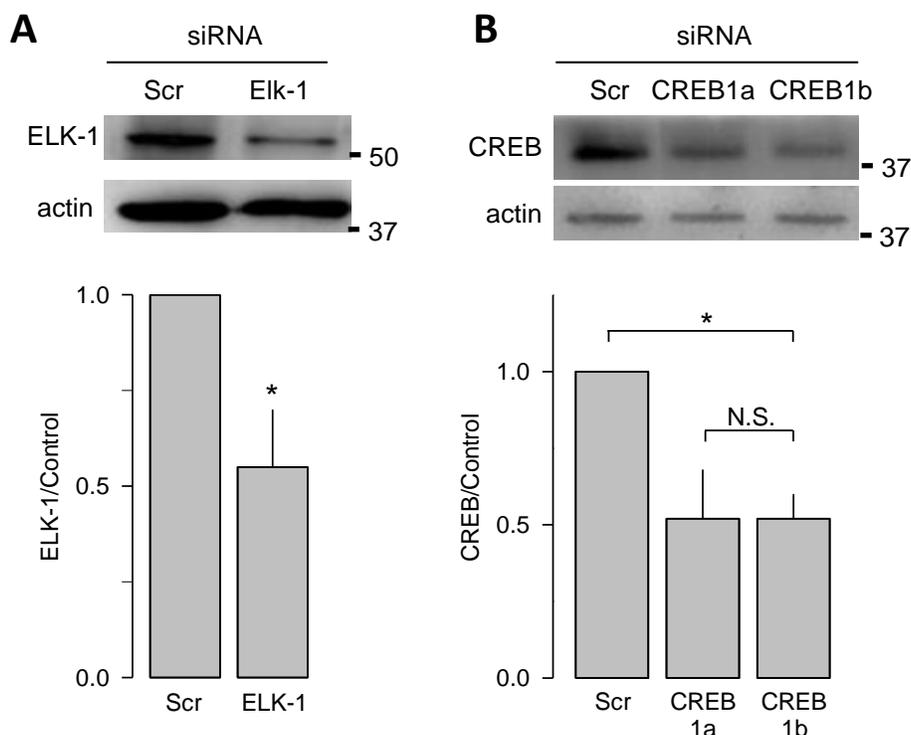


Figura 17. Silenciamiento de los factores de transcripción ELK-1 y CREB en células GH3. (A) Nivel de ELK-1 expresado en células GH3 transfectadas con el siRNA control (*scramble*) o con el siRNA específico para ELK-1 detectado por ensayos de *Western blot* usando un anticuerpo anti-ELK-1 total y otro anti-actina como control de carga (panel superior). La gráfica de barras muestra la cuantificación por densitometría de la señal de ELK-1 normalizada con respecto al control ($n=5$ experimentos independientes, $*p<0.001$ *t-test*). (B) Nivel de CREB expresado en células GH3 transfectadas con el siRNA control (*scramble*) o con los siRNAs específicos para CREB detectado por ensayos de *Western blot* usando un anticuerpo anti-CREB total y otro anti-actina como control de carga (panel superior). La gráfica de barras muestra la cuantificación por densitometría de la señal de CREB normalizada con respecto al control ($n=3$ experimentos independientes, CREB 1a $*p=0.0476$, CREB 1b $*p=0.0087$; *t-test*).

6.5 Mutagénesis de los sitios de unión a ELK-1 y CREB.

Posteriormente, para corroborar la posible participación de los sitios de unión a ELK-1 y CREB en la región promotora de *CACNA2D1* e identificar si estos factores de transcripción son capaces de regular la expresión de este gen en respuesta a EGF, se realizaron ensayos de mutagénesis sitio dirigida. Las construcciones mutantes se hicieron a partir de la región promotora completa (p1.5;

Martínez-Hernández *et al.*, 2013), cambiando tres pares de bases de la secuencia de ADN en la que se predijo se unirían ELK-1 y CREB, respectivamente. Una vez obtenidas las construcciones que contenían a las mutaciones de interés, se verificaron mediante una secuenciación automática. La figura 18 muestra el resultado de la secuenciación mediante un alineamiento de la región promotora de *CACNA2D1* silvestre (p1.5 *CACNA2D1* WT) con las mutaciones para ELK-1 (p1.5 *CACNA2D1* MUT ELK-1) y para CREB (p1.5 *CACNA2D1* MUT CREB), respectivamente. Para mutar el sitio de unión a ELK-1 se cambió la secuencia CTTCC a CTAAA, modificando 3 pares de bases suficientes para evitar la interacción de este factor de transcripción con el ADN. De la misma manera, para mutar el sitio de unión a CREB se cambió la secuencia GCACGTCA a GCCTTTCA, modificando también 3 pares de bases (Fig. 18).

		420	420	430	440	450	460	470
p1.5 <i>CACNA2D1</i> (MUT ELK-1)	286	CAAGGAGAAAAGCCCGCCACTGCT	AAA	CTGAGTCTGGAGATAAAAACCAGTCCGGC				
p1.5 <i>CACNA2D1</i> (WT)	420	CAAGGAGAAAAGCCCGCCACTGCT	CTCC	CTGAGTCTGGAGATAAAAACCAGTCCGGC				
		245	250	260	270	280	290	
p1.5 <i>CACNA2D1</i> (MUT CREB)	109	AGTCATCACAAATTGTATTCTCTGC	CTT	TCATGTCAAAAGTATTCTCATACACT				
p1.5 <i>CACNA2D1</i> (WT)	245	AGTCATCACAAATTGTATTCTCTGC	ACG	TCATGTCAAAAGTATTCTCATACACT				

Figura 18. Análisis de las secuencias de las mutaciones en la región promotora del gen *CACNA2D1*. Alineamiento de las mutaciones del sitio de unión a ELK-1 (panel superior) y CREB (panel inferior). Los recuadros rojos muestran los cambios realizados.

Una vez obtenidas estas mutantes, se midió su actividad transcripcional mediante ensayos de luciferasa en condiciones control y en respuesta al EGF (5 nM). La mutación que impide la unión de CREB mostró una capacidad de respuesta al factor de crecimiento similar a la del promotor silvestre, lo que sugiere que este factor de transcripción podría no ser necesario para la inducción de la actividad del promotor del gen *CACNA2D1* por el EGF. Por el contrario, al prevenir la unión del factor de transcripción ELK-1 con la mutación, se evitó por completo la

activación en respuesta a los tratamientos con EGF del promotor (Fig. 19). Estos resultados sugieren que ELK-1 es el factor de transcripción que podría estar participando en el aumento en la actividad transcripcional de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ en respuesta a EGF en las células GH3.

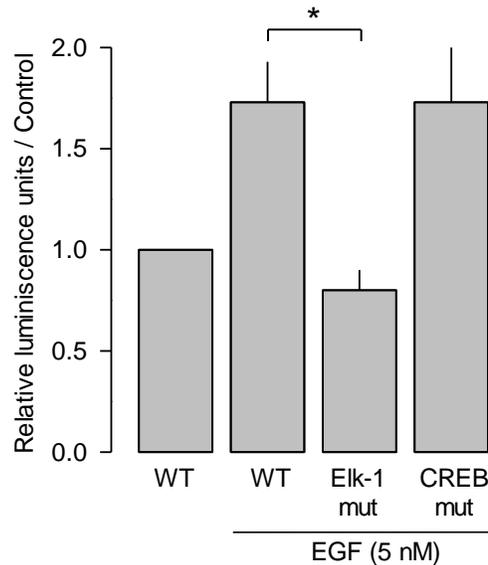


Figura 19. ELK-1 induce la transcripción de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ en respuesta al EGF en células GH3. Actividad transcripcional del promotor para $Ca_v\alpha_2\delta-1$ en células GH3 transfectadas con el plásmido que contiene al promotor de *CACNA2D1* silvestre (WT) o mutado en el sitio de unión a ELK-1 y a CREB, respectivamente, y tratadas con 5 nM de EGF por 5 min. La gráfica indica la actividad de luciferasa expresada en unidades relativas de luz normalizado con respecto al control ($n=4$ experimentos independientes, $*p=0.011$ ANOVA de una vía).

6.6 Asociación *in vivo* de ELK-1 con la región promotora de *CACNA2D1*.

Tomando en consideración los resultados anteriores, a continuación, se estudió si el factor de transcripción ELK-1 se une *in vivo* al promotor de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ en células GH3, mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) acoplados a detección por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con tal fin se usaron células GH3 transfectadas con el vector pCGN-ELK-1 que codifica para ELK-1 con una bandera de hemaglutinina (HA) y tratadas con 5 nM de EGF.

Para la inmunoprecipitación se utilizaron anticuerpos específicos contra ELK-1 y como control negativo se usaron anticuerpos contra una proteína no relacionada Pet (Nava-Acosta and Navarro-Garcia, 2013). El ADN inmunoprecipitado se analizó por medio de PCR, amplificando la región del promotor del gen *CACNA2D1* en donde se encuentra el sitio de unión a ELK-1 (104 pb). La región promotora del gen que codifica para c-Fos (96 pb) y la región codificante del gen GAPDH (177 pb) se usaron como controles positivos y negativos respectivamente (Fig. 20A). Los resultados muestran que el factor de transcripción ELK-1 se une *in vivo* con la región promotora del gen *CACNA2D1* en células GH3 en respuesta a EGF (Fig. 20B). Estos resultados reafirman que ELK-1 es un factor de transcripción que se une al promotor de Cav $\alpha_2\delta$ -1 en respuesta a EGF y de esta manera regula la expresión de esta proteína.

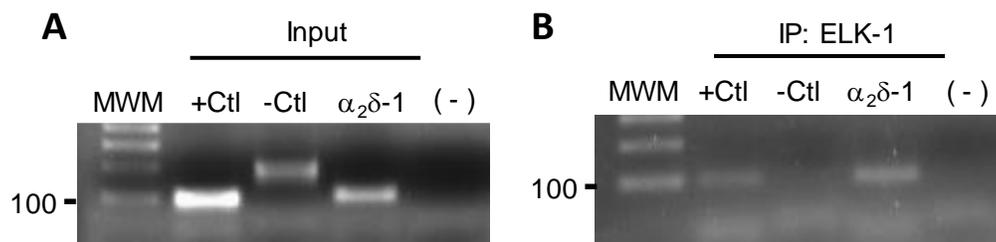


Figura 20. ELK-1 se une al promotor de *CACNA2D1* *in vivo* en respuesta al EGF en las células GH3. Amplificación de PCR de los extractos nucleares de células GH3 tratadas con 5 nM de EGF por 10 min. Amplificación de la cromatina total (A) y de la cromatina inmunoprecipitada usando el anticuerpo anti-ELK-1 (B). MWM, marcador molecular; +Ctl, control positivo; -Ctl, control negativo; $\alpha_2\delta$ -1, región promotora de *CACNA2D1*; (-), sin ADN.

6.7 Efecto de la sobreexpresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1 en células GH3.

Como se mencionó en la introducción, reportes anteriores indican que la subunidad auxiliar Cav $\alpha_2\delta$ -1 modula las propiedades fundamentales y el tráfico de los canales Cav HVA hacia la membrana plasmática, lo que tiene como resultado un aumento en la amplitud de las corrientes de Ca²⁺ (Felix, 1999; Cantí *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2009; Felix *et al.*, 2013; Dolphin, 2016). Por

lo tanto, es razonable proponer que un aumento en la expresión de la subunidad auxiliar puede generar una regulación positiva sobre los canales Cav HVA en la superficie celular de las células GH3. Para probar esta hipótesis, se realizaron registros electrofisiológicos de las corrientes de Ca^{2+} por medio de la técnica de *patch clamp* en su modalidad de célula completa y se compararon sus amplitudes en células GH3 en condiciones control y al hacer una sobreexpresión de la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta-1$. Las corrientes se evocaron aplicando pulsos de voltaje (en incrementos de 5 mV) desde un potencial de sostenimiento de -80 mV. La figura 21A muestra los trazos representativos de las corrientes de Ca^{2+} en la condición control y en las células transfectadas transitoriamente con una construcción de ADNc que codifica para la subunidad auxiliar en donde se observó un marcado aumento en la amplitud de las corrientes. De igual manera, la curvas corriente-voltaje (*I-V*) muestran que la densidad de corriente de las células GH3 que sobreexpresan a la proteína recombinante es mayor que la densidad de corriente en las células control (que expresan solamente GFP) en la mayoría de los voltajes probados (Fig. 21B). Lo anterior se representa también en la gráfica de la figura 21C en donde se observa un aumento significativo (~56%) de la densidad de la corriente total a través de canales Ca_v activados a -15 mV en las células GH3 que sobreexpresan la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta-1$.

Es importante señalar que las células GH3 expresan tanto canales HVA como LVA, y de acuerdo a lo reportado sobre la estructura molecular de los canales Ca_v , la expresión de la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta-1$ sólo modula el componente HVA de la corriente total. Para probar esto en nuestros registros, realizamos un protocolo para separar la corriente total en sus dos componentes. A partir de un voltaje de mantenimiento de -80 mV se aplicaron dos pulsos despolarizantes de 100 ms a -10 mV separados por un interpulso de 10 ms. Durante el primer

pulso despolarizante se activan los componentes HVA como LVA, es decir, la corriente total. Sin embargo, los canales LVA, de acuerdo a sus características biofísicas, se inactivan completamente al final de este primer pulso. Por lo tanto, durante el segundo pulso despolarizante a -10 mV solamente están disponibles los canales HVA para ser activados y se obtiene sólo el componente HVA de las corrientes. Al restar las corrientes obtenidas en respuesta del segundo pulso de la corriente total evocada en el primer pulso despolarizante, se puede estimar la magnitud del componente LVA. Los resultados de este análisis mostraron que la sobreexpresión de la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta-1$ aumentó significativamente la corriente a través de los canales HVA (~56%) sin afectar las corrientes a través de canales LVA (Fig. 21D). Estos resultados corroboran el efecto positivo de la subunidad auxiliar $Ca_v\alpha_2\delta-1$ sobre canales HVA.

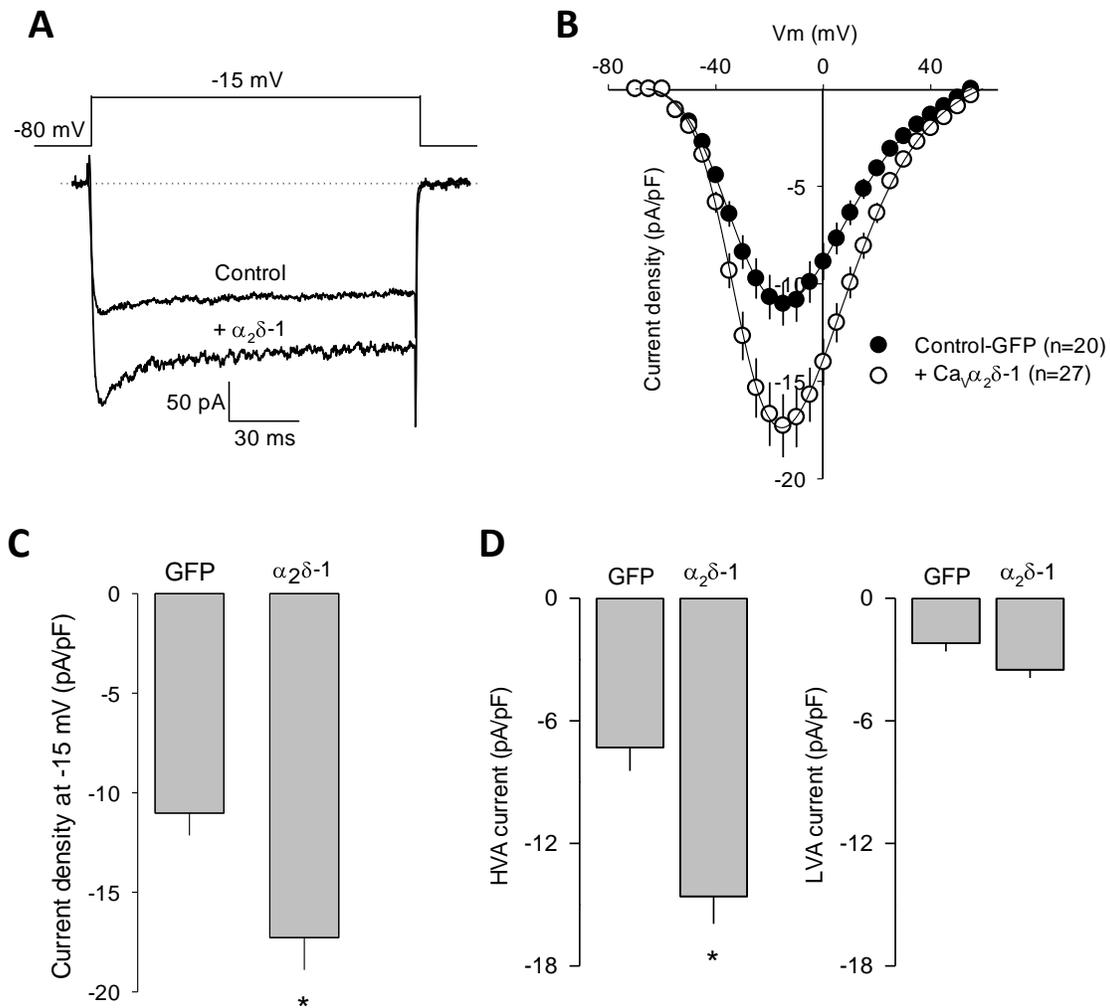


Figura 21. La sobreexpresión de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ aumenta las corrientes de Ca^{2+} HVA de las células GH3. (A) Trazos representativos de las corrientes de Ca^{2+} de células GH3 en condiciones control (transfectadas con el plásmido de ADNc que codifica para la proteína GFP) o transfectadas también con el plásmido de ADNc que codifica para la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ de los canales Ca_v . (B) Curvas $I-V$ para las corrientes de Ca^{2+} registradas en células GH3 transfectadas como en (A). (C) Gráfica de barras que compara la densidad de corriente total promedio (pA/pF) a -15 mV en la condición control (GFP) o con la sobreexpresión de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ (* $p < 0.001$, t -test). (D) Gráfica de barras que compara la densidad de corriente promedio (pA/pF) a través de los canales HVA y LVA en la condición control (GFP) o con la sobreexpresión de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ (* $p < 0.003$, t -test). Los datos se presentan como la media \pm error estándar y el número de células registradas se muestra entre paréntesis.

El análisis de las propiedades fundamentales de las corrientes se realizó mediante la construcción de curvas conductancia-voltaje (G - V) en donde se observó que la transfección de la proteína recombinante genera un aumento significativo en la conductancia máxima ($\sim 53\%$) (Fig. 22A). La dependencia al voltaje de la activación se estimó generando curvas de conductancia normalizada, mientras que la cinética de inactivación se determinó como el porcentaje de la corriente al final del pulso activante, es decir la corriente remanente al final de un pulso despolarizante de 140 ms a -15 mV (I_{rem}). Al realizar este análisis de las corrientes no se observaron cambios en la dependencia al voltaje de la activación (Fig. 22B) ni en la cinética de inactivación (Fig. 22C), lo cual sugiere que la sobreexpresión de la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta-1$ en células GH3 genera un aumento en el número de canales funcionales HVA en la membrana plasmática, sin afectar de manera significativa su funcionamiento.

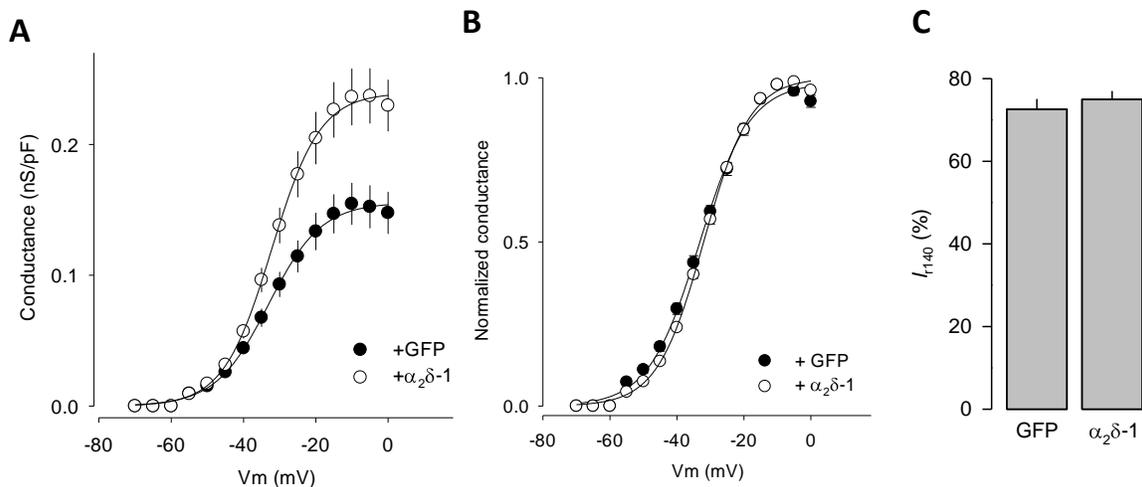


Figura 22. La sobreexpresión de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ no cambia las propiedades fundamentales de las corrientes de Ca^{2+} de las células GH3. (A) Comparación de la conductancia máxima en función del voltaje en células control que expresan a GFP o en células que también expresan a $Ca_v\alpha_2\delta-1$. (B) Comparación de la dependencia al voltaje de la activación de las corrientes de Ca^{2+} en células que expresan solo GFP o $Ca_v\alpha_2\delta-1$. (C) Porcentaje de corriente remanente al final del pulso de 140 ms (I_{r140}) en células que expresan GFP o $Ca_v\alpha_2\delta-1$. Los datos se presentan como la media \pm error estándar.

6.8 Efecto de los factores de transcripción sobre la expresión funcional de la subunidad Cav $\alpha_2\delta$ -1.

Dado que los resultados sugerían que ELK-1 regula la expresión de la subunidad Cav $\alpha_2\delta$ -1, a continuación, se decidió determinar si la disminución del factor de transcripción también podría regular la expresión funcional de los canales Cav. Para ello se realizaron registros electrofisiológicos de las corrientes de Ca²⁺ por medio de la técnica de *patch clamp* en la modalidad de célula completa en células GH3 transfectadas con ARNs pequeños de interferencia (siRNAs). Como condición control se usaron cultivos de células GH3 transfectadas con siRNAs inespecíficos (siRNA *scramble*) y para disminuir los niveles de ELK-1 se usaron cultivos de células GH3 transfectadas con un siRNA específico contra el factor de transcripción. La figura 23A muestra los trazos representativos de las corrientes de Ca²⁺ de células control (siRNA *scramble*) en comparación con las corrientes de las células con el silenciamiento de ELK-1 (siRNA ELK-1) en donde se observó una disminución significativa en la amplitud de las corrientes. Las curvas densidad de corriente (*I-V*) mostraron que el silenciamiento de ELK-1 tienen como resultado una disminución en la corriente a diferentes voltajes probados (Fig. 23B). En la figura 23C se muestra la densidad de corriente máxima en donde se observó de manera más clara la disminución en la corriente en las células transfectadas con el siRNA específico contra ELK-1. Los dos componentes de las corrientes totales se separaron como se describió anteriormente, y los resultados mostraron que el silenciamiento de ELK-1 disminuyó significativamente (~30%) la corriente a través de los canales HVA, sin afectar notablemente el componente LVA de la corriente (Fig. 23D).

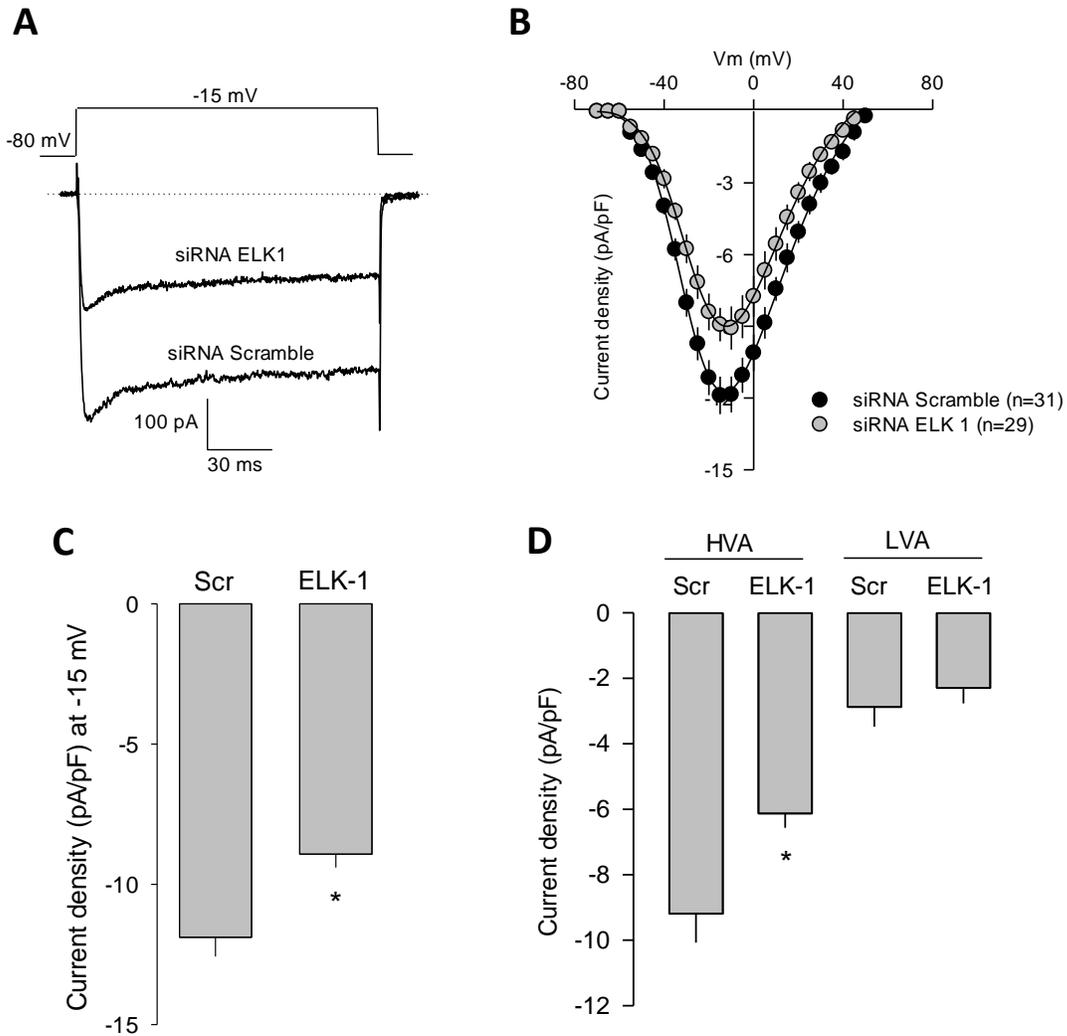


Figura 23. El silenciamiento de ELK-1 disminuye las corrientes de Ca^{2+} HVA de las células GH3. (A) Trazos representativos de las corrientes de Ca^{2+} en células GH3 transfectadas con el siRNA control (*scramble*) o con el siRNA específico para ELK-1. (B) Curvas *I-V* para las corrientes de Ca^{2+} registradas en células GH3 transfectadas como en (A). (C) Gráfica de barras que compara la densidad de corriente total promedio (pA/pF) a -15 mV en la condición control (Scr) o con el silenciamiento de ELK-1 (* $p=0.001$, *t-test*). (D) Gráfica de barras que compara la densidad de corriente promedio (pA/pF) a través de los canales HVA y LVA en células GH3 transfectadas con siRNA control (Scr) o siRNA ELK-1. Los datos se presentan como la media \pm error estándar (* $p=0.019$, *t-test*) y el número de células registradas se muestra entre paréntesis.

Asimismo, el silenciamiento de ELK-1 resultó en una disminución de la conductancia máxima (~23%), pero sin cambios aparentes en la dependencia al voltaje de la activación y en la cinética de inactivación (Fig. 24). Estos resultados sugieren que al silenciar el factor de transcripción ELK-1 hay una disminución en el número de canales HVA funcionales sin tener un efecto aparente sobre las propiedades fundamentales de las corrientes.

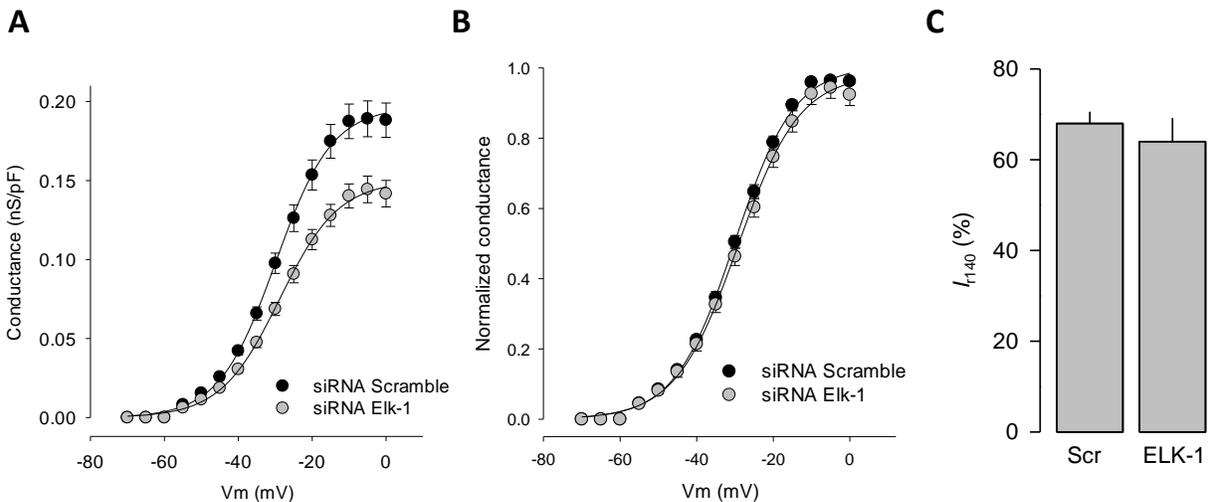


Figura 24. El silenciamiento de ELK-1 no cambia las propiedades fundamentales de las corrientes de Ca²⁺ de las células GH3. (A) Comparación de la conductancia máxima en función del voltaje en células que expresan siRNA *scramble* o siRNA ELK-1. Comparación de la dependencia al voltaje de la activación de las corrientes de Ca²⁺ (B) y porcentaje de corriente remanente al final del pulso de 140 ms (I_{r140}) (C) en células control (Scr) o con silenciamiento de ELK-1. Los datos se presentan como la media \pm error estándar.

Posteriormente, se comprobó la eficacia del silenciamiento de ELK-1 en las células GH3 por medio de la técnica *Western Blot* usando un anticuerpo anti-ELK-1 (Fig. 25A) y un anticuerpo anti-actina como control de carga. Los resultados muestran que se detectó una proteína de ~62 kDa en las células GH3 correspondiente a el peso molecular de ELK-1. En ensayos paralelos, también se identificó el nivel de expresión de Ca_v $\alpha_2\delta$ -1 con un anticuerpo específico contra esta proteína. De manera interesante, el análisis de datos muestra una disminución significativa (~30%) en el

nivel de expresión de ELK-1, lo cual se vio acompañado de una disminución similar en la expresión de la subunidad auxiliar de los canales Ca_v (Fig. 25B).

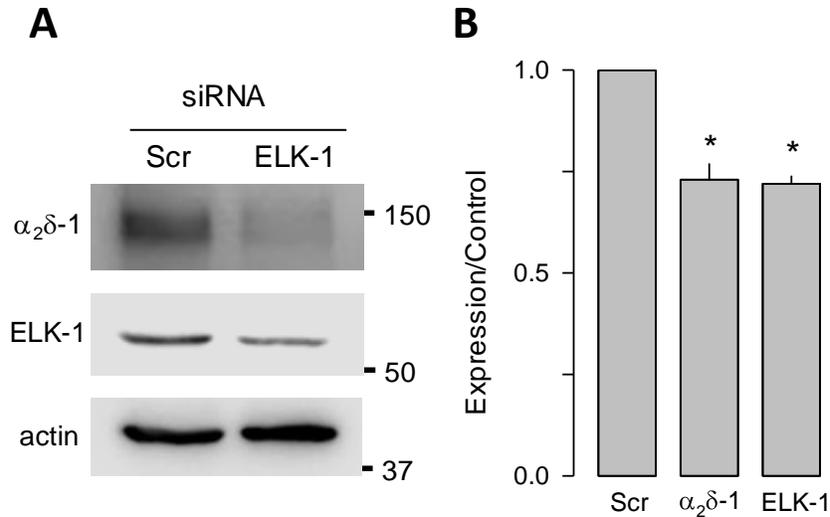


Figura 25. El silenciamiento de ELK-1 disminuye la cantidad de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ y ELK-1 expresado en las células GH3. (A) Nivel de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ y ELK-1 expresado en células GH3 transfectadas con el siRNA control (*scramble: Scr*) o con el siRNA específico para ELK-1 detectado por ensayos de *Western blot* usando anticuerpos específicos anti- $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$, anti-ELK-1 y anti-actina como control de carga. (B) Comparación de la cuantificación por densitometría de la señal de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ y ELK-1 obtenida en (A) normalizada con respecto a su control ($n=4$ experimentos independientes; $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ * $p<0.001$ *t-test*; ELK-1 * $p<0.001$ *t-test*).

De manera complementaria, se realizaron registros electrofisiológicos de las corrientes de Ca^{2+} en cultivos de células GH3 transfectadas con siRNAs específicos contra CREB para disminuir su expresión y ver el efecto de este factor de transcripción sobre los canales Ca_v . Para estos experimentos se usaron siRNAs control (*scramble*) y dos siRNAs dirigidos contra CREB (1a y 1b). Los resultados de la figura 26 muestran que el silenciamiento de CREB no tiene un efecto significativo sobre las corrientes de Ca^{2+} de las células GH3.

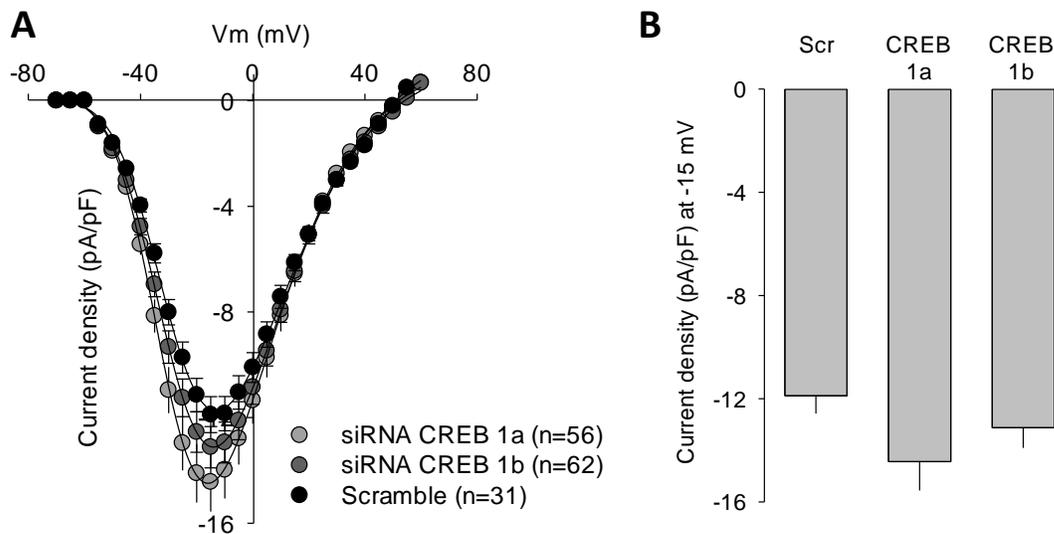


Figura 26. El silenciamiento de CREB no afecta las corrientes de Ca²⁺ de las células GH3. (A) Curvas *I-V* de las corrientes de Ca²⁺ registradas en células GH3 transfectadas con el siRNA control (*scramble*) o transfectadas con los siRNA específicos para CREB (CREB 1a y CREB 1b). (B) Gráfica de barras que compara la densidad de corriente total promedio (pA/pF) a -15 mV en la condición control (Scr) o con el silenciamiento de CREB (CREB 1a y CREB 1b). Los datos se presentan como la media \pm error estándar y el número de células registradas se muestra entre paréntesis.

En el mismo sentido, el silenciamiento de CREB no tuvo efectos significativos sobre la conductancia máxima de los canales, en la dependencia al voltaje de la activación y en la cinética de inactivación (Fig. 27).

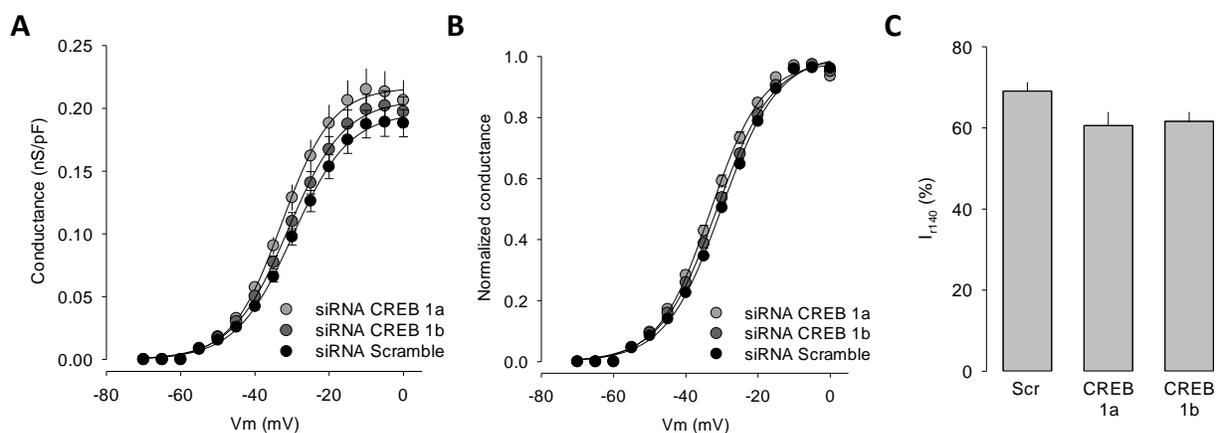


Figura 27. El silenciamiento de CREB no cambia las propiedades fundamentales de las corrientes de Ca^{2+} en las células GH3. (A) Comparación de la conductancia máxima en función del voltaje en células que expresan siRNA *scramble* o siRNA CREB (CREB 1a y CREB 1b). Comparación de la dependencia al voltaje de la activación de las corrientes de Ca^{2+} (B) y porcentaje de corriente remanente al final del pulso de 140 ms (I_{r140}) (C) en células control (Scr) o con silenciamiento de CREB (CREB 1a y CREB 1b). Los datos se presentan como la media \pm error estándar.

Asimismo, se verificó la eficacia del silenciamiento de CREB por medio de *Western Blot* (Fig. 28) usando a actina como control de carga. En el *blot* representativo mostrado en la figura 28A se puede observar la detección de una proteína de ~ 42 kDa que corresponde a CREB, y la disminución de esta proteína en las células transfectadas con el siRNA CREB 1a y CREB 1b. También se identificó a la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ en donde, de manera interesante, no se observaron cambios aparentes en su expresión. En las gráficas de la figura 28B se muestra el análisis de los datos en donde se observa una disminución ($\sim 50\%$) en el nivel de expresión de CREB, sin cambios significativos en los niveles de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$.

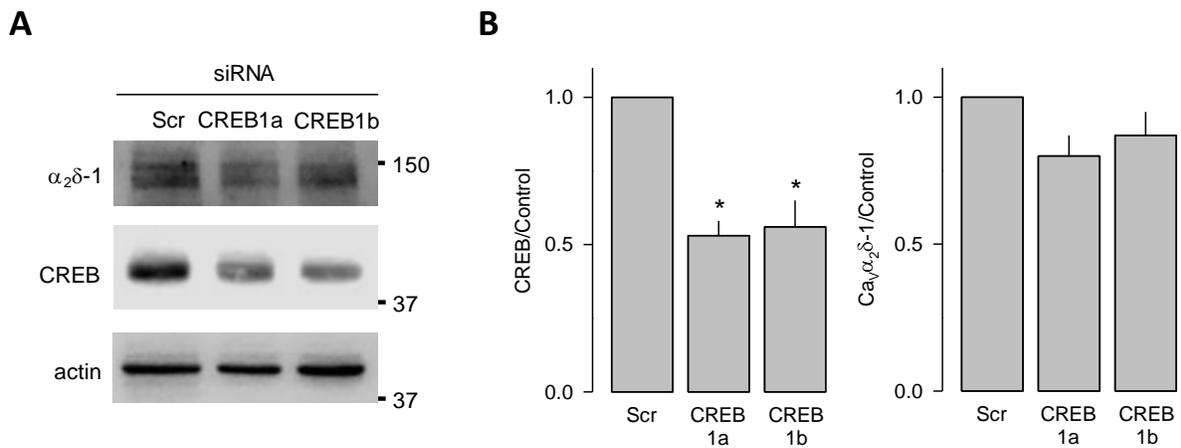


Figura 28. El silenciamiento de CREB disminuye la cantidad de CREB sin cambiar la expresión de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ en las células GH3. (A) Nivel de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ y CREB expresado en células GH3 transfectadas con el siRNA control (*scramble*; Scr) o con los siRNAs específicos para CREB (CREB 1a y CREB 1b) detectado por ensayos de *Western blot* usando anticuerpos específicos anti- $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$, anti-CREB y anti-actina como control de carga. (B) Comparación de la cuantificación de la señal por

densitometría de CREB (panel izquierdo) y $Ca_v\alpha_2\delta-1$ (panel derecho) obtenida como en (A) y normalizada con su respectivo control ($n=5$ experimentos independientes; CREB 1a $*p<0.001$ *t-test*; CREB 1b $*p=0.002$ *t-test*).

Después, se decidió llevar a cabo la maniobra experimental recíproca, es decir, investigar si la sobreexpresión de ELK-1 y/o CREB tenía algún efecto sobre la cantidad de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ expresada. Con este fin, los cultivos de las células GH3 se transfectaron con construcciones de ADNc que codifican para las proteínas GFP (como control), HA-ELK-1 y FLAG-CREB y se evaluó su expresión por medio de *Western Blot*. Primero se confirmó la eficiencia de la transfección y la sobreexpresión de los factores de transcripción usando anticuerpos específicos para detectar a ELK-1 y CREB respectivamente, y usando un anticuerpo anti-actina como control de carga (Fig. 29A). El promedio de la cuantificación de la señal mostró que la transfección generaba una sobreexpresión de ELK-1 y CREB con respecto a su control (Fig. 29B). Además, se examinó si la sobreexpresión de estos factores de transcripción tenía algún efecto sobre la expresión de la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta-1$. Sin embargo, no se observó un cambio significativo en los niveles de expresión de esta proteína (Fig. 29C), lo cual discreparía con la hipótesis de que ELK-1 regula la expresión de la subunidad. Sin embargo, la explicación a esta discrepancia podría relacionarse con el hecho de que estos experimentos se realizaron en condiciones control, es decir, sin tratamiento con EGF. Por lo tanto, a continuación, se decidió comprobar si era necesario llevar a cabo la sobreexpresión de los factores de transcripción en conjunto con el tratamiento con EGF para poder observar el efecto sobre la expresión de $Ca_v\alpha_2\delta-1$.

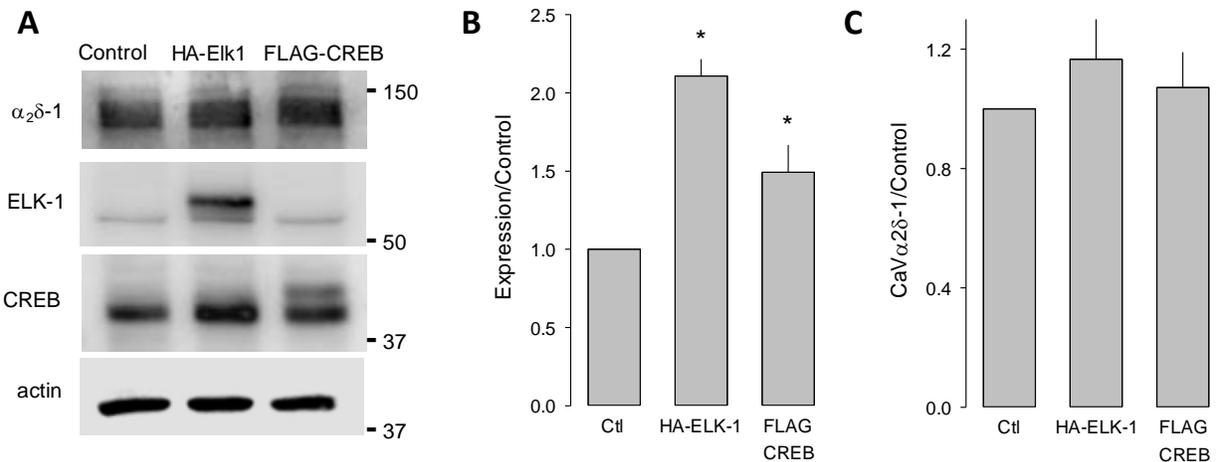


Figura 29. La sobreexpresión de ELK-1 y CREB no cambia la cantidad de $Ca_V\alpha_2\delta-1$ expresada en las células GH3. (A) Nivel de $Ca_V\alpha_2\delta-1$, ELK-1 y CREB expresado en células GH3 transfectadas con el plásmido de ADNc que codifica para HA-ELK-1 o transfectadas con el plásmido de ADNc que codifica para FLAG-CREB detectado por ensayos de *Western blot* usando anticuerpos específicos anti- $Ca_V\alpha_2\delta-1$, anti-ELK-1, anti-CREB y anti-actina como control de carga. (B) Comparación de la cuantificación por densitometría de la señal promedio de HA-ELK-1 y FLAG-CREB expresado en células GH3 transfectadas como en (A) normalizada con su respectivo control ($n=3$ experimentos independientes; ELK-1 $*p=0.029$ *t-test*; CREB $*p=0.020$ *t-test*). (C) Comparación de la cuantificación por densitometría de la señal promedio de $Ca_V\alpha_2\delta-1$ obtenida como en (A) normalizada con su respectivo control ($n=3$ experimentos independientes).

En este mismo sentido, posteriormente se decidió analizar el efecto de la sobreexpresión de ELK-1 sobre la expresión de $Ca_V\alpha_2\delta-1$ en respuesta al EGF. Con este fin, los cultivos de células GH3 transfectados con la construcción de HA-ELK-1 se trataron con 5 nM de EGF por 48 h, y se analizó la cantidad de $Ca_V\alpha_2\delta-1$ expresada por medio de *Western blot*. Como control se usaron células GH3 transfectadas con el gen reportero de GFP y tratadas con 5 nM de EGF por 48 h. La figura 30A muestra un *Western blot* representativo de experimentos independientes en donde se comprobó la correcta transfección de HA-ELK-1 empleando anticuerpos específicos contra ELK-1 y contra la bandera de hemaglutinina (HA), y además usando actina como control de carga. También, se verificó que el factor de transcripción estuviera siendo activado por el tratamiento

con EGF mediante la detección de su forma fosforilada, usando un anticuerpo anti-fosfo-ELK-1 (Fig. 30A). De manera interesante, al estudiar el efecto sobre los niveles totales de la subunidad auxiliar de los canales se observó un aumento significativo en su expresión en las células que sobreexpresaban el factor de transcripción ELK-1 (Fig. 30B). Estos resultados indican que la sobreexpresión y activación de ELK-1 tiene un efecto positivo sobre la expresión de la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$.

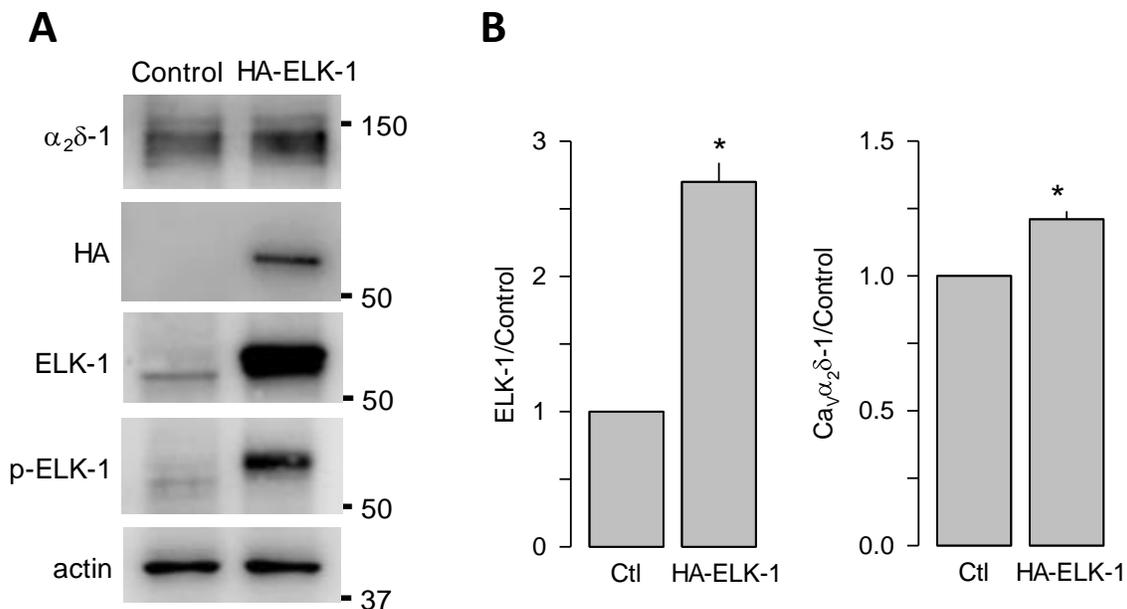


Figura 30. La sobreexpresión de ELK-1 aumenta la cantidad de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ en las células GH3 en respuesta a EGF. (A) Nivel de $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ y ELK-1 en células GH3 en presencia de EGF (5 nM; 48 h) y transfectadas con el plásmido de ADNc que codifica para la proteína GFP como control, o transfectadas también con el plásmido de ADNc que codifica para HA-ELK-1, detectado por ensayos de *Western blot* usando anticuerpos específicos anti- $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$, anti-HA, anti-ELK-1 total, anti-fosfo-ELK-1 (p-ELK-1) y anti-actina como control de carga. (B) Comparación de la cuantificación de la señal de ELK-1 (panel izquierdo) y $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ (panel derecho) obtenida como en (A) normalizada con su respectivo control ($n=3$ experimentos independientes; ELK-1 $*p<0.0001$ *t-test*; $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$ $*p<0.0001$ *t-test*).

A continuación, se procedió a investigar si la sobreexpresión y activación de ELK-1 tenía algún efecto sobre las corrientes de Ca^{2+} en las células GH3 por medio de registros electrofisiológicos. Para esto se usó la técnica de *patch clamp* en la modalidad de célula completa y las corrientes se evocaron aplicando pulsos de voltaje como se mencionó en la sección de métodos. La figura 31A muestra los trazos representativos de las corrientes en células control (transfectadas con GFP) y en células que además sobreexpresan ELK-1 (co-transfectadas con GFP para su identificación), tratadas con EGF (5 nM; 48 h). Los resultados muestran un marcado aumento en la amplitud de la corriente en las células transfectadas transitoriamente con el plásmido de ADNc que codifica para ELK-1. La figura 31A corrobora que el tratamiento con EGF por si solo aumenta (~22%) la densidad de la corriente a través de los canales de Ca^{2+} expresados en las células GH3. La figura 31B además muestra que la sobreexpresión de ELK-1 en conjunto con la activación de la vía de señalización producida por el tratamiento con EGF genera un mayor aumento (~83%) en la densidad de corriente a los distintos voltajes probados, tal y como se muestra en las curvas *I-V* correspondientes (Fig. 31B). Este aumento es significativo con respecto al control como se puede observar en la gráfica de barras que compara la densidad de corriente a -15 mV (Fig. 31C).

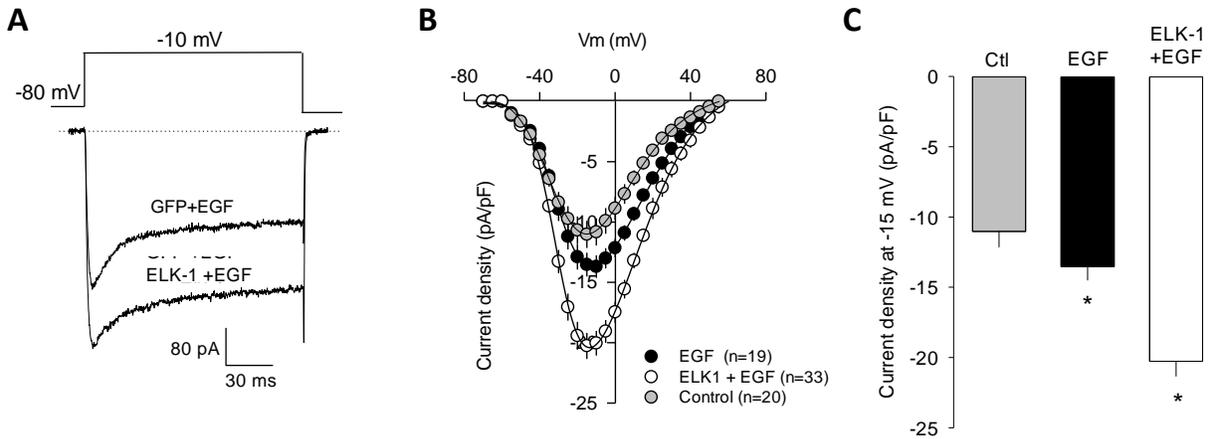


Figura 31. La sobreexpresión de ELK-1 en presencia de EGF aumenta las corrientes de Ca^{2+} en las células GH3. (A) Trazos representativos de las corrientes de Ca^{2+} en células GH3 en presencia de EGF (5 nM; 48 h) y transfectadas con el plásmido de ADNc que codifica para la proteína GFP como control, o transfectadas con el plásmido de ADNc que codifica para HA-ELK-1. (B) Curvas I - V para las corrientes de Ca^{2+} registradas en células GH3 en condiciones control o transfectadas con GFP, o HA-ELK-1 y tratadas con 5 nM de EGF. (C) Comparación de la densidad de corriente total promedio (pA/pF) a -15 mV en células como en (B) (EGF * $p=0.042$ t -test; ELK-1+EGF * $p<0.001$ t -test). Los datos se presentan como la media \pm error estándar y el número de células registradas se muestra entre paréntesis.

Asimismo, la sobreexpresión de ELK-1 generó un incremento sobre la conductancia máxima, pero esto no ocasionó cambios significativos en la dependencia al voltaje de la activación y en la cinética de inactivación de las corrientes (Fig. 32).

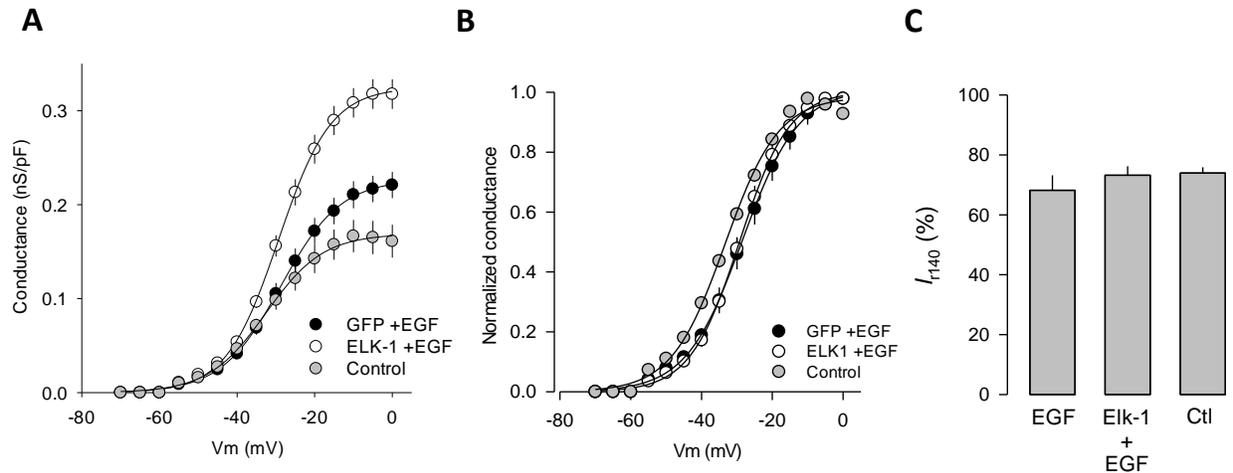


Figura 32. La sobreexpresión de ELK-1 no cambia las propiedades fundamentales de las corrientes de Ca²⁺ de las células GH3. (A) Comparación de la conductancia máxima en función del voltaje en células control, o transfectadas con GFP o ELK-1 y tratadas con EGF (5 nM; 48 h). (B) Comparación de la dependencia al voltaje de la activación de las corrientes de Ca²⁺ (C) Porcentaje de corriente remanente al final del pulso de 140 ms (I_{r140}) en células control, o que expresan solo GFP, o ELK-1 y tratadas con EGF (5 nM; 48 h). Los datos se presentan como la media ± error estándar.

También, se decidió analizar el efecto de la sobreexpresión y activación de CREB en la expresión de la subunidad Ca_vα₂δ-1 después del tratamiento con EGF. En estos experimentos las células GH3 se transfectaron con la construcción de ADNc que codifica para FLAG-CREB y se trataron con 5 nM de EGF por 48 h. Para el análisis de la expresión se usó la técnica de *Western blot*, en células control y transfectadas con el plásmido que codifica para la proteína GFP y tratadas con EGF (5 nM; 48 h). En los ensayos se usaron anticuerpos específicos contra CREB y contra FLAG para verificar la transfección, y se usó actina como control de carga (Fig. 33A). Asimismo, se detectó la forma fosforilada de CREB con un anticuerpo específico anti-fosfo-CREB para verificar la activación de este factor de transcripción en respuesta al tratamiento con EGF (Fig. 33A). Tal y como se anticipaba, la cuantificación mostró un aumento significativo en la

expresión de CREB (Fig. 33B). Sin embargo, no se observaron cambios significativos en los niveles totales de $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$ expresados (Fig. 33C). Estos resultados indican que la sobreexpresión y activación de CREB no tiene un efecto sobre la expresión de la subunidad auxiliar $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$.

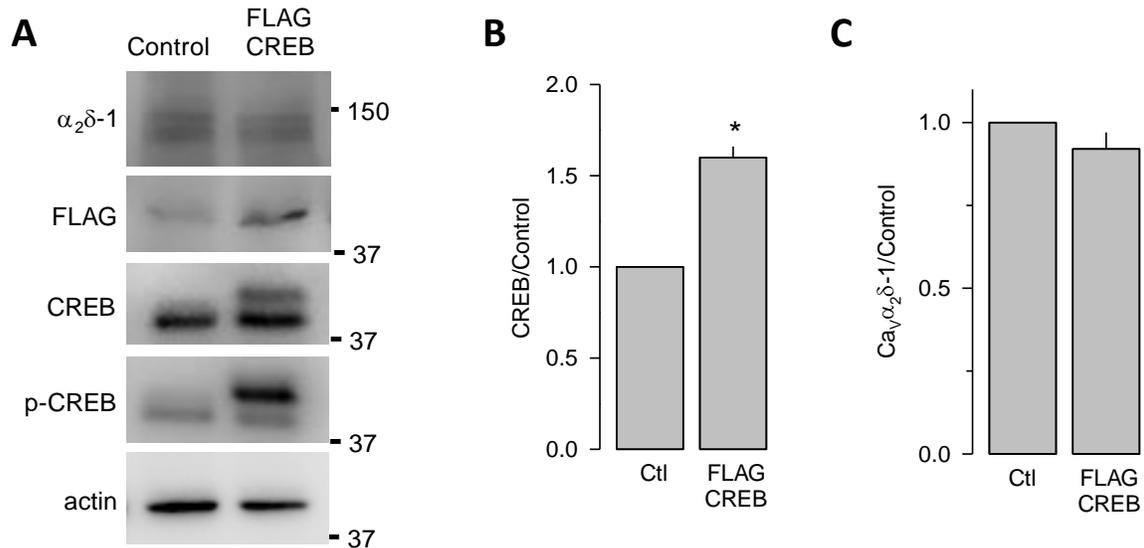


Figura 33. La sobreexpresión de CREB no cambia la cantidad de $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$. (A) Nivel de $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$ y CREB expresado en células GH3 en presencia de EGF (5 nM; 48 h) y transfectadas con el plásmido de ADNc que codifica para la proteína GFP como control, o transfectadas con el plásmido de ADNc que codifica para FLAG-CREB detectado por ensayos de *Western blot* usando anticuerpos específicos anti- $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$, anti-FLAG, anti-CREB total, anti-fosfo-CREB (p-CREB) y anti-actina como control de carga. Las gráficas de barras muestran el promedio de la cuantificación de la señal de CREB (B) y $\text{Cav}\alpha_2\delta-1$ (C) obtenida como en (A), normalizada con respecto a su control ($n=3$ experimentos independientes; * $p=0.002$ *t-test*).

Para completar este análisis, se realizaron registros electrofisiológicos de las corrientes de Ca^{2+} en células que sobreexpresan al factor de transcripción CREB y tratadas con EGF (5 nM; 48 h). De manera inesperada, no solo no se observó un aumento, sino que por el contrario se observó una disminución en la amplitud de la corriente en las células transfectadas con la construcción de ADNc que codifica para el factor de transcripción CREB en comparación con las células control (GFP) en respuesta a EGF (Fig. 34A). A continuación, se analizó la densidad de corriente en las

células control (GFP) sin tratamiento, y en las células transfectadas con GFP o con CREB en respuesta al tratamiento con el factor de crecimiento. Los resultados de este análisis mostraron que el tratamiento con EGF ocasiona un incremento en la densidad de corriente en las células que expresan GFP. Sin embargo, y de manera interesante, la sobreexpresión de CREB previene el aumento en la densidad de corriente en respuesta a EGF (Fig. 34B). Estos resultados se resumen en la figura 34C, donde se muestra que el tratamiento con EGF incrementa significativamente la densidad de corriente máxima y que este efecto se ve prevenido por la sobreexpresión del factor de transcripción CREB.

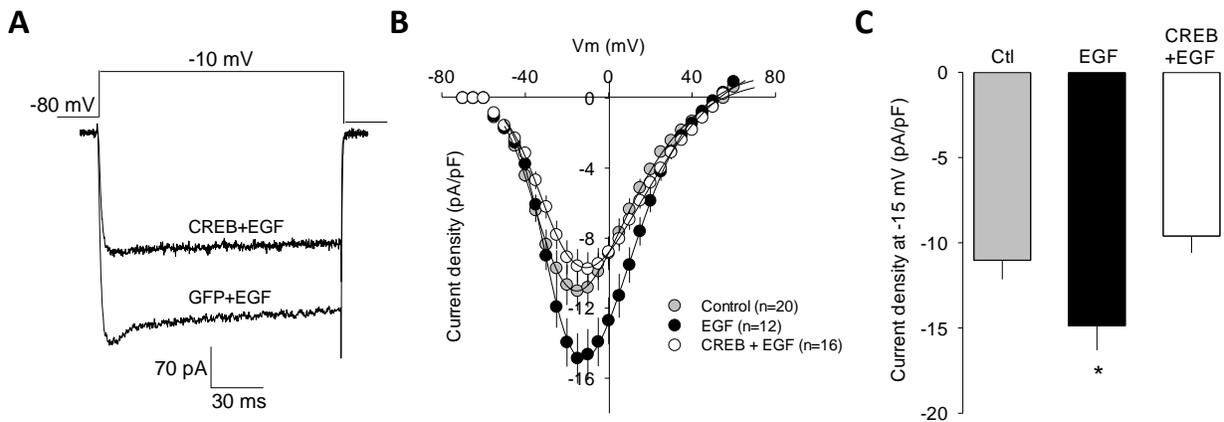


Figura 34. La sobreexpresión de CREB no cambia las corrientes de Ca²⁺ de las células GH3 en presencia de EGF. (A) Trazos representativos de las corrientes de Ca²⁺ de células GH3 en presencia de EGF (5 nM; 48 h) y transfectadas con el plásmido de ADNc que codifica para la proteína GFP como control, o transfectadas con el plásmido de ADNc que codifica para FLAG-CREB. (B) Curvas *I-V* de las corrientes de Ca²⁺ de células GH3 en condiciones control o transfectadas con GFP, o FLAG-CREB y tratadas con 5 nM de EGF. (C) Comparación de la densidad de corriente total promedio (pA/pF) a -15 mV en células como en (B) (EGF **p*=0.025 *t*-test). Los datos se presentan como la media ± error estándar y el número de células registradas se muestra entre paréntesis.

En cuanto al análisis de las propiedades fundamentales de las corrientes, se observó que la sobreexpresión de CREB en respuesta a EGF no modifica de manera significativa la conductancia máxima, la dependencia al voltaje de la activación, ni la cinética de inactivación (Fig. 35).

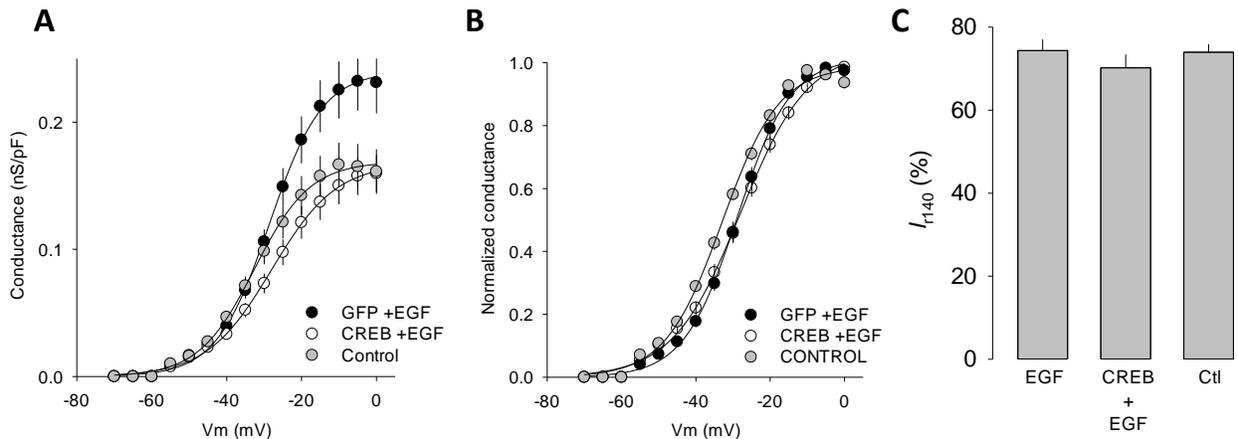


Figura 35. La sobreexpresión de CREB no cambia las propiedades fundamentales de las corrientes de Ca^{2+} de las células GH3. (A) Comparación de la conductancia máxima en función del voltaje en células control, o transfectadas con GFP o CREB y tratadas con EGF (5 nM; 48 h). (B) Comparación de la dependencia al voltaje de la activación de las corrientes de Ca^{2+} . (C) Comparación del porcentaje de corriente remanente al final del pulso de 140 ms (I_{r140}) en células control, o que expresan GFP o CREB y tratadas con EGF (5 nM; 48 h). Los datos se presentan como la media \pm error estándar.

6.9 Análisis de la secreción de prolactina.

En una serie final de experimentos a continuación se estudió la posible repercusión funcional del tratamiento con EGF y la sobreexpresión de la subunidad auxiliar $Ca_v\alpha_2\delta-1$. Con este fin se determinó la liberación de PRL por medio de ensayos de ELISA. En estos experimentos se emplearon cultivos de células GH3 en condiciones control o tratadas previamente con 5 nM de EGF por 48 h. Para estudiar la liberación de PRL, se indujo la entrada de Ca^{2+} mediante la despolarización de la membrana usando un pulso de alto K^+ (40 mM) durante 10 min, y se usó como control una solución con 5 mM de K^+ . Los resultados de esta serie de experimentos

mostraron un incremento significativo (~ 2.3 veces) en la secreción de PRL en las células tratadas con EGF (Fig. 36A). Este resultado es consistente con datos previos en la literatura donde se muestra que el tratamiento con EGF tiene como resultado un aumento en la expresión y liberación de PRL (Murdoch *et al.*, 1982; Felix *et al.*, 1995; Kakeya *et al.*, 2000; 2002).

A continuación, se planteó la idea de que al manipular la expresión de ELK-1 también debería afectarse la secreción de PRL en las células GH3. De acuerdo con la hipótesis del presente trabajo de tesis, esto ocurriría a través del efecto que ELK-1 ejerce sobre el promotor del gen que codifica para Cav $\alpha_2\delta$ -1. Para poner a prueba esta predicción existen varias posibilidades. Una de ellas consistiría en cuantificar la secreción de la hormona después del silenciamiento de ELK-1; otra sería usar un inhibidor de la vía de señalización de ERK/ELK-1. Sin embargo, estudios previos han reportado que la activación de la vía de las MAPKs en respuesta a EGF promueve la fosforilación del receptor de estrógenos α (ER α) y esto puede afectar directamente la expresión y la secreción de PRL (Ben-Jonathan *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2009). Esto impediría distinguir si el posible efecto de ELK-1 sobre la liberación de PRL ocurre a través de su acción sobre el promotor de *CACNA2D1*, o si esto ocurre a través de ER α . Por lo tanto, se consideró como la alternativa más viable estudiar directamente la sobreexpresión de Cav $\alpha_2\delta$ -1 sobre la secreción de PRL evitando el efecto del factor de transcripción sobre otros posibles blancos.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 36B, y en ellos se observa que la liberación de PRL desencadenada por la despolarización de la membrana con el estímulo de alto K⁺ aumentó significativamente ($\sim 35\%$) en las células que sobreexpresan a la subunidad Cav $\alpha_2\delta$ -1 en comparación con las células que expresaban a la proteína GFP como control.

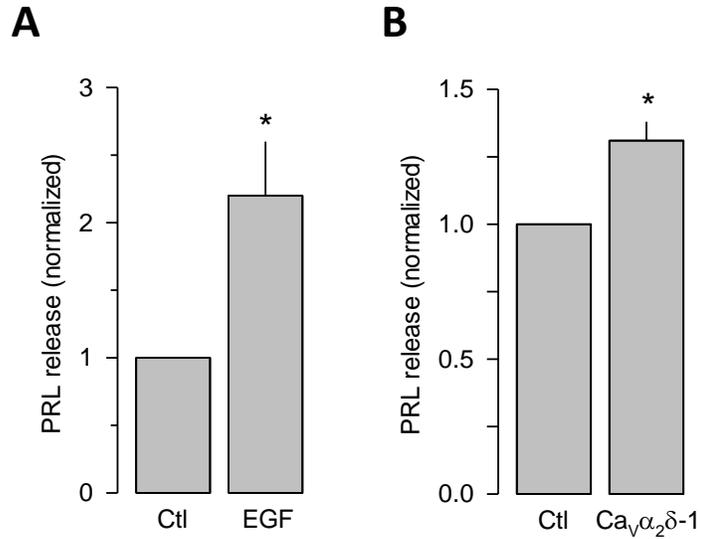


Figura 36. El tratamiento con EGF y la sobreexpresión de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ aumentan la secreción de prolactina por las células GH3. (A) Ensayos de ELISA para detectar la prolactina (PRL) secretada en los cultivos de células GH3 en presencia y ausencia de EGF (5 nM; 48 h; $p=0.0113$ *t-test*). (B) Ensayos de ELISA para detectar PRL secretada por las células GH3 en ausencia de EGF, transfectadas con GFP como control, o transfectadas con la clona de ADNc que codifica para la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta-1$ ($p=0.001$ *Mann-Whitney Rank Sum Test*).

7. Discusión

7.1 Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y ontogenia de los lactotropos.

En el presente trabajo de tesis se muestran evidencias que apoyan la hipótesis de que el tratamiento crónico con EGF aumenta la expresión de la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta-1$ a nivel transcripcional y, por consecuencia, se favorece la localización membranal de los canales Ca_v HVA. Este aumento en la expresión funcional de los canales HVA puede ayudar a explicar los cambios reportados previamente en la densidad de la corriente en respuesta al EGF en las células GH3 (Felix *et al.*, 1995).

Se sabe que el tratamiento con EGF aumenta la proporción de lactotropos clásicos (secretores únicos de PRL) en cultivos primarios de células adenohipofisarias de ratas neonatas y en la línea celular GH3. En este contexto, el factor de crecimiento también aumenta significativamente la liberación de PRL, como resultado de sus efectos sobre diferenciación de las células bihormonales (secretoras de PRL y GH) a lactotropos clásicos (Felix *et al.*, 1995). Asimismo, está ampliamente documentado que la diferenciación de los lactosomatotropos se inicia con la expresión del gen Pit-1 el cual codifica para un factor de transcripción que se une a los promotores de los genes que codifican tanto para PRL como para GH. Sin embargo, se sabe que el número de células secretoras de PRL va aumentando con el desarrollo y que la aparición de una gran cantidad de lactotropos clásicos es un cambio postnatal importante que viene acompañado de un aumento en las corrientes de Ca^{2+} de tipo HVA. En este sentido, la diferenciación de los lactotropos depende de señales tanto autócrinas como parácrinas en las que participan diversas hormonas y factores de crecimiento como el EGF, la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y los estrógenos, entre otros (Felix *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993; Takahashi, 1995). En específico, en este trabajo

se muestra que el EGF no sólo influye sobre la producción de PRL, sino que modifica la expresión funcional de los canales Ca_v . Por lo tanto, los datos aquí presentados apoyan la idea de que el EGF podría estar involucrado en la transición entre diferentes estados durante la ontogenia de los lactotrofos en la hipófisis (Felix *et al.*, 1995; Kayeka *et al.*, 2000; 2002). Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar esta posibilidad.

El papel de los canales Ca_v HVA en la regulación del acople excitación-secreción está ampliamente documentado en las células secretoras de PRL. El tratamiento crónico con EGF de las células hipofisarias tumorales de rata aumenta la expresión funcional de los canales HVA, la concentración intracelular de Ca^{2+} y la consecuente liberación de PRL (Meza *et al.*, 1994; Felix *et al.*, 1995; Vela *et al.*, 2007). Además, se sabe que el EGF y la TRH estimulan la expresión del gen que codifica para PRL (Billis & White, 1997), sin embargo, la activación de los canales HVA es necesaria para la liberación de hormonas (Drouva *et al.*, 1988; Enyeart *et al.*, 1990; Gonzalez-Iglesias *et al.*, 2006). En este sentido, el factor de crecimiento podría estar ejerciendo un doble efecto sobre el comportamiento secretor de los lactotrofos; por un lado, estimularía la producción de PRL y, por otro lado, estaría favoreciendo la síntesis de las proteínas involucradas en su liberación. Sin embargo, vale la pena mencionar que hay evidencias que indican que el EGF podría estar reduciendo la concentración intracelular de Ca^{2+} y la secreción de PRL en células hipofisarias en respuesta a la despolarización de la membrana por alto K^+ (Hinkle *et al.*, 1993; Fu *et al.*, 1997), lo que sugiere que el EGF puede regular la actividad de los canales y la homeostasis de Ca^{2+} de manera compleja, aunque los mecanismos que regularían este efecto aún no se han determinado.

Distinguir entre los subtipos de canales HVA que están siendo regulados a través de este mecanismo molecular en respuesta a EGF es un tema interesante. Se sabe que las células GH3 expresan los canales HVA (Cav1.2, Cav1.3 y Cav2.1). Debido a que todos los canales tipo HVA, incluyendo los que se expresan en las células GH3, se asocian a la Cav α 2 δ -1, se esperaría que todos ellos resultaran afectados por el aumento en la expresión de esta subunidad auxiliar en respuesta a EGF. También, se sabe que los canales tipo L (Cav1) en general (Liévano *et al.*, 1994; Meza *et al.*, 1994; Tzour *et al.*, 2013) y el de tipo Cav1.3 en particular, se expresan en mayor abundancia en estas células (Liévano *et al.*, 1994; Safa *et al.*, 2001). Los datos de *Western Blot* obtenidos durante mi trabajo de doctorado corroboran la expresión de estos canales Cav1.2 y Cav1.3 (así como Cav2.1) en las células GH3 (Fig. 13). Además, la posición de las curvas *I-V* en el eje de las abscisas (*V_m*) muestra que la activación de las corrientes alcanza su valor máximo alrededor de los -15 mV, un valor esperado para la activación de los canales L de la clase Cav1.3, los cuales son considerados canales activados a voltaje medio (Safa *et al.*, 2001; Dominguez *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2009). Por lo tanto, aunque las células GH3 expresan diversos canales HVA, resulta razonable proponer que el número de canales funcionales Cav1.3 podría ser mayor después del tratamiento con EGF, ya que son los más abundantemente expresados en estas células.

Asimismo, se sabe que la subunidad auxiliar Cav β también aumenta la densidad de las corrientes al aumentar la expresión funcional de los canales en la membrana plasmática. Esto se debe a que Cav β enmascara una señal de retención en el retículo endoplásmico y expone señales de envío a la membrana plasmática en la subunidad principal Cav α 1, esto permite que la subunidad principal pueda transportarse a la superficie celular (Bichet *et al.*, 2000; Fang & Colecraft, 2011). También, se sabe que la subunidad auxiliar Cav β previene la ubiquitinación de la

subunidad principal y su consecuente degradación por el proteasoma, lo que tiene como resultado un aumento en la expresión en la membrana plasmática (Altier *et al.*, 2011; Waithe *et al.*, 2011; Buraei & Yang, 2013). De igual manera, se sabe que Cav β regula la secreción de hormonas y neurotransmisores al acoplar el complejo del canal con las vesículas secretoras al unirse a RIM, una proteína efectora de Rab3 (Kiyonaka *et al.*, 2007; Gandini *et al.*, 2011). Tomando en consideración que las células GH3 expresan las cuatro isoformas de esta subunidad auxiliar (Safa *et al.*, 2001), sería también interesante investigar el papel de la subunidad Cav β en este mecanismo molecular en respuesta a EGF.

7.2 Efecto del EGF sobre la expresión de los canales Cav.

El EGF cumple su función al unirse a sus receptores en la membrana, los cuales pertenecen a la familia EGFR/ErbB, que consta de 4 miembros llamados ErbB1-ErbB4. La unión del factor de crecimiento a su receptor produce la formación de un dímero ErbB activado el cual se autofosforila. Los receptores fosforilados pueden activar varias vías de señalización celular, incluidas las vías de JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR, PLC γ /PKC, y Ras/Raf/MEK/ERK/ELK-1, las cuales pueden resultar en cambios rápidos de la expresión génica (Yarden & Pines, 2012). Por lo tanto, aquí se buscó determinar el mecanismo molecular por el cual el EGF regula la expresión de la subunidad Cav $\alpha_2\delta$ -1 de los canales HVA. Los resultados obtenidos mostraron que al inhibir a la cinasa ERK se prevenía el aumento de Cav $\alpha_2\delta$ -1 en respuesta al EGF, lo que sugiere un papel importante de la vía de señalización de las MAPKs (Ras/Raf/MEK/ERK/ELK-1) en el mecanismo molecular de este factor de crecimiento.

Diversos estudios han mostrado el papel de esta vía de señalización en regulación de la expresión y modulación de los canales Cav en distintos tipos celulares. Woodall y colaboradores

(2008) observaron que cultivos de neuronas provenientes del ganglio de la raíz dorsal tratadas con el factor de crecimiento neuronal (NGF) y EGF, mostraban un aumento en la densidad de corriente a través de canales Cav que era mediado por la vía de señalización de las MAPKs. Aunque los autores proponen que el efecto del EGF ocurre a nivel transcripcional, también existen reportes en los que la activación de esta vía de señalización modula las propiedades de los canales por medio de fosforilaciones ya sea en la subunidad principal $Cav\alpha_1$ o en la subunidad auxiliar $Cav\beta$ (Martin *et al.*, 2006).

Los factores de transcripción que son activados por la vía de señalización de las MAPKs son diversos, sin embargo, el más conocido es ELK-1. Este factor de transcripción es activado mediante fosforilación mediada por la cinasa ERK 1/2. De igual manera, es bien sabido que el factor de transcripción CREB también puede ser activado por esta vía de señalización, en la cual la cinasa ERK 1/2 activa a cinasas como RSK-2 o MSK-1 las cuales tienen afinidad por CREB (De Cesare *et al.*, 1998; Roskoski, 2012).

7.3 Factores de transcripción implicados en la respuesta al EGF.

La caracterización *in silico* del promotor del gen *CACNA2D1* y los resultados obtenidos previamente sugerían un papel para los factores de transcripción ELK-1 y CREB en la regulación transcripcional en respuesta al EGF. Con los resultados aquí presentados, se describe que tanto el silenciamiento del factor de transcripción ELK-1 como la eliminación del sitio de unión a ELK-1 evitan la activación inducida por EGF del promotor del gen *CACNA2D1* que codifica para $Cav\alpha_2\delta$ -1. Curiosamente, el uso de siRNAs específicos contra el factor de transcripción CREB también evitó la activación inducida por EGF del promotor del gen *CACNA2D1*, sin embargo, la construcción de este promotor que albergaba una mutación en el sitio de unión consenso a CREB mostró una

respuesta completa al EGF. Aunque actualmente se desconoce la razón de esta discrepancia, resulta razonable proponer podría estar asociada al hecho de que el silenciamiento de CREB puede estar afectando indirectamente la activación del promotor de $Ca_v\alpha_2\delta-1$, tal y como se describe a continuación.

La caracterización *in silico* de la región 5' río arriba del gen *CACNA2D1* ha revelado que se trata de un promotor sin caja TATA y que contiene una región rica en GC (Martínez-Hernández *et al.*, 2013). Es bien sabido que las regiones ricas en GC actúan como anclas principales para la maquinaria transcripcional y a menudo funcionan como una región importante en el proceso de transcripción génica. Simultáneamente, las regiones ricas en GC son elementos que se encuentran en muchos promotores y pueden contener sitios consenso de unión para el factor de transcripción Sp1. De manera interesante, se ha reportado que Sp1 puede regular la actividad del promotor génico y en consecuencia la expresión endógena de la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta-1$ en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y en neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal (DRG; Martínez-Hernández *et al.*, 2013; Gómez *et al.*, 2019). Por otro lado, en un estudio reciente se descubrió que CREB unido a la región distal del promotor del gen de oncostatina-M puede interactuar con Sp1 unido en una región proximal a través de una proteína co-activadora llamada p300 (Mukherjee & Bandyopadhyay, 2018). Este hallazgo es importante ya que establece una interacción de largo alcance entre dos factores de transcripción mediados por un co-activador mutuo. Con base en estos datos, es razonable especular que el silenciamiento de CREB podría estar interfiriendo con la actividad del factor de transcripción Sp1 durante la activación del promotor de *CACNA2D1* en respuesta a EGF. Por lo tanto, Sp1 unido al promotor no encontraría suficiente CREB unido al ADN y, en consecuencia, podría ser menos efectivo para activar la

transcripción del gen *CACNA2D1*. Sin lugar a dudas, este podría ser un tema interesante para futuros estudios.

La vía clásica de activación de CREB involucra el aumento en adenosín monofosfato cíclico (AMPC) y la consecuente activación de la proteína cinasa dependiente de AMPC (PKA). Sin embargo, se ha demostrado que CREB puede inducir la transcripción de genes también en respuesta a mitógenos y a señales de estrés. La capacidad de CREB para diferenciar entre AMPC y estas señales no es clara, pero se ha propuesto que los co-activadores p300 y la proteína de unión a CREB (CBP) pudieran desempeñar un papel en este proceso de señalización. De manera interesante, otros factores de transcripción (como Sp1 y ELK-1) también se unen a estos co-activadores. Por lo tanto, CREB puede estar contribuyendo indirectamente en la transcripción de *CACNA2D1* en respuesta al EGF a través de su interacción con p300 y CBP, y a su vez con factores de transcripción como Sp1 y ELK-1 (Kwok *et al.*, 1994; Janknecht & Nordheim, 1996; Mayr & Montminy, 2001). Además, se ha reportado que la transcripción del gen c-fos, que tiene sitios de unión para ELK-1 y CREB en su región promotora, es altamente cooperativa. Los factores de transcripción y sus elementos reguladores forman un complejo de transcripción que varía entre diferentes tipos celulares y puede responder de maneras distintas a las señales reguladoras *in vivo*. Por lo tanto, la ausencia de un elemento de este complejo puede afectar indirectamente la activación de la transcripción génica (Robertson *et al.*, 1995).

Por último, los estudios electrofisiológicos también evidencian la relevancia funcional del factor de transcripción ELK-1 sobre la expresión de $Ca_v\alpha_2\delta-1$ y, en consecuencia, la localización en la superficie celular de los canales HVA en la línea celular GH3. El factor de transcripción ELK-1 (ETS like-1) se caracteriza por regular la transcripción de genes de expresión rápida al unirse a

los elementos de respuesta sérica (SRE) en las regiones promotoras de estos. También forma parte de la familia de factores de transcripción de factor de complejo ternario (TCF) ya que para llevar a cabo la regulación de la transcripción forma un complejo con un dímero del factor de respuesta sérico (SRF). Dentro de las funciones en las que se involucra ELK-1 están la proliferación celular, supervivencia celular, diferenciación, migración celular, entre otros (Besnard *et al.*, 2011).

7.4 Conclusión.

Los resultados del presente trabajo de tesis revelan un novedoso mecanismo molecular de cómo el EGF al activar la vía de señalización Ras/Raf/MEK/ERK/ELK-1 aumenta la expresión y la localización en la membrana plasmática de la subunidad auxiliar Cav $\alpha_2\delta$ -1 en células GH3. El aumento de Cav $\alpha_2\delta$ -1 en respuesta al tratamiento con EGF puede influir en la expresión funcional de los canales Cav HVA en la membrana plasmática, y este efecto a su vez puede dar como resultado un incremento en la densidad de corriente de Ca²⁺. Como consecuencia de esta serie de eventos se produce una mayor secreción de PRL en las células GH3.

7.5 Perspectivas.

Como se mencionó anteriormente, las perspectivas a corto plazo de este trabajo incluyen el diferenciar entre los subtipos de canales HVA que pudieran estar siendo regulados por el mecanismo molecular aquí propuesto. En este sentido, vale la pena mencionar que determinar una posible regulación diferencial en la actividad de los canales Cav HVA tipo L mediante el uso de agentes farmacológicos no es posible ya que no existen bloqueadores selectivos. Los fármacos usados para bloquear canales tipo L (dihidropiridinas, fenilalquilaminas, benzotiazepinas) no discriminan entre los canales Cav1.2 y Cav1.3 que se expresan en las células GH3. Por lo tanto, para responder esta pregunta de investigación será necesario usar técnicas bioquímicas que nos

permitan estimar el número de canales en la superficie celular en respuesta a este mecanismo molecular.

De igual manera, las perspectivas de este trabajo a mediano plazo incluyen verificar si la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\beta$ está participando también en el mecanismo molecular aquí propuesto, al aumentar el número de canales en la membrana plasmática. Para poner a prueba esta idea se podrían utilizar técnicas moleculares y/o bioquímicas para investigar la repercusión en la expresión de las subunidades $\text{Ca}_v\beta$ expresadas en las células GH3 en respuesta al EGF. Por último, sería muy interesante comprobar si los resultados presentados en este trabajo de tesis también se observan en cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata. En este contexto, es importante mencionar que en la literatura ya hay algunos reportes que hacen pensar que el mecanismo molecular aquí propuesto de respuesta al EGF se podría estar llevando a cabo también en células adenohipofisarias en cultivo primario. Sin duda este sería un proyecto interesante a realizar a largo plazo.

8. Referencias

- Aidley DJ, Stanfield PR. (1996) Ion channels: molecules in action. Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp. 320.
- Al Moustafa AE, Achkhar A, Yasmeeen A. (2012) EGF-receptor signaling and epithelial-mesenchymal transition in human carcinomas. *Front Biosci (Schol Ed)* 4, 671-684.
- Altier C, Garcia-Caballero A, Simms B, You H, Chen L, Walcher J, Tedford HW, Hermosilla T, Zamponi GW. (2011) The Cav β subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nature Neurosci* 14, 173–180.
- Andrade A, Sandoval A, Oviedo N, De Waard M, Elias D, Felix R. (2007) Proteolytic cleavage of the voltage-gated Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ subunit: structural and functional features. *Eur J Neurosci* 25, 1705-1710.
- Andrade A, Sandoval A, González-Ramírez R, Lipscombe D, Campbell KP, Felix R. (2009) The $\alpha_2\delta$ subunit augments functional expression and modifies the pharmacology of Ca_v1.3 L-type channels. *Cell calcium* 46, 282–292.
- Ben-Jonathan N, Chen S, Dunckley JA, LaPensee C, Kansra S. (2009) Estrogen receptor-alpha mediates the epidermal growth factor-stimulated prolactin expression and release in lactotrophs. *Endocrinology* 150, 795–802.
- Bernstein GM, Jones OT. (2007) Kinetics of internalization and degradation of N-type voltage-gated calcium channels: role of the alpha2/delta subunit. *Cell Calcium* 41, 27-40.
- Besnard A, Galan-Rodriguez B, Vanhoutte P, Caboche J. (2011) Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front Neurosci* 5, 35.

- Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M. (2000) The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25, 177–190.
- Billis WM, White BA. (1997) Effects of the protein tyrosine kinase inhibitor, herbimycin A, on prolactin gene expression in GH3 and 235-1 pituitary tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1358, 31–38.
- Brickley K, Campbell V, Berrow N, Leach R, Norman RI, Wray D, Dolphin AC, Baldwin SA. (1995) Use of site-directed antibodies to probe the topography of the α_2 subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *FEBS Lett.* 364, 129-133.
- Brose N, Petrenko AG, Südhof TC, Jahn R. (1992) Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256, 1021–1025.
- Buraei Z, Yang J. (2013) Structure and function of the β subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Biochim Biophys Acta* 1828, 1530–1540.
- Calderón-Rivera A, Andrade A, Hernández-Hernández O, González-Ramírez R, Sandoval A, Rivera M, Gomora JC, Felix R. (2012) Identification of a disulfide bridge essential for structure and function of the voltage-gated Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ -1 auxiliary subunit. *Cell Calcium* 51, 22-30.
- Campiglio M, Flucher BE. (2015) The role of auxiliary subunits for the functional diversity of voltage-gated calcium channels. *J Cell Physiol* 230, 2019-2031.
- Cantí C, Nieto-Rostro M, Foucault I, Hebllich F, Wratten J, Richards MW, Hendrich J, Douglas L, Page KM, Davies A, Dolphin AC. (2005) The metal-ion-dependent adhesion site in the Von Willebrand factor-A domain of $\alpha_2\delta$ subunits is key to trafficking voltage-gated Ca²⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 11230–11235.

- Cassidy JS, Ferron L, Kadurin I, Pratt WS, Dolphin AC. (2014) Functional exofacially tagged N-type calcium channels elucidate the interaction with auxiliary $\alpha_2\delta$ -1 subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 111, 8979-8984.
- Catterall WA. (1999) Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann NY Acad Sci* 868, 144-159.
- Catterall WA. (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003947.
- Chen S, Bangaru ML, Sneade L, Dunckley JA, Ben-Jonathan N, Kansra S. (2009) Epidermal growth factor receptor cross-talks with ligand-occupied estrogen receptor-alpha to modulate both lactotroph proliferation and prolactin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E331–E339.
- Davies A, Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Douglas L, Nieto-Rostro M, Bauer CS, Pratt WS, Dolphin AC. (2010) The $\alpha_2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels form GPI-anchored proteins, a posttranslational modification essential for function. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 1654-1659.
- De Cesare D, Jacquot S, Hanauer A, Sassone-Corsi P. (1998) Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of c-fos gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 12202–12207.
- De Jongh KS, Warner C, Catterall WA. (1990) Subunits of purified calcium channels. α_2 and δ are encoded by the same gene. *J Biol Chem* 265, 14738-14741.
- Dhara M, Mohrmann R, Bruns D. (2018) v-SNARE function in chromaffin cells. *Pflugers Archiv Eur J Physiol* 470, 169–180.

Dolphin AC (2012) Calcium channel auxiliary $\alpha_2\delta$ and β subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev Neurosci* 13, 542-555.

Dolphin AC. (2013) The $\alpha_2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim Biophys Acta* 1828, 1541-1549.

Dolphin AC. (2018) Voltage-gated calcium channel $\alpha_2\delta$ subunits: an assessment of proposed novel roles. *F1000Res* 7.

Dominguez B, Avila T, Flores-Hernandez J, Lopez-Lopez G, Martinez-Rodriguez H, Felix R, Monjaraz E. (2008) Up-regulation of high voltage-activated Ca^{2+} channels in GC somatotropes after long-term exposure to ghrelin and growth hormone releasing peptide-6. *Cell Mol Neurobiol* 28, 819–831.

Drouva SV, Rerat E, Bihoreau C, Laplante E, Rasolonjanahary R, Clauser H, Kordon C. (1988) Dihydropyridine-sensitive calcium channel activity related to prolactin, growth hormone, and luteinizing hormone release from anterior pituitary cells in culture: interactions with somatostatin, dopamine, and estrogens. *Endocrinology* 123, 2762–2773.

Duran P, Sandoval A, González-Ramírez R, Zarco N, Felix R. (2020). Regulation of the Ca^{2+} channel $\alpha_2\delta$ -1 subunit expression by epidermal growth factor via the ERK/ELK-1 signaling pathway. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 319, E232–E244.

Ellis SB, Williams ME, Ways NR, Brenner R, Sharp AH, Leung AT, Campbell KP, McKenna E, Koch WJ, Hui A, Schwartz A, Harpold MM. (1988) Sequence and expression of mRNAs encoding the α_1 and α_2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* 241, 1661-1664.

Enyeart JJ, Biagi B, Day RN. (1990) Opposing actions of Bay K 8644 enantiomers on calcium current, prolactin secretion, and synthesis in pituitary cells. *Mol Endocrinol* 4, 727–735.

- Fang K, Colecraft HM. (2011) Mechanism of auxiliary β -subunit-mediated membrane targeting of L-type (Cav1.2) channels. *J Physiol* 589, 4437–4455.
- Felix R, Horta J, Cota G. (1993) Comparison of lactotrope subtypes of neonatal and adult male rats: plaque assays and patch-clamp studies. *Am J Physiol* 265, E121–E127.
- Felix R, Meza U, Cota G. (1995) Induction of classical lactotropes by epidermal growth factor in rat pituitary cell cultures. *Endocrinology* 136, 939-946.
- Felix R, Gurnett CA, De Waard M, Campbell KP. (1997) Dissection of functional domains of the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\alpha_2\delta$ subunit. *J Neurosci* 17, 6884-6891.
- Felix R. (1999) Voltage-dependent Ca^{2+} channel $\alpha_2\delta$ auxiliary subunit: structure, function and regulation. *Receptors Channels* 6, 351-362.
- Felix R, Calderon-Rivera A, Andrade A. (2013) Regulation of high-voltage-activated Ca^{2+} channel function, trafficking, and membrane stability by auxiliary subunits. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 2, 207-220.
- Ferron L, Kadurin I, Dolphin AC. (2018) Proteolytic maturation of $\alpha_2\delta$ controls the probability of synaptic vesicular release. *Elife*, 7.
- Fu J, Scammell JG, Li M. (1997) Epidermal growth factor reduces L-type voltage-activated calcium current density in GH4C1 rat pituitary cells. *Neuroendocrinology* 65, 157–163.
- Gandini MA, Sandoval A, González-Ramírez R, Mori Y, de Waard M, Felix R. (2011) Functional coupling of Rab3-interacting molecule 1 (RIM1) and L-type Ca^{2+} channels in insulin release. *J Biol Chem* 286, 15757–15765.

- Gandini MA, Felix R. (2012) Functional interactions between voltage-gated Ca^{2+} channels and Rab3-interacting molecules (RIMs): new insights into stimulus-secretion coupling. *Biochim Biophys Acta* 1818, 551-558.
- Gandini MA, Sandoval A, Felix R. (2014) Patch-clamp recording of voltage-sensitive Ca^{2+} channels. *Cold Spring Harb Protoc* 2014, 329-5.
- Gee NS, Brown JP, Dissanayake VU, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN. (1996) The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the $\alpha_2\delta$ subunit of a calcium channel. *J Biol Chem* 271, 5768-5776.
- Gómez K, Sandoval A, Barragán-Iglesias P, Granados-Soto V, Delgado-Lezama R, Felix R, González-Ramírez R. (2019) Transcription factor Sp1 regulates the expression of calcium channel $\alpha_2\delta$ -1 subunit in neuropathic pain. *Neuroscience* 412, 207–215.
- Gonzalez-Iglesias AE, Jiang Y, Tomić M, Kretschmannova K, Andric SA, Zemkova H, Stojilkovic SS. (2006) Dependence of electrical activity and calcium influx-controlled prolactin release on adenylyl cyclase signaling pathway in pituitary lactotrophs. *Mol Endocrinol* 20, 2231–2246.
- Gurnett CA, De Waard M, Campbell KP. (1996) Dual function of the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\alpha_2\delta$ subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* 16, 431-440.
- Gurnett CA, Felix R, Campbell KP. (1997) Extracellular interaction of the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\alpha_2\delta$ and α_1 subunits. *J Biol Chem* 272, 18508-18512.
- Hille B. (2001) Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd ed. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. pp. 814.
- Hinkle PM, Nelson EJ, Haymes AA. (1993) Regulation of L-type voltage-gated calcium channels by epidermal growth factor. *Endocrinology* 133, 271–276.

- Hofmann F, Lacinova L, Klugbauer N. (1999) Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 139, 33-87.
- Janknecht R, Nordheim A. (1996) MAP kinase-dependent transcriptional coactivation by Elk-1 and its cofactor CBP. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 831–837.
- Jay SD, Sharp AH, Kahl SD, Vedvick TS, Harpold MM, Campbell KP. (1991) Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel α_2 -subunit and the associated delta peptides. *J Biol Chem* 266, 3287-3293.
- Kadurin I, Ferron L, Rothwell SW, Meyer JO, Douglas LR, Bauer CS, Lana B, Margas W, Alexopoulos O, Nieto-Rostro M, Pratt WS, Dolphin AC. (2016) Proteolytic maturation of $\alpha_2\delta$ represents a checkpoint for activation and neuronal trafficking of latent calcium channels. *Elife*, 5.
- Kadurin I, Rothwell SW, Lana B, Nieto-Rostro M, Dolphin AC. (2017) LRP1 influences trafficking of N-type calcium channels via interaction with the auxiliary $\alpha_2\delta$ -1 subunit. *Sci Rep* 7, 43802.
- Takeyama T, Takeuchi S, Takahashi S. (2000) Epidermal growth factor, insulin, and estrogen stimulate development of prolactin-secreting cells in cultures of GH3 cells. *Cell Tissue Res* 299, 237–243.
- Takeyama T, Takeuchi S, Takahashi S. (2002) Induction of mammoth development by a combination of epidermal growth factor, insulin, and estradiol-17beta in rat pituitary tumor GH3 cells. *Zool Sci* 19, 789–795.
- Kiino DR, Dannies PS. (1981) Insulin and 17 β -estradiol increase the intracellular prolactin content of GH4C1 cells. *Endocrinology* 109, 1264-1269.
- Kiyonaka S, Wakamori M, Miki T, Uriu Y, Nonaka M, Bito H, Beedle AM, Mori E, Hara Y, De Waard M, Kanagawa M, Itakura M, Takahashi M, Campbell KP, Mori Y. (2007) RIM1 confers

sustained activity and neurotransmitter vesicle anchoring to presynaptic Ca^{2+} channels. *Nature Neurosci* 10, 691–701.

Klugbauer N, Lacinova L, Marais E, Hobom M, Hofmann F. 1999. Molecular diversity of the calcium channel $\alpha_2\delta$ subunit. *J Neurosci* 19, 684-691.

Kwok RP, Lundblad JR, Chrivia JC, Richards JP, Bächinger HP, Brennan RG, Roberts SG, Green MR, Goodman RH. (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223–226.

Lacinova L. (2005) Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 Suppl 1, 1-78.

Liévano A, Bolden A, Horn R. (1994) Calcium channels in excitable cells: divergent genotypic and phenotypic expression of α_1 -subunits. *Am J Physiol* 267, C411–C424.

Martin TF. (2003) Tuning exocytosis for speed: fast and slow modes. *Biochim Biophys Acta* 1641, 157–165

Martin SW, Butcher AJ, Berrow NS, Richards MW, Paddon RE, Turner DJ, Dolphin AC, Sihra TS, Fitzgerald EM. 2006. Phosphorylation sites on calcium channel α_1 and β subunits regulate ERK-dependent modulation of neuronal N-type calcium channels. *Cell calcium* 39, 275–292.

Martínez-Hernández E, González-Ramírez R, Sandoval A, Cisneros B, Delgado-Lezama R, Felix R. (2013) Isolation and characterization of the 5'-upstream region of the human voltage-gated Ca^{2+} channel $\alpha_2\delta$ -1 auxiliary subunit gene: promoter analysis and regulation by transcription factor Sp1. *Pflugers Arch* 465, 819-828.

Mayr B, Montminy M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature reviews. Mol Cell Biol* 2, 599–609.

- Meza U, Avila G, Felix R, Gomora JC, Cota G. (1994) Long-term regulation of calcium channels in clonal pituitary cells by epidermal growth factor, insulin, and glucocorticoids. *J Gen Physiol* 104, 1019-1038.
- Misler S. (2009) Unifying concepts in stimulus-secretion coupling in endocrine cells and some implications for therapeutics. *Adv Physiol Educ* 33, 175–186.
- Mochida S, Sheng H, Baker C, Kobayashi H, Catterall WA. (1996) Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca²⁺ channels. *Neuron* 17, 781–788.
- Mudado MA, Rodrigues AL, Prado VF, Beirao PS, Cruz JS. (2004) Cav3.1 and Cav3.3 account for T-type Ca²⁺ current in GH3 cells. *Braz J Med Biol Res* 37, 929-935.
- Mukherjee S, Sengupta Bandyopadhyay S. (2018) Mechanism of prostaglandin E₂-induced transcriptional up-regulation of Oncostatin-M by CREB and Sp1. *Biochem J* 475, 477-494.
- Murdoch GH, Potter E, Nicolaisen AK, Evans RM, Rosenfeld MG. (1982) Epidermal growth factor rapidly stimulates prolactin gene transcription. *Nature* 300, 192–194.
- Nava-Acosta R, Navarro-Garcia F. (2013) Cytokeratin 8 is an epithelial cell receptor for Pet, a cytotoxic serine protease autotransporter of Enterobacteriaceae. *mBio* 4, e00838-13.
- Perin MS, Fried VA, Mignery GA, Jahn R, Südhof TC. (1990) Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345, 260-263.
- Prager D, Yamashita S, Melmed S. (1988) Insulin regulates prolactin secretion and messenger ribonucleic acid levels in pituitary cells. *Endocrinology* 122, 2946-2952.

- Qin N, Yagel S, Momplaisir ML, Codd EE, D'Andrea MR. (2002) Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel $\alpha_2\delta$ -4 subunit. *Mol Pharmacol* 62, 485-496.
- Robertson LM, Kerppola TK, Vendrell M, Luk D, Smeyne RJ, Bocchiaro C, Morgan JI, Curran T. (1995) Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements. *Neuron* 14, 241–252.
- Roskoski R Jr. (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66, 105-143.
- Roskoski R Jr. (2014) The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol Res* 79, 34-74.
- Safa P, Boulter J, Hales TG. (2001) Functional properties of Cav1.3 (α_{1D}) L-type Ca^{2+} channel splice variants expressed by rat brain and neuroendocrine GH3 cells. *J Biol Chem* 276, 38727-38737.
- Sandoval A, Andrade A, Beedle AM, Campbell KP, Felix R. (2007) Inhibition of recombinant N-type Ca_v channels by the γ_2 subunit involves unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent mechanisms. *J Neurosci* 27, 3317-3327.
- Savalli N, Pantazis A, Sigg D, Weiss JN, Neely A, Olcese R. (2016) The $\alpha_2\delta$ -1 subunit remodels Cav1.2 voltage sensors and allows Ca^{2+} influx at physiological membrane potentials. *J Gen Physiol* 148, 147-159.
- Schonbrunn A, Krasnoff M, Westendorf J., Tashjian AH Jr. (1980) Epidermal growth factor and thyrotropin-releasing hormone act similarly on a clonal pituitary cell strain. Modulation of hormone production and inhibition of cell proliferation. *J Cell Biol* 85, 786-797.

- Shaywitz AJ, Greenberg ME. (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68, 821-861.
- Stojilkovic SS, Zemkova H, Van Goor F. (2005). Biophysical basis of pituitary cell type-specific Ca^{2+} signaling-secretion coupling. *Trends Endocrinol Metab* 16, 152–159.
- Stojilkovic SS, Tabak J, Bertram R. (2010) Ion channels and signaling in the pituitary gland. *Endocr Rev* 31, 845-915.
- Toledo A, Sandoval A, González-Ramírez R, Ávila T, Almanza A, Monjaraz E, Gomora JC, Piedras-Rentería ES, Felix R. (2012) Insulin-mediated upregulation of T-type Ca^{2+} currents in GH3 cells is mediated by increased endosomal recycling and incorporation of surface membrane $\text{Ca}_v3.1$ channels. *Cell Calcium* 52, 377-387.
- Tran-Van-Minh A, Dolphin AC. (2010) The $\alpha_2\delta$ ligand gabapentin inhibits the Rab11-dependent recycling of the calcium channel subunit $\alpha_2\delta-2$. *J Neurosci* 30:12856-12867.
- Tzour A, Sosial E, Meir T, Canello T, Naveh-Many T, Gabizon R, Nussinovitch I. (2013) Multiple pathways for high voltage-activated Ca^{2+} influx in anterior pituitary lactotrophs and somatotrophs. *J Neuroendocrinol* 25, 76–86.
- Waithe D, Ferron L, Page KM, Chaggar K, Dolphin AC. (2011) β -subunits promote the expression of $\text{Ca}_v2.2$ channels by reducing their proteasomal degradation. *J Biol Chem* 286, 9598–9611.
- White BA, Bancroft FC. (1983) Epidermal growth factor and thyrotropin-releasing hormone interact synergistically with calcium to regulate prolactin mRNA levels. *J Biol Chem* 258, 4618-4622.
- Woodall AJ, Richards MA, Turner DJ, Fitzgerald EM. (2008) Growth factors differentially regulate neuronal Cav channels via ERK-dependent signalling. *Cell Calcium* 43, 562–575.

- Wu J, Yan Z, Li Z, Yan C, Lu S, Dong M, Yan N. (2015) Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex. *Science* 350, aad2395.
- Wu J, Yan Z, Li Z, Qian X, Lu S, Dong M, Zhou Q, Yan N. 2016. Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 at 3.6 Å resolution. *Nature* 537, 191-196.
- Yarden Y, Pines G. (2012) The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nature Rev Cancer* 12, 553–563.
- Zeng F, Harris RC. (2014) Epidermal growth factor, from gene organization to bedside. *Semin Cell Dev Biol* 28, 2-11.
- Zhang K, Kulig E, Jin L, Lloyd RV. (1993) Effects of estrogen and epidermal growth factor on prolactin and Pit-1 mRNA in GH3 cells. *Proc Soc Experim Biol Med* 202, 193–200.
- Zhong H, Yokoyama CT, Scheuer T, Catterall WA. (1999) Reciprocal regulation of P/Q-type Ca²⁺ channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin. *Nature Neurosci* 2, 939–941.