



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACANTENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**Caracterización del ciclo de transporte nuclear de la subunidad auxiliar
Cav β 3 de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje**

TESIS

Que presenta

María Alejandra Corzo López

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR

Directores de Tesis

Dr. Diego Ricardo Félix Grijalva

Dr. Ricardo González Ramírez

Ciudad de México

Julio, 2018

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Ricardo Felix por permitirme realizar el proyecto en su laboratorio, por los consejos y enseñanzas que han enriquecido mi vida profesional.

Al Doctor Ricardo González Ramírez por todas sus enseñanzas y consejos que enriquecieron profundamente este proyecto, también por su dedicación en mi proceso de aprendizaje en el laboratorio.

A mis asesores los Doctores Fernando Navarro y Bulmaro Cisneros, por sus aportes a este trabajo de tesis.

A la Biol. Mercedes Urban Nuñez por sus enseñanzas con los cultivos celulares y sus palabras de apoyo. Al Ing. Hugo Cadena por su apoyo técnico.

Al Dr Alejandro Sandoval por sus enseñanzas y apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio, M. en C. Paz Duran, M. en C. Kimberly Gómez, y David Muñoz por su ayuda constante y sus palabras de aliento.

A Mis compañeros de maestría en especial a Landy, Kerlys y Sheila, por sus risas y ser mi apoyo en todo momento.

A Tatiana Romero y Jimmy Hernández por el tiempo compartido y ser mi familia colombiana en México.

A mi familia que en la distancia siempre estuvo conmigo, en especial a Dora López por ser el motor de mi vida.

A Francisco Torres por su apoyo incondicional, en la buenas, las malas y en las peores.

CONTENIDO

PREFACIO	5
RESUMEN	7
<i>ABSTRACT</i>	9
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje: estructura, función y clasificación	12
1.2 Estructura y función de las subunidades auxiliares Cav β	17
1.3 Papel funcional de las subunidades Cav β fuera del complejo del canal	20
1.4 Transporte nuclear	22
1.5 Las subunidades Cav β en el núcleo celular	26
2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
3. HIPÓTESIS	30
4. OBJETIVO GENERAL	31
4.1 Objetivos específicos	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1 Cultivo celular y transfección	32
5.2 Mutagénesis sitio-dirigida	34
5.3 Inmunofluorescencia	37
5.4 Fraccionamiento celular	39
5.5 <i>Western blot</i>	40
5.6 Inhibición del importe nuclear	41

6. RESULTADOS	43
6.1 Localización nuclear de Cav β 3	43
6.2 Inhibición del transporte nuclear de Cav β 3	45
6.3 Inhibición del transporte nuclear de Cav β 3 endógena	47
6.4 Mutagénesis sitio-dirigida	50
6.5 Localización de Cav β 3 silvestre y sus mutantes de transporte nuclear	53
7. DISCUSIÓN	55
7.1 Comparación con estudios previos	55
7.2 Posibles mecanismos alternativos de importe nuclear de Cav β 3	58
7.3 Perspectivas	60
8. REFERENCIAS	62

PREFACIO

La subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\beta$ de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) se encuentra implicada en la regulación del complejo proteico que forma los canales, contribuyendo a determinar la probabilidad de apertura, regulando la expresión en la membrana celular, e interactuando con otras moléculas reguladoras como las proteínas G, diversas proteínas cinasas y RGK GTPasas, entre muchas otras, que a su vez determinan la actividad de los canales. Aunque $\text{Ca}_v\beta$ es una proteína preponderantemente citoplasmática, se sabe que tiene la capacidad de translocarse al núcleo celular. Sin embargo, actualmente poco se conoce del posible papel de $\text{Ca}_v\beta$ en la regulación de la transcripción génica y de los mecanismos celulares y moleculares que emplea para llegar al núcleo. Por lo tanto, el presente trabajo de tesis tiene como finalidad caracterizar el ciclo de transporte que emplea $\text{Ca}_v\beta 3$ para llegar al núcleo empleando herramientas de biología celular y molecular.

El trabajo se desarrolló en el laboratorio 55 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav). La tesis fue dirigida por los doctores Diego Ricardo Félix Grijalva, profesor titular del Departamento de Biología Celular del Cinvestav, y Ricardo González Ramírez investigador en Ciencias Médicas en el Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” de la Secretaría de Salud. El plan

experimental se desarrolló con la asesoría de los doctores Fernando Navarro García, profesor titular del Departamento de Biología Celular y Bulmaro Cisneros Vega, profesor titular del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav. Durante mis estudios de Maestría conté con el apoyo de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

RESUMEN

Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) son los principales reguladores de la entrada de los iones de Ca^{2+} en las células excitables en respuesta a cambios en el potencial de membrana. Los canales Ca_v se dividen en dos grupos llamados de alto y bajo umbral de activación (HVA y LVA, respectivamente). Ambos tipos de canales están conformados por una proteína principal formadora del poro del canal y que permite el flujo de los iones (subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$). Los canales HVA cuentan además con subunidades auxiliares que regulan la actividad de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$, conocidas como $\text{Ca}_v\beta$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ y $\text{Ca}_v\gamma$. La subunidad $\text{Ca}_v\beta$, objeto de estudio del presente trabajo, influye sobre las propiedades biofísicas del canal y sobre su tráfico hacia la membrana celular. La subfamilia de las subunidades $\text{Ca}_v\beta$ se encuentra conformada por 4 miembros ($\text{Ca}_v\beta 1$ - $\text{Ca}_v\beta 4$), cada uno producto de un gen diferente y con distintas variantes de *splicing* alternativo. Estudios recientes muestran que $\text{Ca}_v\beta$ cuenta con funciones independientes del canal, siendo su localización nuclear una de las más intrigantes, pues se ha mostrado que $\text{Ca}_v\beta 4$ puede viajar al núcleo celular y reprimir la transcripción de ciertos genes. Asimismo, estudios previos de nuestro laboratorio indican que también $\text{Ca}_v\beta 3$ se transporta al núcleo, aunque los mecanismos moleculares de su tránsito hacia este compartimento y sus posibles funciones nucleares aún no han sido esclarecidas. Por lo tanto, en el presente trabajo se decidió continuar con la

caracterización de las posibles señales de importe y exporte nuclear presentes en Cav β 3, y para ello inicialmente se diseñaron construcciones de Cav β 3 con mutaciones dirigidas a una posible señal de localización nuclear (NLS) bipartita en la proteína, y a una señal de exporte nuclear (L266Q) identificadas *in silico*. Estas construcciones se transfectaron en células HeLa para analizar su localización subcelular por microscopia confocal. En paralelo se realizaron ensayos de inhibición del importe nuclear mediante el uso de ivermectina para estudiar si el importe nuclear de Cav β 3 se encuentra mediado por importinas.

ABSTRACT

Voltage-gated Ca^{2+} channels (Ca_v) are the main regulators of Ca^{2+} entry into excitable cells allowing ion influx in response to changes in membrane potential. Ca_v channels are divided into two groups called high voltage-activated and low voltage-activated (HVA and LVA, respectively) calcium channels. Both types of channels comprise an $\text{Ca}_v\alpha_1$ main subunit, which is the pore-forming protein and allows the influx of the Ca^{2+} ions. HVA channels also associated to auxiliary subunits (called $\text{Ca}_v\beta$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$ and $\text{Ca}_v\gamma$) that regulate the activity of the $\text{Ca}_v\alpha_1$ subunit. The $\text{Ca}_v\beta$ subunit, the main subject of study in this work, influences the biophysical properties of the channel and its membrane trafficking. The subfamily of $\text{Ca}_v\beta$ subunits comprises 4 members ($\text{Ca}_v\beta 1$ - $\text{Ca}_v\beta 4$), each a product of different genes and with different variants of alternative splicing. Recent studies have shown that $\text{Ca}_v\beta$ may have channel-independent functions, being its nuclear location one of the most intriguing, since it has been shown that $\text{Ca}_v\beta 4$ can be transported to the cell nucleus and represses the transcription of specific genes. Previous studies from our laboratory have indicated that the $\text{Ca}_v\beta 3$ subunit is also transported to the nucleus, although the molecular mechanisms of its transit to this compartment and its potential nuclear functions have not yet been elucidated. Thereby, in the present work, we decided to characterize, the putative signals of nuclear import and export in $\text{Ca}_v\beta 3$. To this end, distinct $\text{Ca}_v\beta 3$ constructs were initially

designed to mutate a possible nuclear localization signal (NLS) and to a nuclear export signal (L266Q) identified *in silico*. These Cav β 3 constructs were transfected into HeLa cells to analyze their subcellular localization by confocal microscopy. Parallel experiments were performed to inhibit the nuclear transport of the protein using ivermectin to analyze whether the nuclear localization of Cav β 3 is mediated by importins.

1. INTRODUCCIÓN

El calcio es un regulador importante de la actividad celular dado que participa en el control de muy diversos procesos fisiológicos como el acople excitación-contracción, la liberación de hormonas y neurotransmisores, así como en la regulación de enzimas que participan en la transducción de señales, la proliferación celular y la transcripción de genes. Debido a esto, la concentración intracelular de Ca^{2+} se encuentra finamente regulada. En las células de los mamíferos, el transporte de iones a través las membranas celulares está regulado por diversos mecanismos que incluyen canales iónicos, ATPasas y transportadores. Los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Cav) son ejemplo de ello, y constituyen los principales reguladores del influjo de los iones Ca^{2+} en las células excitables como las neuronas y las células musculares (Catterall, 2011; Felix *et al.*, 2013).

Los canales Cav son proteínas transmembranales ampliamente distribuidas en diversos tipos celulares que se abren en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática. Así, el cambio en el potencial de membrana causa un cambio conformacional en el canal que lo hace transitar de un estado cerrado en el que se encuentra normalmente al potencial de reposo de las células, a un estado activo (permeable para los iones) lo cual genera un influjo de Ca^{2+} que aumenta de manera transitoria su concentración intracelular (Catterall, 2011; Gandini *et al.*, 2014).

Debido a que los canales Ca_v se expresan ampliamente en las neuronas, resulta razonable pensar que alteraciones en su funcionamiento pueden relacionarse con patologías del sistema nervioso como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, así como la esclerosis lateral amiotrófica, entre otras, en las cuales se conoce que la homeostasis del Ca^{2+} se encuentra alterada (Marambaud *et al.*, 2009).

1.1 Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje: estructura, función y clasificación

Desde el punto de vista de su estructura molecular, los canales Ca_v poseen una proteína o subunidad principal (llamada $Ca_v\alpha_1$) que forma el poro conductor de los iones. Esta subunidad posee 4 dominios homólogos repetidos, cada uno con seis segmentos transmembranales (S1-S6). El segmento S4 es el sensor de voltaje, y el *loop* que vincula los segmentos S5 y S6, forma el poro por donde fluyen los iones. Por su parte, las subunidades auxiliares ($Ca_v\beta$, $Ca_v\alpha_2\delta$ y $Ca_v\gamma$) regulan la actividad de la subunidad $Ca_v\alpha_1$ (Fig. 1; Lacinová, 2005; Catterall, 2011; Felix *et al.*, 2013).

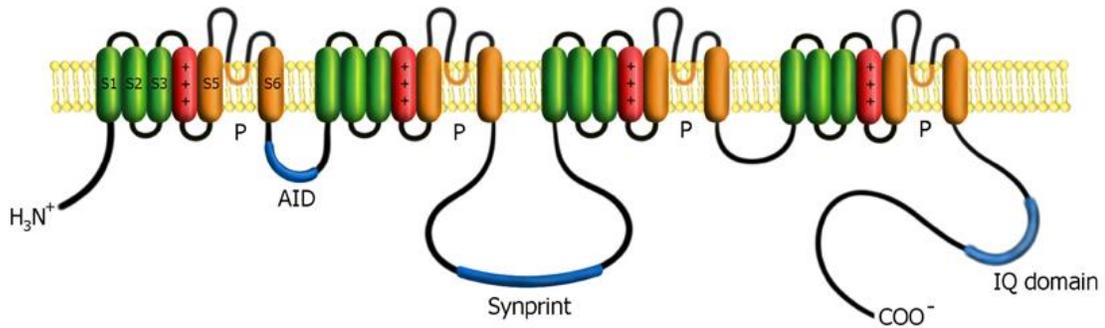


Figura 1. Estructura de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha 1$. La proteína tiene una estructura modular compuesta por 4 dominios repetidos de 6 segmentos transmembranales cada uno. El segmento S4 (rojo) es el sensor de voltaje y el *loop* reentrante P forma el poro de canal. La región conocida como AID es el sitio de unión para la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\beta$ (Modificado de Gandini *et al.*, 2014).

Los canales Ca_v se clasifican de acuerdo con sus características electrofisiológicas y farmacológicas en dos grupos llamados de alto y bajo umbral de activación (HVA y LVA, por sus siglas en inglés). Los canales HVA generalmente se activan a potenciales de membrana despolarizantes (>-20 mV), presentan una conductancia unitaria grande, una cinética de inactivación dependiente de voltaje lenta y pueden ser inhibidos de manera específica por ciertos fármacos y toxinas. Dentro de este grupo se encuentran canales de los tipos L, N, P/Q y R (Lacinová, 2005; Catterall, 2011; Gandini *et al.*, 2014). Por su parte, los canales LVA se caracterizan por activarse a potenciales de membrana más cercanos al potencial de reposo de las células (~ -70 mV) y muestran una

cinética de inactivación rápida, por lo cual también son conocidos como canales tipo T (*transient*).

Las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas de los canales están determinadas primordialmente por la subunidad $Cav\alpha_1$ que es la responsable de detectar los cambios en el voltaje y es capaz de unirse a toxinas y fármacos específicos. Esta subunidad está codificada por 10 genes diferentes, generando una gran diversidad en la constitución de los canales debido a la presencia de variantes de procesamiento alternativo del ARN.

A partir de ello, los canales pueden además ser clasificados en tres subgrupos, Cav_1 a Cav_3 (Fig. 2). En esta clasificación los canales HVA corresponden a los canales Cav_1 y Cav_2 , los cuales como también ya se mencionó, cuentan con subunidades auxiliares a diferencia de los canales Cav_3 (LVA o tipo T) que pueden funcionar como monómeros de la subunidad formadora del poro (Fig. 3; Lacinová, 2005; Catterall, 2011; Gandini *et al.*, 2014; Simms & Zamponi, 2014).

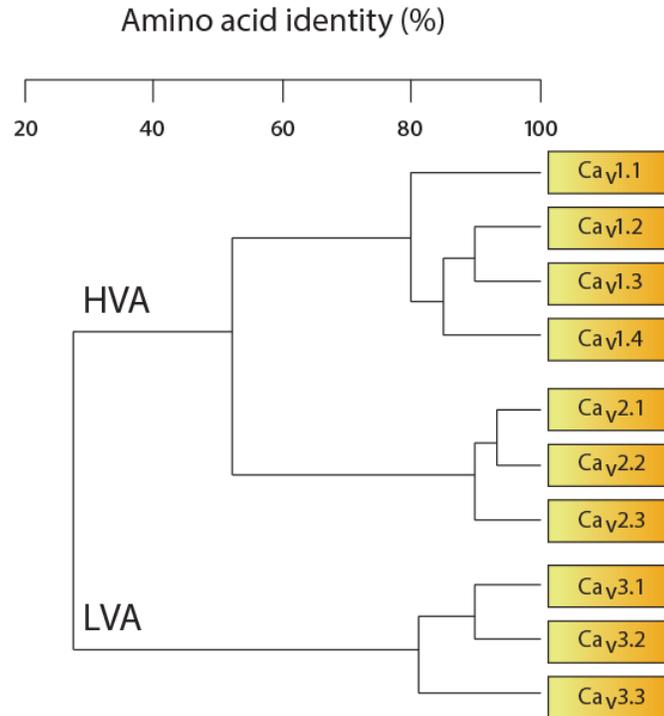


Figura 2. Clasificación de los canales Ca_v . Porcentaje de similitud entre los distintos miembros de las dos familias de canales (HVA y LVA) con base en el alineamiento de sus secuencias de aminoácidos (Modificado de Felix *et al.*, 2013).

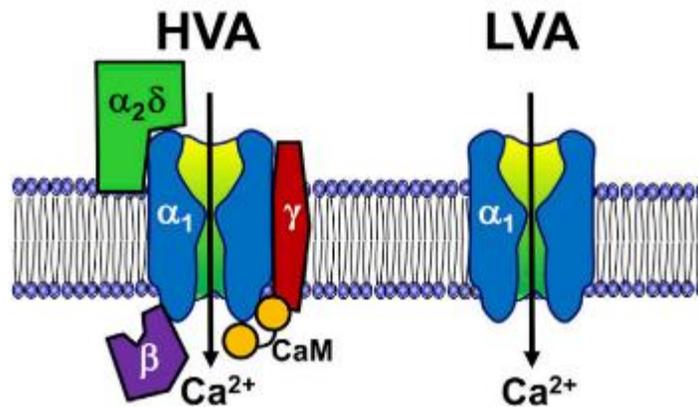


Figura 3. Estructura de los canales HVA y LVA. En el lado izquierdo se ilustra al canal HVA con las subunidades auxiliares que lo conforman y se incluye también a la calmodulina (CaM) una molécula que también desempeña un papel importante en la regulación de la actividad del canal (Simms & Zamponi 2014).

Las subunidades auxiliares $Ca_v\beta$, $Ca_v\alpha_2\delta$ y $Ca_v\gamma$ juegan distintos papeles en la regulación de los canales HVA. Así, la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta$ favorece la expresión de los canales en la membrana y regula sus propiedades biofísicas (Lacinová, 2005; Catterall, 2011; Felix *et al.*, 2013), mientras que la subunidad $Ca_v\gamma$ altera las propiedades biofísicas e inhibe la actividad funcional de los canales (Kang & Campbell, 2003; Lacinová, 2005; Catterall, 2011; Felix *et al.*, 2013). Por su parte, la subunidad $Ca_v\beta$ también se encuentra implicada en la regulación del canal, y en ese sentido se sabe que favorece la probabilidad de apertura del canal y participa en el tráfico del canal hacia la membrana celular al enmascarar una señal de retención en el retículo endoplásmico y/o al desenmascarar señales de envío a la membrana que posee la subunidad $Ca_v\alpha_1$ (Bichet *et al.*, 2000; Lacinová, 2005; Catterall, 2011; Felix *et al.*, 2013; Fang & Colecraft, 2011). Más recientemente se han identificado funciones nuevas e interesantes para esta proteína más allá de sus acciones primarias sobre el canal (Rima *et al.*, 2016), tal y como se describirá más adelante.

1.2 Estructura y función de las subunidades auxiliares Cav β

Las subunidades Cav β son proteínas fundamentalmente citosólicas de ~50-60 kDa codificadas por 4 genes diferentes, cada uno de los cuales da origen a múltiples variantes de *splicing* que a su vez dan lugar a una gran diversidad de isoformas que se asocian con diferentes subunidades Cav α_1 , lo cual amplifica la multiplicidad de los canales Cav confiriéndoles propiedades biofísicas y farmacológicas diferentes. Las diferentes subunidades Cav β se encuentran distribuidas de forma tejido-específica, e incluso algunas de las variantes de *splicing* se expresan en diferentes etapas del desarrollo (Buraei & Yang, 2010). La familia de proteínas Cav β cuenta con 5 dominios estructurales llamados NT, SH3, HOOK, GK, CT (Fig. 4).



Figura 4. Dominios estructurales de la subunidad Cav β . El dominio SH3 se muestra en amarillo y el dominio GK en verde. El dominio GK es responsable de la modulación de la función de los canales HVA, mientras que SH3 al parecer participa en el acople del canal con otros componentes celulares (Buraei & Yang, 2010).

Los dominios SH3 y GK se encuentran altamente conservados y pueden mediar interacciones con otras proteínas citoplasmáticas que modulan la

actividad del canal. El dominio homólogo a Src-3 (SH3) es un dominio que se une a proteínas con secuencias ricas en leucinas. En el dominio GK es un dominio homólogo a las enzimas guanilato cinasa sin embargo no posee actividad catalítica debido a que no presenta el dominio de unión a ATP. En este dominio se encuentra una región llamada BID (*β interaction-domain*), la cual originalmente se pensó que permitía la interacción con el dominio AID (*α interaction-domain*) que se encuentra en el lazo que conecta el repetido I y II de la subunidad Cav α_1 (Fig. 1; De Waard *et al.*, 1995; 1996). Actualmente esta noción ha sido desafiada y se sabe que la región de la subunidad Cav β que interacciona directamente con la subunidad formadora del poro del canal es mucho más compleja e incluye una hendidura hidrofóbica extensa y conservada denominada bolsa de unión α (ABP, por sus siglas en inglés; Chen *et al.*, 2004; Opatowsky *et al.*, 2004; Van Petegem *et al.*, 2004). Por otro lado, se sabe que los dominios NH₂, HOOK y COOH son altamente variables en todas las isoformas de Cav β (Buraei & Yang, 2010; Rima *et al.*, 2016). Desde el punto de vista funcional, tal y como ya se mencionó, Cav β es necesaria para el tránsito de la subunidad Cav α_1 desde el retículo endoplásmico a la membrana celular, además previene la degradación del complejo del canal a través del sistema ubiquitina-proteasoma (Waithe *et al.*, 2011), y regula su actividad modificando la cinética de activación e inactivación de la corriente.

La subunidad $\text{Ca}_v\beta 1$ se expresa primordialmente en el musculo esquelético, aunque diversas isoformas se encuentran en cerebro. Se sabe que los ratones *knockout* para esta isoforma mueren por asfixia en el nacimiento por alteraciones en el acople excitación-contracción. $\text{Ca}_v\beta 2$ se expresa principalmente en el corazón, aunque se expresa también en distintos órganos como el cerebro, la aorta, los pulmones, los riñones y el páncreas. La isoforma $\text{Ca}_v\beta 2a$ es única entre todas las variantes de $\text{Ca}_v\beta$, pues presenta dos residuos de cisteína en su extremo amino que son modificados post-traduccionalmente al unir covalentemente ácido palmítico; esta modificación permite que $\text{Ca}_v\beta 2a$ se encuentre anclada a membrana en ausencia de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha 1$. Las subunidades $\text{Ca}_v\beta 3$ y $\text{Ca}_v\beta 4$ se expresan principalmente en el cerebro, siendo $\text{Ca}_v\beta 3$ predominante en el bulbo olfatorio, la corteza y el hipocampo, mientras que la expresión de $\text{Ca}_v\beta 4$ predomina en el cerebelo. Los ratones *knockout* para $\text{Ca}_v\beta 3$ muestran cambios en funciones sensoriales como la nocicepción, el olfato, el gusto y la visión. Por otra parte, una mutación espontánea en la subunidad $\text{Ca}_v\beta 4$ se ha asociado con el fenotipo murino letárgico (*lh/lh*). Esta mutación sin sentido producto de un cambio en el marco de lectura, da como resultado una proteína truncada que pierde su capacidad de interacción con la subunidad $\text{Ca}_v\alpha 1$ (Freise *et al.*, 1999; Dolphin, 2003).

1.3 Papel funcional de las subunidades $\text{Ca}_v\beta$ fuera del complejo del canal

Además de contar con dominios que permiten su interacción con la subunidad principal $\text{Ca}_v\alpha_1$, la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\beta$ puede interactuar con otras proteínas fuera del canal y así contribuir a regular diversas funciones celulares. Un ejemplo de ello se encuentra en la subunidad $\text{Ca}_v\beta 1a$, la cual permite el acoplamiento mecánico del complejo del canal Ca_v con el receptor de rianodina tipo 1, permitiendo su activación y la consecuente liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico, dando lugar al proceso de contracción característica del músculo esquelético (Sheridan *et al.*, 2004). Por otro lado, la subunidad $\text{Ca}_v\beta$ permite la interacción de los canales $\text{Ca}_v 1.2$ con el canal de K^+ activado por Ca^{2+} (BK_{Ca}). Este canal que se encuentra ampliamente distribuido en células excitables y no excitables, ha sido asociado a la regulación de diversos eventos celulares como la frecuencia de disparo del potencial de acción, la iniciación y diseminación de picos dendríticos de Ca^{2+} , entre otros. Estudios recientes, han mostrado que $\text{Ca}_v\beta$ favorece la formación de un complejo entre los canales Ca_v y BK_{Ca} por medio de su dominio SH3, lo que resulta en la modulación de su cinética de activación e inactivación, además de disminuir su sensibilidad al Ca^{2+} (Zou *et al.*, 2008).

$\text{Ca}_v\beta$ interactúa con otras proteínas que de igual manera pueden regular la actividad del canal de forma positiva o negativa. Un ejemplo de ello es el efecto inhibitorio de kir/Gem, el cual inhibe las corrientes de Ca^{2+} a partir de su

interacción con $\text{Ca}_v\beta$ al prevenir la interacción entre $\text{Ca}_v\alpha_1$ y $\text{Ca}_v\beta$, interfiriendo con el tráfico de los canales hacia la membrana plasmática (Béguin *et al.*, 2001). De igual forma, Béguin y colaboradores (2006) llevaron a cabo un análisis comparativo de la unión de las proteínas 14-3-3 y calmodulina (CaM) sobre las funciones de las proteínas Rad y Rem (miembros de la familia de proteínas G pequeñas RGK), y mostraron que ambas ejercen efectos similares sobre la forma de la célula y la actividad de los canales Ca_v . Tanto 14-3-3 como CaM se asocian con las proteínas RGK y regulan su distribución subcelular entre el citoplasma y el núcleo. En ausencia de 14-3-3 o CaM, la subunidad $\text{Ca}_v\beta$ puede ser secuestrada en el núcleo a través de su interacción con las proteínas RGK, dificultando así el envío de los canales a la membrana celular.

Otra interacción importante de $\text{Ca}_v\beta$ ocurre con la proteína llamada bestrofina-1, una proteína que regula la función de canales de Cl^- y de Ca^{2+} tipo L. Bestrofina-1 modula la actividad de los canales de Ca^{2+} al generar un cambio en la activación dependiente de voltaje hacia potenciales de membrana más negativos. Esta modulación se encuentra favorecida por la interacción entre el dominio SH3 de $\text{Ca}_v\beta$ y los motivos ricos en prolina de bestrofina-1 (Reichhart *et al.*, 2010). Por último, Belkacemi y colaboradores (2018) mostraron evidencia de que la interacción entre $\text{Ca}_v\beta_3$ y el receptor de inositol trifosfato (IP_3R) ocurre a través del dominio SH3 de la subunidad auxiliar de los canales que reconocen motivos ricos en prolina presentes en el IP_3R . Esta interacción

genera un cambio en la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, debido a que $\text{Ca}_v\beta 3$ altera la interacción de IP_3R con su ligando.

1.4 Transporte nuclear

La envoltura nuclear es una barrera física que regula el tráfico entre el nucleoplasma y el citoplasma. Está constituida por dos bicapas de fosfolípidos que consta de una membrana interna y una externa separadas por el espacio perinuclear. Sin embargo, el citoplasma está conectado con el nucleoplasma a través de los poros nucleares. Aunque las moléculas de tamaño pequeño (<30 kDa) se pueden mover libremente a través de los poros nucleares, las moléculas más grandes necesitan la ayuda de proteínas transportadoras especiales. El complejo de poro nuclear (NPC, por sus siglas en inglés) limita el transporte de macromoléculas (Kim *et al.*, 2017). El NPC es un sistema transportador altamente selectivo y bidireccional para varias moléculas, constituido de múltiples copias de diversas nucleoporinas que, de forma general, se encuentran altamente conservadas en las células eucariotas. Los elementos que constituyen el NPC son el anillo interno del poro, los anillos nucleares y citoplasmáticos que se encuentran fusionados al anillo interno del poro y los filamentos citoplasmáticos (Beck & Hurt, 2017).

Se sabe que existen 4 elementos primordiales para que ocurra el transporte nuclear clásico: i) la presencia de nucleoporinas (NUPs) que son las

proteínas constitutivas del NPC; ii) la presencia de RanGTPasas que permiten el transporte activo y la direccionalidad del transporte; iii) la presencia de las carioferinas (importinas/exportinas/transportinas) que pueden reconocer las moléculas cargo; y iv) la presencia de señales de localización nuclear (NLS) y/o de exporte nuclear (NES) en las moléculas cargo. Las NLS y las NES son reconocidas por las carioferinas (Kim *et al.*, 2017).

El complejo del poro nuclear es un complejo macromolecular que se encuentra en la envoltura nuclear, está constituido por 500-1000 nucleoporinas. En la parte externa del complejo del poro nuclear se encuentran las NUP-FG (nucleoporinas con repetidos de fenilalanina-glicina) creando la ruta bidireccional del transporte citoplasma-núcleo. Estos repetidos de F-G forma un complejo con las β -importinas, permitiendo el transporte de moléculas al núcleo celular (Beck & Hurt, 2017).

Las Ran GTPasas proporcionan la energía para el transporte nuclear. Estas proteínas participan en un ciclo de intercambio GTP/GDP, el cual se encuentra regulado por RanGEF (factor intercambiador de nucleótidos) que se encuentra en el núcleo, y por RanGAP (proteína activadora de GTPasa) presente en el citoplasma. Al estar compartamentalizadas y tener a las diversas formas de Ran distribuidas asimétricamente, se genera un gradiente que permite dar direccionalidad al transporte nuclear. De esta forma, el complejo molecular que va a ser transportado se forma en el citoplasma en ausencia de RanGTP, y la

proteína cargo se libera en el núcleo por la unión de RanGTP en el núcleo (Fig. 5; Lange *et al.*, 2007; Fu *et al.*, 2018).

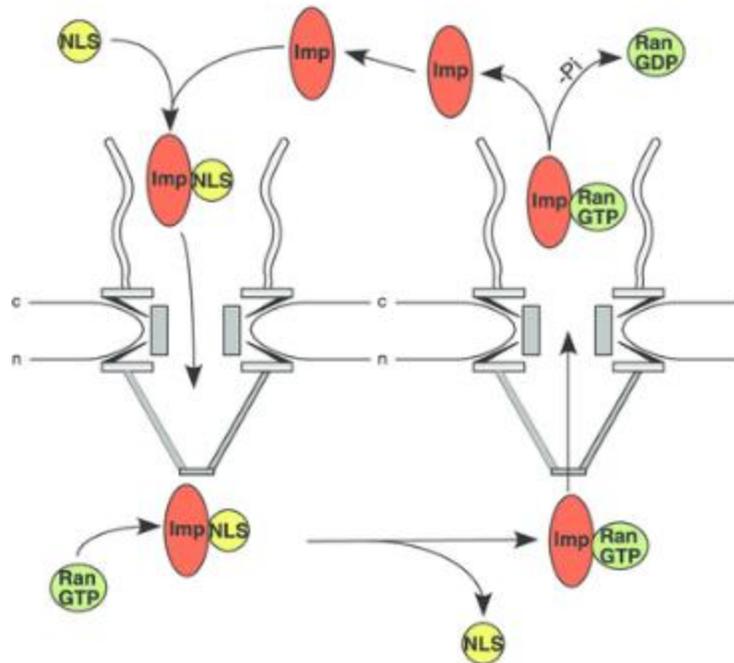


Figura 5. Transporte nuclear clásico mediado por α y β importinas. El transporte a través del complejo de poro nuclear está impulsado por un gradiente de Ran/GTP, con una alta concentración de Ran/GDP en el citoplasma y una alta concentración de Ran/GTP en el núcleo. Los complejos se forman entre proteínas cargo que contienen señales de localización nuclear (NLS), importina- α e importina- β en el citoplasma donde Ran está unida a GDP. Después del transporte a través del complejo de poro nuclear, Ran/GTP se une a la importina- β , liberando a la importina- α y la proteína cargo en el núcleo. El complejo Ran/GTP-importina- β se transfiere de nuevo al citoplasma, donde la proteína activadora de Ran GTPasa (Ran-GAP) estimula la hidrólisis del GTP unido para formar Ran/GDP. Esta conversión de Ran/GTP a Ran/GDP va acompañada de liberación de la importina- β . (Modificado de Fahrenkrog, 2006).

Las proteínas acarreadoras que facilitan el transporte de las proteínas cargo al núcleo se conocen como carioferinas. Las que participan en el transporte del citoplasma al núcleo son llamadas importinas, mientras que aquellas que favorecen el transporte del núcleo al citoplasma se conocen como exportinas. Dentro de las importinas se encuentra la superfamilia de las β importinas que funcionan como receptores de las proteínas cargo. En el transporte nuclear clásico, primero se forma un complejo proteico con α importina que reconoce la NLS de la proteína cargo (Fig. 5), y posteriormente las β importinas interaccionan con el NPC y permiten el transporte al núcleo (Lange *et al.*, 2007).

Por su parte, las NLS son secuencias cortas de aminoácidos básicos principalmente que se encuentra en las proteínas cargo. Estas señales pueden ser lineales o conformacionales y se clasifican en dos grupos. En primer lugar están las señales clásicas, que son un grupo de aminoácidos básicos (monopartita) o dos grupos separados por 10-12 aminoácidos (bipartita), que son reconocidas por el heterodímero de α y β importinas, uniéndose directamente a la α importina en su dominio armadillo. Los aminoácidos polares y ácidos de la importina forman interacciones electrostáticas y polares con los aminoácidos básicos de las NLS. La secuencia consenso de las señales de localización clásicas monopartita es K-K/R-X-K/R, mientras que en las bipartita es (K/R) (K/R) X₁₀₋₁₂ (K/R)₃₋₅ siendo X cualquier aminoácido (Lange *et al.*,

2007; Soniat & Chook, 2015). Por otro lado, las señales no clásicas (PY-NLS) son reconocidas por la carioferina $\beta 2$ conocida también como transportina-1. En este grupo de NLS las proteínas no cuentan con una señal consenso, y sus aminoácidos básicos o hidrofóbicos se encuentran distribuidos de forma aleatoria (Sun *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2006).

1.5 Las subunidades Cav β en el núcleo celular

Diversos estudios han mostrado que Cav β puede participar en funciones celulares ajenas a la regulación de los canales de Ca²⁺. Diversos estudios han mostrado que la proteína puede formar complejos que llegan hasta el núcleo celular y participar en la regulación de la expresión de diversos genes. Por ejemplo, la localización nuclear de Cav $\beta 3$ se ha asociado a la de la proteína Pax6, un factor de transcripción que participa en el desarrollo de diversos órganos como el ojo, el cerebro y el páncreas. La interacción entre estas dos proteínas permite la localización nuclear de Cav β , y eventualmente suprime la actividad transcripcional de Pax6 (Zhang *et al.*, 2010).

Asimismo, se sabe que Cav $\beta 4$ forma un complejo con B56 δ , que es la subunidad reguladora de la fosfatasa PP2A (PP2R5) movilizándose al núcleo en donde incorpora más proteínas al complejo como el receptor α de la hormona tiroidea (TR α) y la proteína de heterocromatina (HP1 γ), con lo cual se favorece la unión a la cromatina y genera desfosforilaciones en la histona 3, dando como

resultado la represión del gen de la enzima tirosina hidroxilasa. Existe una isoforma de Cav β 4 conocida por ser una variante corta implicada en la epilepsia mioclónica juvenil que carece de los últimos 38 aminoácidos de su extremo carboxilo. Al estar presente esta alteración Cav β 4 no se puede translocar al núcleo, y por lo tanto no ocurre la formación del complejo proteico que inhibe la expresión de la tirosina hidroxilasa, dando como resultado su sobreexpresión (Tadmouri *et al.*, 2012).

Estudios más recientes muestran que la subunidad Cav β 1a viaja al núcleo en las células musculares y regula la transcripción del gen de la miogenina. Se ha sugerido que el mecanismo empleado para llegar al núcleo está mediado por una interacción con la troponina 3 (TnT3), un factor de transcripción con dominios de unión al ADN, que puede asociarse específicamente al promotor de la miogenina inhibiendo su expresión. Esta interacción se encuentra mediada por el extremo COOH de TnT3 y el extremo NH₂ de Cav β 1a, lo cual indica que esta región en Cav β 1a es necesario para la interacción con TnT3 y para la translocación nuclear del complejo (Zhang *et al.*, 2015).

De igual forma se ha observado que Cav β 4 puede interferir con la progresión del ciclo celular. Rima y sus colaboradores (2017a) mostraron que al transfectar células CHO-K1 con Cav β 4 la tasa de proliferación disminuía en comparación con la de las células sin transfectar. Estudios más recientes han mostrado que Cav β 4 actúa en la vía de señalización Wnt/ β -catenina al

interactuar con el factor de transcripción TCF4. Esta interacción previene la liberación del represor de TCF4, lo cual, a su vez, reprime la expresión de genes dependientes de la vía Wnt/ β -catenina como el de Ciclina D1, una proteína que permite la progresión del ciclo celular (Rima *et al.*, 2017b).

Finalmente, análisis bioinformáticos realizados en nuestro laboratorio, muestran que Cav β 3 cuenta con una posible NLS bipartita en el dominio HOOK y una NES en el dominio GK (Castillo, 2016). Al transfectar células HeLa con algunos de los dominios estructurales de Cav β 3 (Fig. 4), se observó por microscopia confocal que existía una localización nuclear de los dominios SH3 y HOOK de la proteína, mientras que los dominios NH, GK y COOH mostraban una distribución citoplasmática, (Fig. 6) corroborando de esta manera los resultados bioinformáticos mencionados arriba.

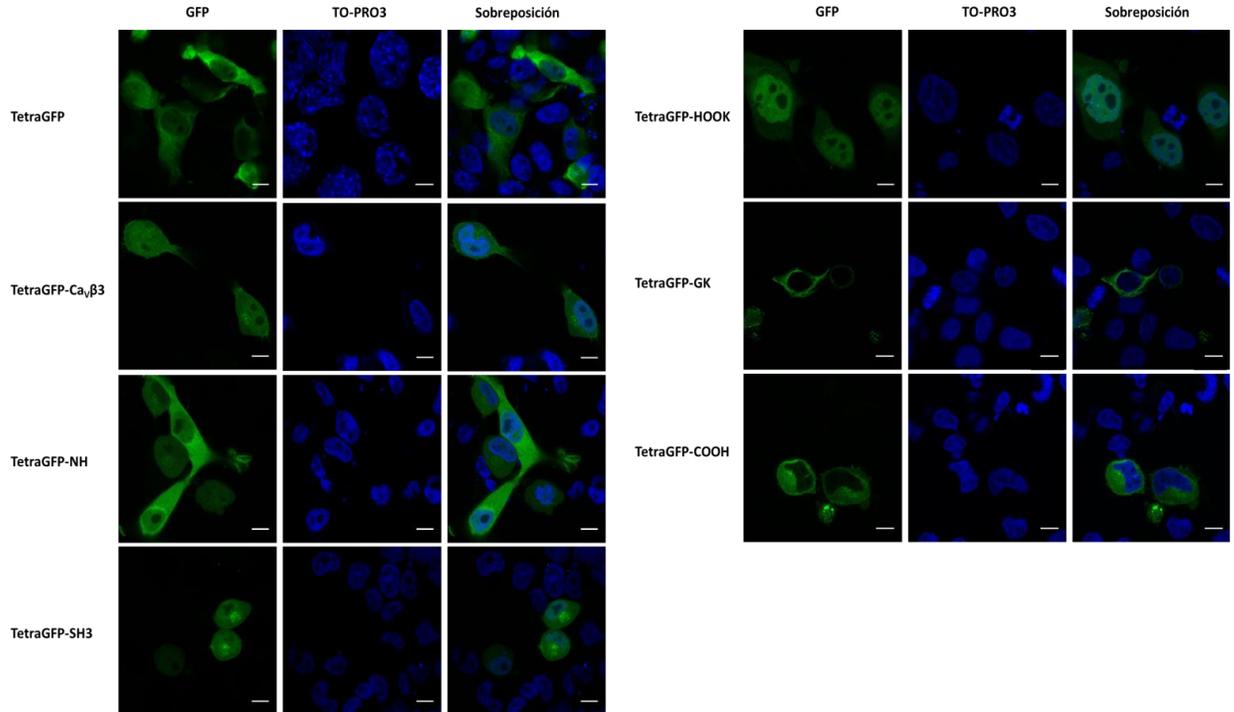


Figura 6. Expresión heteróloga de los dominios de Cav β 3 fusionados al vector reportero pTetraGFP. Los paneles muestran imágenes de las células HeLa transfectadas transitoriamente con las construcciones indicadas. Los núcleos se tiñeron con TO-PRO3. La localización subcelular del dominio GK fusionado al vector pTetraGFP tiene una ubicación exclusivamente citoplasmática que es consistente con la presencia de secuencias NES. El dominio COOH terminal está presente principalmente en el citoplasma, aunque se logra también apreciar en el núcleo celular. La escala corresponde a 10 μ m. (Castillo, 2016).

2. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A la subunidad $\text{Ca}_v\beta 3$ se le atribuyen diferentes funciones dentro y fuera del complejo del canal de Ca^{2+} . Se sabe también que esta proteína posee distintos dominios que tienen la capacidad de interactuar con otras proteínas y formar complejos proteicos que pueden hacer que la proteína se encuentre en el núcleo celular. Una de las preguntas más intrigantes que surge de su localización nuclear es qué función pudiera estar cumpliendo en ese compartimento celular. Actualmente, poco se sabe de las acciones de las subunidades $\text{Ca}_v\beta$ sobre la expresión génica y su regulación. Por otro lado, el mecanismo de su ingreso al núcleo también se desconoce. Este trabajo forma parte de un esfuerzo de investigación a largo plazo por encontrar posibles respuestas a estas interrogantes. En particular, aquí se plantea investigar el mecanismo molecular del ciclo de transporte nuclear de la subunidad $\text{Ca}_v\beta 3$.

3. HIPÓTESIS

La subunidad auxiliar $\beta 3$ de los canales Ca_v cuenta con señales funcionales de importe y exporte que permiten su tránsito hacia dentro y fuera del núcleo celular.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el mecanismo molecular del ciclo de transporte nuclear de la subunidad auxiliar $\text{Ca}_v\beta 3$ de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Bloquear el importe nuclear de $\text{Ca}_v\beta 3$ empleando Ivermectina.
2. Realizar mutaciones sitio-dirigidas para eliminar la NLS bipartita y la NES posiblemente presentes en $\text{Ca}_v\beta 3$.
3. Secuenciar las mutaciones realizadas en $\text{Ca}_v\beta 3$.
4. Estudiar la expresión de las construcciones mutantes de $\text{Ca}_v\beta 3$ en la línea celular HeLa.
5. Estudiar el ciclo de transporte nuclear de $\text{Ca}_v\beta 3$ endógena en células N1E-115.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental que se siguió para dar respuesta a la pregunta de investigación planteada en el presente trabajo de tesis se divide en dos etapas. La primera etapa consistió en realizar ensayos de inhibición del importe nuclear de $\text{Ca}_v\beta 3$ expresada tanto endógenamente en células N1E-115, como heterológamente en células HeLa. Los ensayos de inhibición se realizaron al incubar las células con ivermectina, una lactona macrocíclica producida por la actinobacteria *Streptomyces avermitilis*, que actúa como un inhibidor específico para la vía clásica de importe nuclear dependiente de α/β importinas. Posteriormente, a través de inmunocitoquímica se determinó la localización subcelular de $\text{Ca}_v\beta 3$. En la segunda etapa, se procedió a eliminar las posibles NLS y NES de $\text{Ca}_v\beta 3$ por medio de ensayos de mutagénesis sitio dirigida, para luego transfectar las construcciones correspondientes en células HeLa y analizar su localización subcelular mediante microscopía confocal.

5.1 Cultivo celular y transfección

Las líneas celulares HeLa y N1E-115 que se emplearon como modelos experimentales se adquirieron de la colección norteamericana de cultivos celulares (ATCC, por sus siglas en inglés). La línea celular HeLa se deriva de un adenocarcinoma de cuello uterino humano y posee toda la maquinaria de transporte nuclear, además de mostrar una alta expresión de NPCs que permite

el paso de las proteínas hacia el núcleo. La línea celular N1E-115 se deriva de neuroblastoma murino y se utilizó por su capacidad de expresar Cav β 3 de forma endógena.

La línea N1E-115 se propagó en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco suplementado con 25 mM de glucosa (DMEM-HG), 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/L de penicilina y 100 μ g/L de estreptomina. Por otro lado, la línea celular HeLa, se propagó en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco suplementado con 25 mM de glucosa (DMEM-HG), 5% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/L de penicilina y 100 μ g/L de estreptomina y 1 mM de Piruvato de sodio. Las células se mantuvieron en cajas de cultivo de 60 mm de diámetro a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂ y 80% de humedad relativa. El subcultivo celular se realizó una vez por semana para ambas líneas celulares empleando tripsina-EDTA para la dispersión celular.

La transfección transitoria se realizó empleando polietilamina (PEI), un polímero catiónico que contiene un nitrógeno por subunidad de monómero que favorece la formación de complejos con el ADN al interactuar con los grupos fosfatos. Los complejos formados son endocitados por las células, liberando el ADN en el citoplasma (Reed *et al.*, 2006). Las clonas de ADN utilizadas fueron Cav β 3-GFP, Cav β 3-mNES, Cav β -mNLS1, Cav β 3-mNLS2, Cav β 3-m2MUT.

Las células HeLa se sembraron en cubreobjetos estériles pretratados con poli-L-lisina (0.05%) por 24 h antes de la transfección en cajas de cultivo de 35 mm de diámetro a una confluencia del 60-70%. Previo a la transfección, se preparó una mezcla que contenía 300 μ l de medio D-MEM sin suplementar, 15 μ l de PEI (1 μ g/ μ l) y 2.5 μ g del ADNc de interés, y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, el complejo (PEI-ADN) se agregó a las células por goteo en presencia de 1 ml de medio de cultivo sin suplementar; las células se incubaron durante 30 min a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂. Posteriormente se agregaron 700 μ l de medio D-MEM sin antibióticos y las células se regresaron a la incubadora por 6 h tiempo al que se reemplazó el medio de cultivo por 2 ml de medio suplementado. El análisis de la localización subcelular de las proteínas codificadas por cada una de las construcciones se realizó 48 h después de la transfección.

5.2 Mutagénesis sitio-dirigida

Las mutaciones se realizaron empleando el paquete comercial *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis* (Aligent) de acuerdo con las indicaciones del proveedor. La generación de las mutaciones se lleva a cabo en dos pasos, i) síntesis de las hebras con las mutaciones, y ii) digestión del ADN parental. Los *primers* empleados para realizar las mutantes se diseñaron con el programa *QuikChange Primer Design* (Tabla 1).

Tabla 1. *Primers* empleados para generar las construcciones mutantes en las posibles señales de importe y exporte nuclear identificadas *in silico* en la subunidad Cav β 3.

	Sentido	Antisentido
NES	5'-CCAAATCCCTGCAGCAAGTGGTGTGGATGC-3'	5'-GCATCCAACACCACTTGCTGCAGGGATTTGG-3'
NLS1	5'-GCTCAAACAGGAACAGTCCGGGAACCTTCCA-3'	5'-TGGAAGGGTTCCCGGACTGTTCTGTTTGGAGC-3'
NLS2	5'-CCTCCATCTCTAGCCCAGGGGAACATGTC-3'	5'-GACATGTTCCCGCTGGGCTAGAGATGGAGG-3'

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para la amplificación de las construcciones antes mencionadas se realizó bajo las siguientes condiciones: 5 μ L de *buffer* de reacción (10X), 150 ng de ADN molde, 125 ng de *primer* sentido, 125 ng de *primer* antisentido, 1 μ L de la mezcla de dNTP y 3 μ L de *Quik solution*. Asimismo, se usaron 1 μ L de ADN polimerasa (2.5 U/ μ L) y 27 μ L de agua inyectable para obtener un volumen final de 50 μ L. La amplificación se llevó a cabo empleando un termociclador de PCR (Thermo Scientific) con un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 1 min; el alineamiento de nucleótidos se realizó en 18 ciclos con variaciones de temperatura de la siguiente manera, 95°C durante 50 s, 60°C por 50 s, 68°C por 8 min, y un ciclo a 68°C durante 7 min. Al finalizar, se agregó 1 μ L de *Dnp I* (10 U/ μ L) y se incubó a 37°C durante 1 h.

Por otro lado, el procedimiento de transformación de las bacterias con los plásmidos amplificados se llevó a cabo empleando el siguiente protocolo. Las bacterias competentes *Top 10* se colocaron en hielo y se agregaron 10 μL de la reacción de mutación y se incubaron por 30 min. Luego se incubaron a 42°C por 2 min; transcurrido este tiempo las células se incubaron primero en hielo por 2 min y posteriormente en 800 μL medio Luria Bertani (LB) por 1 h a 37°C, en agitación constante. Finalmente, se tomaron 200 μL de la mezcla y se sembraron en cajas de agar LB con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y se incubaron a 37°C durante 16 h. Las colonias obtenidas se sembraron en 300 μL de medio LB con ampicilina y se incubaron a 37°C en agitación constante durante 16 h.

La extracción del plásmido se realizó mediante el uso del paquete comercial *HiPure Plasmid Miniprep* (Thermo Scientific) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. En primer lugar, las células se empaquetaron por centrifugación a máxima velocidad por 1 min. Posteriormente se procedió a agregar 250 μL de *buffer* de resuspensión con RNAsa y se mezcló hasta obtener una solución homogénea y luego se agregaron 250 μL de *buffer* de lisis. La suspensión se mezcló por inversión 5 veces, y se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 350 μL de *buffer* de precipitación y se mezcló nuevamente por inversión hasta que se obtuvo una solución homogénea. A continuación, se procedió a centrifugar a 12000 *g* durante 10 min, y el sobrenadante obtenido se transfirió a una

columna con su respectivo tubo de recolección, procediéndose a centrifugar nuevamente a 12000 *g* por 1 min. La solución del tubo se desechó y se agregaron 700 μ L de *buffer* de lavado con etanol a la columna, la cual se lleva a un tubo de recuperación de 1.5 mL, se agregan 75 μ L de *buffer* TE y se incuba a temperatura ambiente por 1 min. Finalizado el tiempo de incubación la columna y el tubo de recolección se someten a centrifugación a 12000 *g* por 2 min, para recuperar el plásmido de ADN purificado. Una vez purificado el ADN se procedió a realizar su secuenciación automática en el laboratorio de Ácidos Nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav.

5.3 Inmunofluorescencia

Para estudiar la distribución subcelular de Cav β 3 y sus construcciones mutantes, las células HeLa se transfectaron como se detalló en la sección 5.2. Brevemente, 48 h después de la transfección, las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min, se lavaron nuevamente y se permeabilizaron con PBS-Tritón al 0.2% durante 5 min. Para visualizar los núcleos, las células se incubaron con TO-PRO3 (1 μ M) por 1 h en cámara húmeda. Finalmente, las muestras se lavaron con PBS y se procedió a su montaje empleando VECTASHIELD y se observaron mediante microscopía confocal.

La línea celular N1E-115 se empleó para documentar la expresión endógena de Cav β 3 y corroborar si el transporte nuclear se inhibe de manera efectiva con el tratamiento de ivermectina. En este caso, las células se sembraron en cubreobjetos tratados con poli-L-lisina y 24 h después se sometieron a tratamiento con 25 mM de ivermectina durante 6 h a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂. Finalizada la incubación, las células se lavaron con PBS, y posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, las células N1E-115 se lavaron con PBS tres veces y se permeabilizaron con PBS-Tritón al 0.2% por 5 min a temperatura ambiente. Para bloquear la unión específica de los anticuerpos, las células se incubaron 30 min a temperatura ambiente con la solución amortiguadora de fosfatos (PBS) suplementada con 2% de suero fetal bovino (SFB), 1% de albúmina sérica bovina (BSA), 0.1% de gelatina de piel de pescado y Tritón X-100 al 0.1%. Luego de la incubación se realizaron 2 lavados con PBS y las células se incubaron con un anticuerpo primario contra Cav β 3 (1:50; Santa Cruz) durante 16 h en cámara húmeda a 4°C. Finalizado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con PBS, para luego incubar con un anticuerpo secundario anti-ratón (1:100) acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. A continuación, las células se lavaron 2 veces con PBS y se procedió a realizar la tinción de núcleos con Hoechst (10mg/mL; 1:2000), para lo cual se incubó 5

min a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó un nuevo lavado con PBS y se procedió a realizar montaje con Vectashield. Las muestras se observaron por medio de microscopia de epifluorescencia (Nikon eclipse 80i) y microscopia confocal (Leica TCS SP8, Alemania).

5.4 Fraccionamiento celular

Las células HeLa se cosecharon por dispersión mecánica y se centrifugaron a 500 *g* por 5 min. La pastilla celular se resuspendió en PBS y se volvió a centrifugar. El fraccionamiento celular se realizó empleando el paquete comercial para fraccionamiento subcelular de proteínas en cultivo celular (Thermo Scientific). Brevemente, la pastilla obtenida se resuspendió con el *buffer* de extracción de citoplasma, se incubó a 4°C con agitación constante y se centrifugó a 500 *g* por 5 min. El sobrenadante colectado corresponde a la fracción citoplasmática. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en *buffer* de extracción de membrana, mezclando por 5 s y se incubó a 4°C en agitación y se volvió a centrifugar a 3000 *g* por 5 min. El sobrenadante corresponde a la fracción de membrana. La pastilla se resuspendió nuevamente con el *buffer* de extracción de núcleo, se incubó a 4°C por 30 min y se centrifugó a 5000 *g* por 5 min. El sobrenadante corresponde a la fracción de núcleo soluble. La pastilla obtenida se resuspendió nuevamente en *buffer*, CaCl₂ y nucleasa micrococcal, se mezcló y se incubó a 37°C; para luego someterse a centrifugación a 16000 *g* por 5 min. El sobrenadante corresponde a la fracción de extractos nucleares unidos

a cromatina. Finalmente, a la pastilla se agregó el *buffer* de extracción, se mezcló, se incubó a temperatura ambiente y se centrifugó a 16000 *g* por 5 min. El sobrenadante corresponde al extracto de citoesqueleto.

5.5 *Western blot*

Los extractos proteicos del lisado total y del fraccionamiento celular se analizaron por *Western blot* en condiciones reductoras y desnaturalizantes, empleando 25 μ g de proteínas mezcladas con el amortiguador Laemmli 1X (1.6% SDS, 0.1 M 2-mercaptoetanol, 5% glicerol, 0.083 M 4X Tris-Cl/SDS pH 6.8, 0.002% azul de bromofenol) y se incubaron a 100°C durante 5 min, para posteriormente separar las por electroforesis (*SDS-PAGE*) en un gel de poliacrilamida al 10% empleando un amortiguador de electroforesis con SDS (0.025 M Tris-base, 0.192 M glicina, 0.1% SDS). La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa (Hybond-N, GE Healthcare) se realizó empleando un amortiguador de transferencia (48 mM Tris-base, 39 mM glicina, 20% metanol) a 100 mA en cámara semi-seca (TE70X Hoefer) durante 1.5 h. Al finalizar la transferencia la membrana se tiñó con rojo de Ponceau y posteriormente se lavó con *buffer* TBS-T (10 mM Tris base pH 7.6, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20). Las membranas se bloquearon con leche sin grasa al 5% en TBS-T, se incubaron a 4°C toda la noche con los anticuerpos primarios anti-Cav β 3 (1:1000; Santa Cruz); GFP (1:1000; Sigma); Calnexina (1:2000; SantaCruz); gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH, 1:8000; Cell

Signaling); Histona 4 (1:1000; SantaCruz); y actina (1:200; proporcionado por el Dr. M. Hernández, Cinvestav), todos disueltos en TBS-T con leche al 5%.

Al finalizar la incubación, se realizaron lavados con TBS-T y las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) anti-ratón (1:5000) o anti-conejo (1:5000) también diluidos en TBS-T. Finalizado el tiempo de incubación, las membranas se lavaron nuevamente con TBS-T y se procedió al revelado de las proteínas de interés empleando el reactivo *Inmobilon Western* (Millipore) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las señales de quimioluminiscencia se detectaron con el equipo Odyssey (LI-COR).

5.6 Inhibición del importe nuclear

La ivermectina es un antibiótico usado en la clínica que además de sus propiedades antiparasitarias, ha mostrado ser un inhibidor específico del transporte nuclear dependiente de α/β importinas. El transporte nuclear mediado por otros mecanismos, o por solo β importinas aparentemente no se ve afectado por el tratamiento con ivermectina. Se ha propuesto que el mecanismo de acción de la ivermectina incluye un impedimento de la interacción de las proteínas cargo con el dímero de α/β de las importinas, probablemente al unirse al surco de unión de la NLS (Wagstaff *et al.*, 2012).

En nuestros experimentos, para evaluar si el transporte nuclear se encontraba mediado por importinas, las células se sembraron en cubreobjetos pretratados con poli-L-lisina y 24 h después se transfectaron con Cav β 3 como se indicó en la sección 5.1. Veinticuatro h después de la transfección, las células se sometieron a tratamiento con 25 mM de ivermectina y se incubaron por 6 h a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂. Luego se procedió a realizar montaje con Vectashield y posterior análisis por microscopia confocal.

6. RESULTADOS

6.1 Localización nuclear de Cav β 3

Estudios previos del laboratorio mostraron la localización de Cav β 3 en el núcleo celular por microscopia confocal, para corroborar dicha localización, se realizó un fraccionamiento celular con los extractos proteicos solubles de células HeLa previamente transfectadas con el plásmido que codifica para la proteína Cav β 3-GFP para obtener las siguientes fracciones: citoplasma (C), membrana plasmática (M), núcleo soluble (SN), núcleo unidos a cromatina (CBN) y citoesqueleto (Cs). Como control del fraccionamiento celular, se identificó por *Western blot* proteínas residentes de cada fracción (Fig. 7); el análisis mostro que los extractos de citoplasma contenían GAPDH, aunque tuvo una banda más tenue en la fracción membranal. Calnexina fue identificada solo en los extractos de membrana, mientras que SP1 solo fue detectado en la fracción de los extractos solubles de núcleo; la histona fue detectada en los extractos de núcleo unidos a cromatina, con una detección leve en la fracción del citoesqueleto. Estos resultados indican que nuestro fraccionamiento celular permite separar eficiente la fracción citoplasmática de la del núcleo soluble (SN), núcleo unidos a cromatina (CBN) y citoesqueleto (Cs). Aún más importante que la fracción del núcleo soluble no está contaminada con ninguna de las otras fracciones.

El uso del fraccionamiento celular mencionado arriba, nos permitió detectar claramente una banda proteica correspondiente a $\text{Ca}_v\beta 3\text{-GFP}$ en las fracciones de membrana, citoplasma, núcleo soluble. Mientras que la misma banda fue detectada ligeramente en las fracciones (CBN) y (Cs). Este resultado demuestra que $\text{Ca}_v\beta 3$ se encuentra preferentemente en citoplasma y membrana, además, es posible localizarla en las fracciones nucleares, lo que sugiere un posible mecanismo de importe al núcleo.

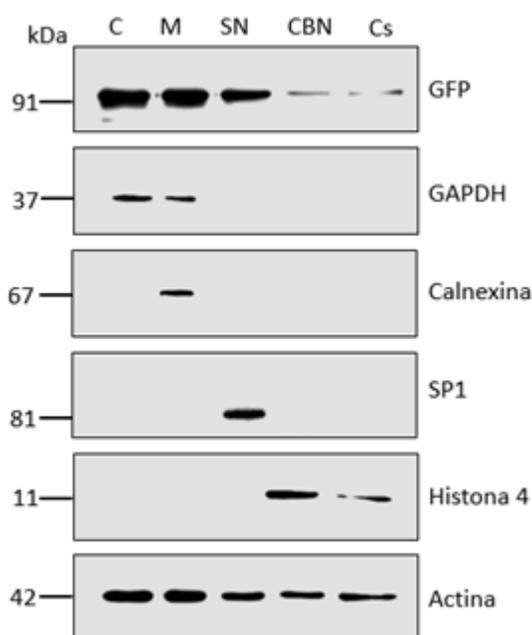


Figura 7. Localización de $\text{Ca}_v\beta 3$ en las diferentes fracciones celulares. Se prepararon fracciones de citoplasma (C), membrana plasmática (M), núcleo soluble (SN), núcleo unidos a cromatina (CBN) y citoesqueleto (Cs) de células HeLa transfectadas con $\text{Ca}_v\beta 3\text{-GFP}$ y se sometieron a análisis por *Western blot* usando los anticuerpos listados a la derecha. La señal de actina se usó como control.

6.2 Inhibición del transporte nuclear de Cav β 3

Debido a que las NLS clásicas median el transporte de las proteínas al ser reconocidas por las importinas, al inhibir esta vía se podría determinar si efectivamente las NLS de Cav β 3 son de tipo clásico y funcional. Para ello se diseñó un ensayo de inhibición del transporte nuclear usando ivermectina. Como control positivo de la inhibición del importe nuclear, las células HeLa se transfectaron con la construcción pTetraGFP-NLS-SV-40, que contiene la señal de localización nuclear del virus SV-40 unida a cuatro moléculas de GFP, la cual asegura que el peso del complejo supere los 40 kDal para que pueda ser transportado mediante el sistema clásico de las importinas. Las células fueron visualizadas mediante microscopia confocal, donde se observa en la condición control (25 μ L de DMSO) que el complejo pTetraGFP-NLS-SV-40 se encuentra localizado primordialmente en el núcleo celular (Fig. 8; panel superior). Sin embargo, después del tratamiento con ivermectina (25 mM) se observa una mayor presencia de dicho complejo en la fracción citoplasmática (Fig. 8; panel inferior). Esto demuestra que Ivermectina inhibe la translocación de la NLS de SV-40, y que puede ser empleado para identificar si el transporte de Cav β 3 esta mediado por la vía de transporte nuclear clásica.

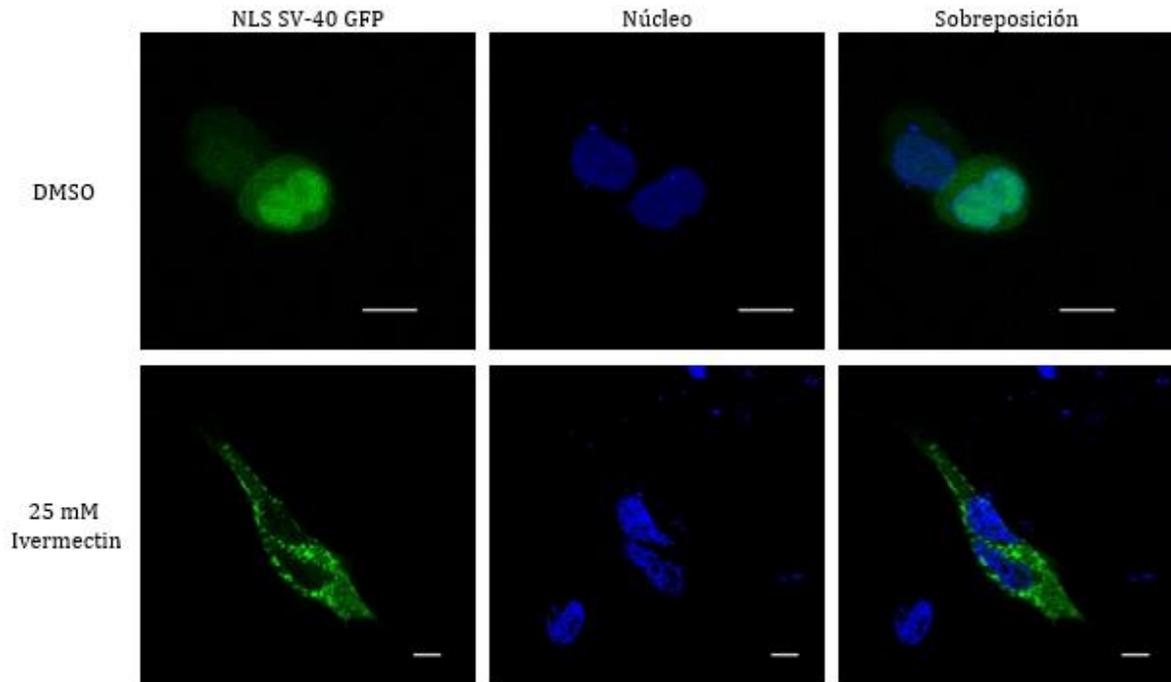


Figura 8. La ivermectina inhibe el transporte nuclear clásico. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa transfectadas con la construcción pTetraGFP-NLS-SV-40. En el canal verde se observa la señal de NLS SV-40 GFP, mientras que en el canal azul se observan los núcleos teñidos con Hoechst. En el panel superior se muestran las células control incubadas con el vehículo (DMSO) por 6 h. En el panel inferior se observan las células incubadas con 25 mM de ivermectina también por 6 h. Barra de escala: 10 μ m.

Posteriormente se realizó el ensayo de inhibición del importe nuclear en células transfectadas con la construcción que codifica para Cav β 3. En condiciones control (25 μ L DMSO) se observa una localización de Cav β 3 primordialmente nuclear (Fig. 9). Sin embargo, al incubar las células con el inhibidor del transporte clásico por 6 h (ivermectina 25mM) se observa una distribución de Cav β 3 principalmente en citoplasma, aunque existe una fracción de la proteína que aún se encuentra en núcleo. Este resultado sugiere que la

subunidad $Ca_v\beta 3$ puede estar empleando el sistema clásico de las importinas para ingresar al núcleo celular.

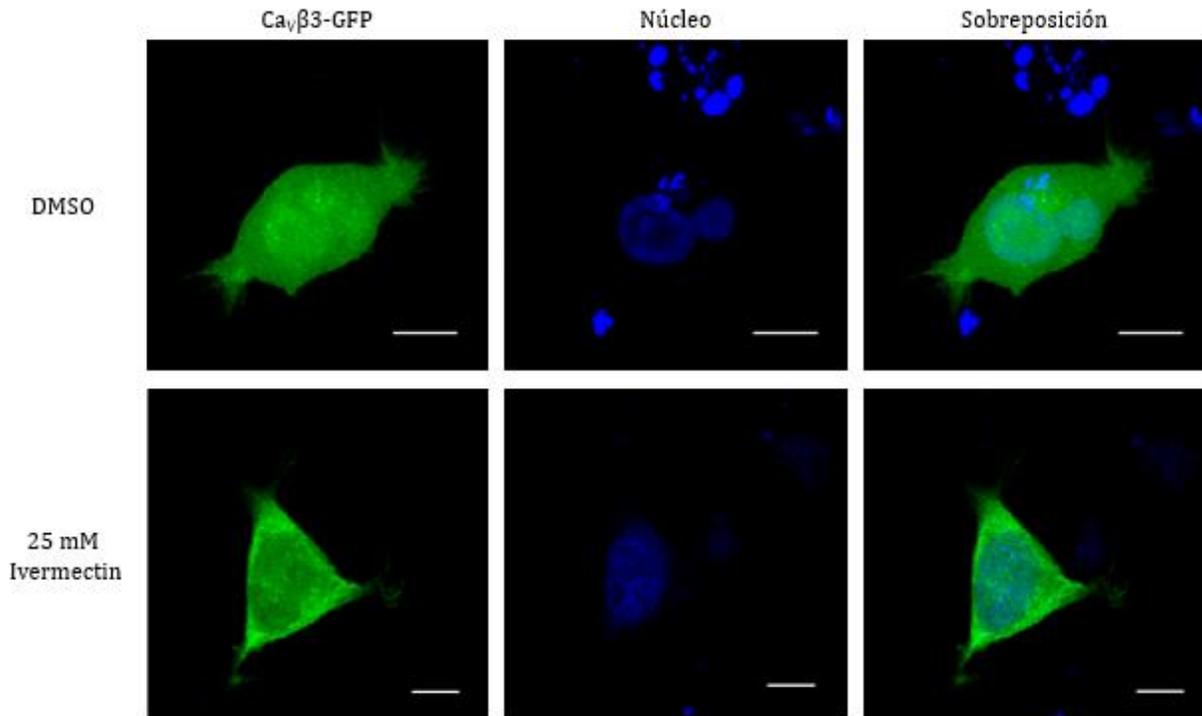


Figura 9. Ivermectina inhibe el importe nuclear de $Ca_v\beta 3$ -GFP. Imágenes de microscopia confocal de células HeLa transfectadas con la subunidad $Ca_v\beta 3$. En el canal verde se observa la expresión de $Ca_v\beta 3$ -GFP, mientras que en el canal azul se observan los núcleos teñidos con Hoechst. En el panel superior se muestran las células control incubadas con el vehículo (DMSO) por 6 h. En el panel inferior se observan las células incubadas con 25 mM de ivermectina por 6 h. La escala corresponde a 10 μ m.

6.3 Inhibición del transporte nuclear de $Ca_v\beta 3$ endógena

Para corroborar que la inhibición del importe nuclear de $Ca_v\beta 3$ ocurre en las células que expresan la proteína nativa, se realizaron ensayos de

inmunolocalización de Cav β 3 en células N1E-115, una línea celular de origen neuronal que expresa canales Cav de manera endógena. En estos ensayos, las células se incubaron con DMSO como vehículo para la situación control. Como se puede apreciar en el panel superior de la Fig. 10, una importante fracción de la proteína Cav β 3 se encuentra en el citoplasma, debido a que la línea celular N1E-115 expresa la subunidad principal α_1 de los Cav por la que la subunidad auxiliar Cav β 3 presenta gran afinidad. Sin embargo, una fracción de Cav β 3 también se observa en el núcleo celular, lo que sugiere que aún en presencia de Cav α_1 una fracción de Cav β 3 está disponible para trasladarse al núcleo celular.

En el panel inferior de la Fig. 10, se muestran las imágenes de las células tratadas con 25 mM de ivermectina por 6 h, en las cuales se observa que Cav β 3 se encuentra primordialmente en la fracción citoplasmática, debido a la inhibición de su importe al núcleo, dado que la proteína prácticamente no se encuentra en la fracción nuclear. Teniendo en cuenta que la ivermectina bloquea el importe nuclear de proteínas dependiente de α/β importinas conocida como la vía clásica, este resultado sugiere fuertemente que la subunidad Cav β 3 posee NLS clásicas que permiten su interacción con las importinas, permitiendo su localización en el núcleo celular.

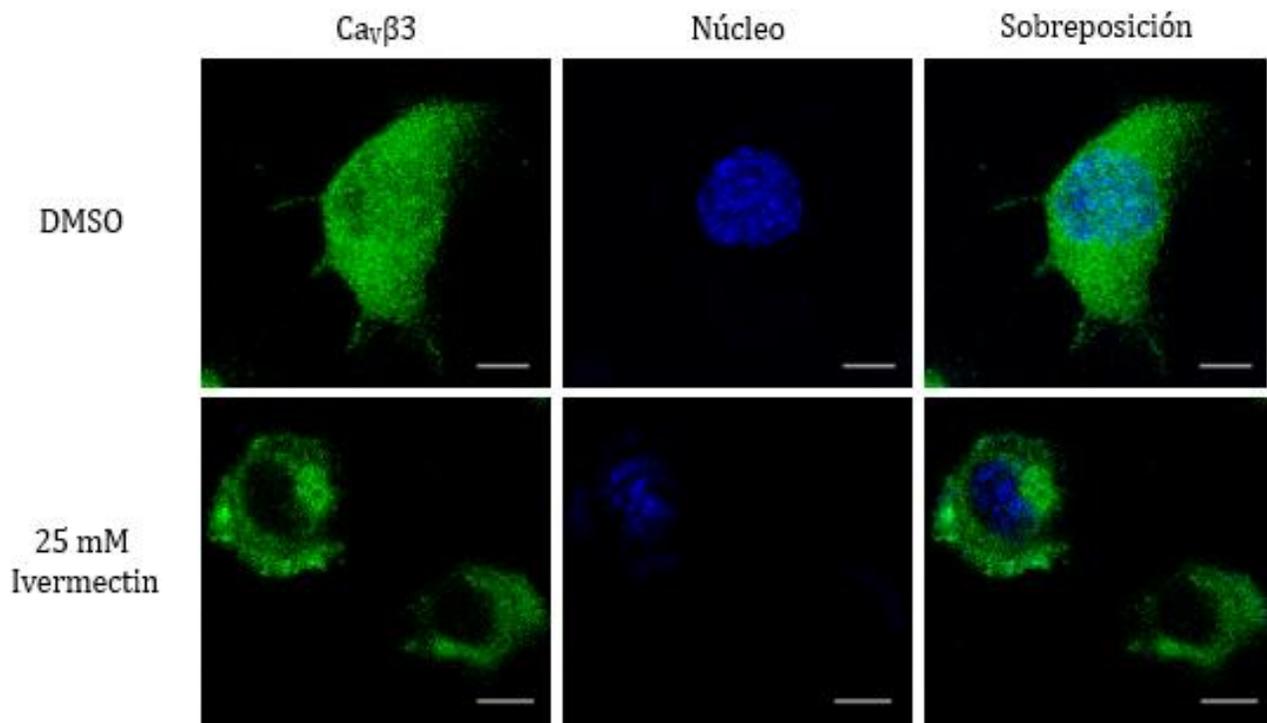


Figura 10. Ivermectina inhibe el importe nuclear de Ca_vβ3 endógena. Imágenes de microscopía confocal de células N1E-115. En el canal verde se observa la expresión de Ca_vβ3 endógena, mientras que en el canal azul se observan los núcleos teñidos con Hoechst. En el panel superior se muestran las células control incubadas con el vehículo (DMSO) por 6 h. En el panel inferior se observan las células incubadas con 25 mM de ivermectina por 6 h. La escala corresponde a 10 μm.

6.4 Mutagénesis sitio dirigida

Debido a que la vía de importe clásico de las proteínas se encuentra mediada por señales de localización nuclear, se decidió mutar las señales de importe y exporte nuclear en la secuencia de Cav β 3 previamente identificadas en el laboratorio mediante análisis bioinformático (Castillo, 2016), las mutaciones fueron realizadas como se explicó en la sección 5.2. Ya que las señales de exporte nuclear tienen como característica principal poseer repetidos ricos en leucinas, en la secuencia de la NES identificada se localizaron estos aminoácidos y se decidió sustituir el residuo localizado en la posición 266 por glutamina. En el panel superior de la Fig. 11 se observa el alineamiento de nucleótidos donde se demuestra el cambio de una timina por una adenina en la secuencia de ADN, cuyo codón al ser traducido tendrá como producto una glutamina. Las señales de localización nuclear por su parte se encuentran conformadas por aminoácidos básicos. En este caso al ser una señal bipartita, se decidió no realizar una sustitución puntual sino eliminar cada uno de los segmentos que conforman la NLS. (Fig. 11; paneles medio e inferior).

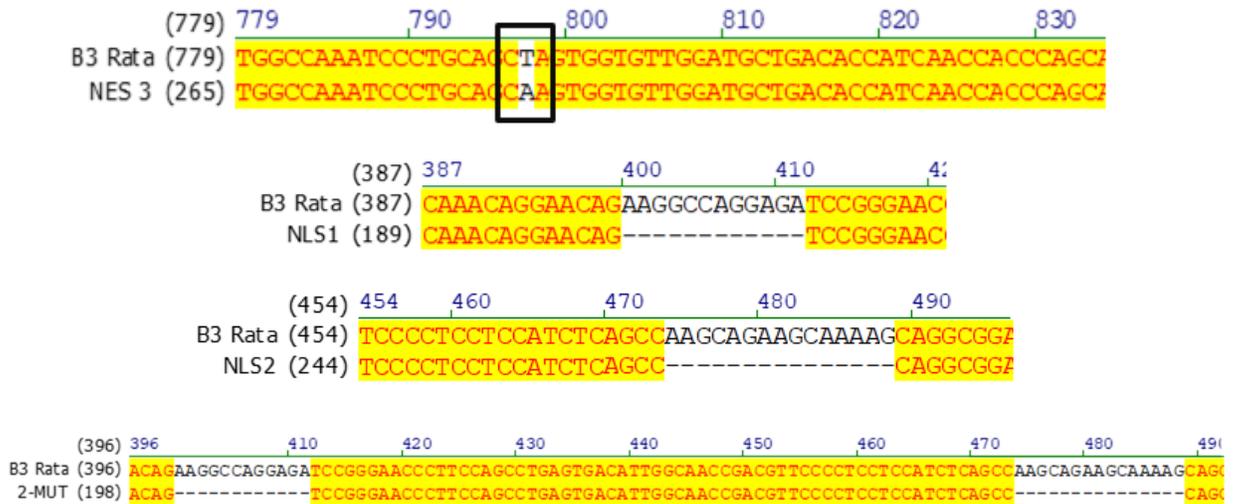


Figura 11. Mutaciones en las señales de exporte e importe nuclear de $Ca_v\beta_3$. En el panel superior se muestra el alineamiento de las secuencias de la subunidad $Ca_v\beta_3$ silvestre y su mutante en NES ($Ca_v\beta_3$ -mNES). El cambio de base de interés se resalta en el recuadro negro. Los dos alineamientos en el panel medio corresponden a las secuencias de $Ca_v\beta_3$ silvestre y sus mutantes en la NLS bipartita. En este caso, las secuencias en la NLS se mutaron por separado y en ellas se eliminaron las 12 y 15 bases que las constituyen ($Ca_v\beta_3$ -mNLS1 y $Ca_v\beta_3$ -mNLS2). El panel inferior muestra el alineamiento de la secuencia de $Ca_v\beta_3$ silvestre y la construcción mutante de la NLS en que se eliminaron en conjunto ambos segmentos que forman la NLS bipartita ($Ca_v\beta_3$ -m2mut).

Luego de obtener las construcciones, células HeLa fueron transfectadas para comprobar su correcta expresión. Las células fueron lisadas 48 h post-transfección y los extractos solubles fueron analizados mediante *Western blot*. En la Fig. 12 se observa como control positivo en el primer carril $Ca_v\beta_3$ -GFP nativa, en el segundo carril se observa $Ca_v\beta_3$ mutada en la NES (β_3 mNES-GFP), y en los siguientes carriles $Ca_v\beta_3$ con sus mutaciones en NLS ($Ca_v\beta_3$ mNLS1-

GFP, Cav β 3mNLS2-GFP y en la que se eliminaron en conjunto ambos segmentos que forma la NLS bipartita (Cav β 3m2mut-GFP)), como control de carga se muestra actina. En los cinco carriles, se observa la señal para Cav β 3-GFP en el peso esperado (~90 kDa), sin embargo, solo la mutante Cav β 3mNLS1-GFP expresó niveles similares a la proteína nativa control. Este resultado demuestra que las construcciones fueron realizadas de forma correcta eliminando los fragmentos deseados, y que se expresan correctamente, aunque diferencialmente.

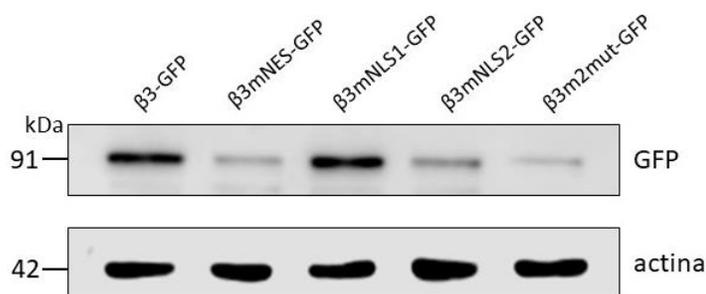


Figura 12. Expresión de Cav β 3 en células HeLa. Lisados de células HeLa transfectadas con Cav β 3-GFP, Cav β 3NES-GFP, Cav β 3NLS1-GFP, Cav β 3NLS2-GFP y Cav β 3m2mut-GFP se sometieron a análisis por *Western blot* usando los anticuerpos listados a la derecha. La señal de actina se usó como control.

6.5 Localización celular de Cav β 3 silvestre y sus mutantes de transporte nuclear

Posterior a la obtención de las mutantes de transporte nuclear (NES y NLS; Fig. 11), éstas se transfectaron en las células HeLa con la finalidad de estudiar la localización subcelular de Cav β 3. En la Fig. 13, se observa la localización de las subunidades Cav β 3 silvestre y mutantes (canal verde), los núcleos celulares teñidos con TO-PRO3 (canal rojo) y la sobreposición de las imágenes se muestra en amarillo.

Los resultados de este análisis muestran que cuando se expresa la subunidad silvestre, la proteína se observa tanto en el citoplasma como en el núcleo celular, lo que corrobora los estudios realizados previamente en el laboratorio (Castillo, 2016). En el caso de la mutante Cav β 3-mNES, se esperaba que al encontrarse modificada su señal de exporte la proteína se encontrase concentrada en el núcleo. Sin embargo, la imagen muestra que su distribución es muy similar al control, es decir que la mutante de la proteína se distribuye tanto en el núcleo como en el citoplasma. Por su parte, para el caso de las construcciones mutantes Cav β 3-mNLS1 y Cav β 3-mNLS2, se esperaba una distribución subcelular preferente citoplasmática, sin embargo, los resultados muestran que la proteína se encontró de manera abundante en el núcleo.

Estos resultados muestran que las mutaciones en la NES y NLS no afectan su tráfico núcleo-citoplasma-núcleo, lo que sugiere que estas señales no son funcionales.

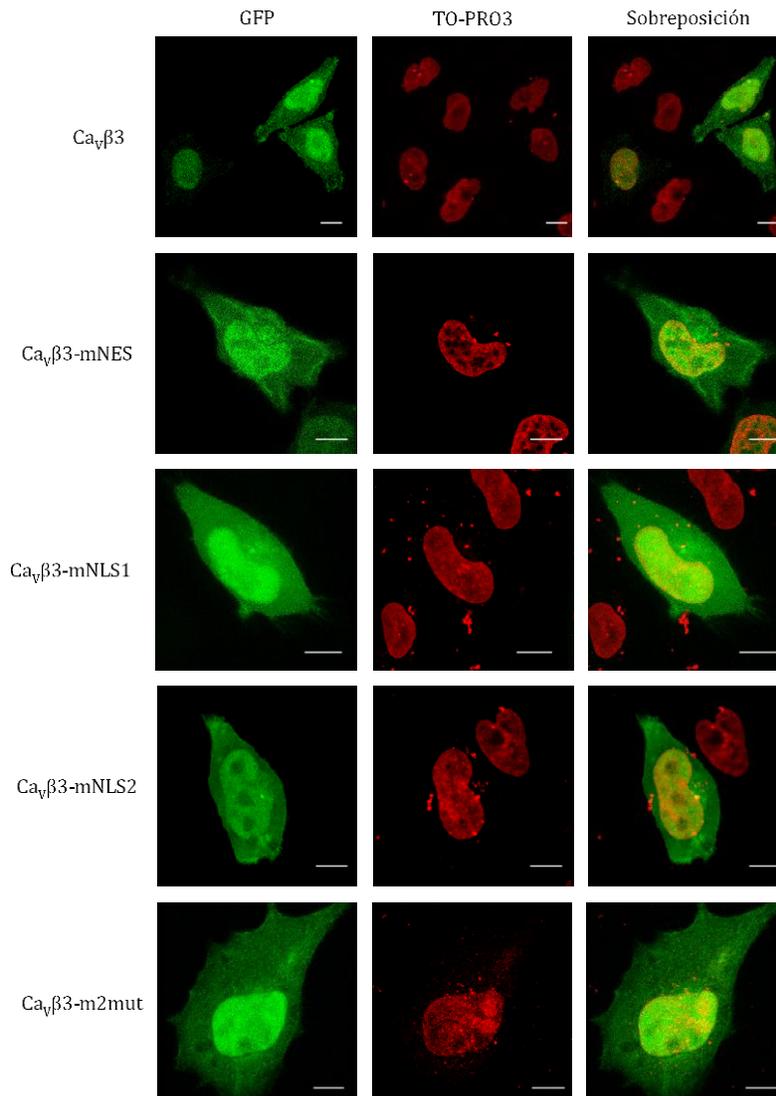


Figura 13. Localización subcelular de Ca_vβ3-GFP nativa y sus mutantes. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa transfectadas con Ca_vβ3 silvestre, Ca_vβ3-mNES, Ca_vβ3-mNLS1, Ca_vβ3-mNLSs2 y Ca_vβ3-m2mut. En verde se observa la señal que corresponde a Ca_vβ3 silvestre y sus construcciones mutantes según se indica, mientras que en rojo se observan los núcleos teñidos con TO-PRO3. La escala corresponde a 10 μm.

7 DISCUSIÓN

7.1 Comparación con estudios previos

Estudios previos han mostrado que algunas isoformas de Cav β pueden presentar además de su distribución citoplasmática típica, una distribución nuclear que sugiere su participación en la regulación de la expresión de determinados genes (Zhang *et al.*, 2010; 2015; Tadmouri *et al.*, 2012). Cav β está primordialmente asociada a los canales Cav en la membrana plasmática (Lacinová, 2005; Catterall, 2011; Felix *et al.*, 2013), sin embargo, bajo ciertas condiciones que aún no se conocen con precisión puede ser enviada al núcleo celular (Tadmouri *et al.*, 2012; Rima *et al.*, 2016).

Los datos aquí mostrados corroboran observaciones previas del laboratorio en relación con la localización subcelular de la subunidad Cav β 3, mostrando que en células N1E-115 que la expresan de forma endógena, una subpoblación de la proteína se localiza en la fracción nuclear. Esto mismo se observa cuando Cav β 3 se sobre-expresa heterológamente en células HeLa (Castillo, 2016). Por otro lado, el tratamiento de las células con ivermectina muestra el importe nuclear de Cav β 3 está mediado por una vía clásica, puesto que la proteína tanto sobre-expresada en células HeLa como endógenamente expresada en células N1E-115 se localizan primordialmente en la fracción citoplasmática con reducida localización nuclear. De manera interesante, a

pesar del tratamiento con el inhibidor del transporte nuclear clásico, una fracción de la proteína silvestre se logra observar en la fracción nuclear. La razón para esta discrepancia aún no se conoce, pero una posible explicación está en el hecho de que probablemente corresponde a una fracción de Cav β 3 ya se encontraba en el núcleo antes de someter a las células al tratamiento con ivermectina.

Por otro lado, trabajos previos de nuestro laboratorio empleando métodos bioinformáticos han identificado a presencia de posibles señales de importe y exporte nuclear tanto en el dominio HOOK como en el dominio GK (Castillo, 2016). A partir de estos datos, en el presente trabajo se procedió a realizar su eliminación mediante una estrategia de mutagénesis sitio-dirigida. Así, en la NES localizada en el dominio HOOK se realizó el cambio de un residuo de leucina por uno de glutamina, teniendo en cuenta que las NES se caracterizan por ser regiones ricas en leucinas.

Para el caso de la señal de exporte nuclear, se observó inesperadamente una distribución muy similar a la encontrada para la Cav β 3 silvestre, es decir una fracción de la proteína en núcleo y otra en el citoplasma. Dado que el remplazo de esta leucina aparentemente no elimina la funcionalidad de la NES, una perspectiva a corto plazo consiste en remplazar otras leucinas que se encuentran alrededor de la leucina modificada, o eliminar un fragmento de

aminoácidos más grande, incluyendo la leucina indicada por el análisis bioinformático.

Por su parte, tal y como se señaló previamente, la NLS presente en el dominio GK aparentemente tiene un carácter bipartita, lo que obligó a hacer eliminaciones más extensas en su secuencia. Primero se diseñaron dos mutaciones en las cuales se eliminaron cada una de las secuencias consenso de la NLS bipartita y posteriormente se generó una construcción que comprendía la eliminación de ambas partes de secuencia simultáneamente. Al estudiar las construcciones con las mutaciones en las señales de localización nuclear de la proteína Cav β 3 en células HeLa, se observó que al eliminar las secuencias que conforman la NLS bipartita de manera individual, aún se observaba Cav β 3 en el núcleo, sugiriendo que parte remanente de la NLS podía cumplir enteramente su función de direccionar la proteína hacia el núcleo. Por esta razón se decidió eliminar las dos secuencias NLS simultáneamente; sin embargo, aún con esta eliminación Cav β 3 se seguía observando en el núcleo. La explicación de este resultado inesperado aún no se conoce, pero los datos sugieren que la proteína podría contar con NLS adicionales aún no identificadas que pudieran estar favoreciendo su localización en el núcleo. Alternativamente y con base en los datos obtenidos en los experimentos de inhibición del transporte se puede proponer que, si bien el transporte de Cav β 3 se está llevando a cabo por la vía clásica, podría requerir de otras proteínas adaptadoras, que si contengan NLS

que pudieran estar interactuando a través de sus dominios funcionales con el complejo de α/β importinas, como se ha reportado previamente para Cav β 4 y la proteína B56 δ (Tadmouri *et al.*, 2012).

7.2 Posibles mecanismos alternativos de importe nuclear

Los hallazgos inesperados con las construcciones mutantes podrían estar relacionados con el hecho de que la proteína Cav β 3 tenga además del mecanismo de importe nuclear clásico, algún mecanismo no clásico, cuya naturaleza aún no se conoce y que de estar presente deberá ser motivo de estudios futuros. En ese sentido, conviene recordar que algunas proteínas cuentan con más de una vía de ingreso al núcleo, como es el caso de la β -catenina. Esta proteína que es el centro de la vía de señalización de Wnt, viaja al núcleo al activarse la vía. A la fecha se conocen dos posibles mecanismos independientes para su transporte al núcleo, uno de ellos es conocido como *piggy-back*, en el que β -catenina interactúa con el factor de transcripción LEF-1 que contiene una NLS, permitiendo así al complejo β -catenina/LEF-1 ingresar al núcleo (Wagstaff & Jans, 2009).

Una hipótesis que resulta atractiva entonces es que este mecanismo pudiera representar una vía alterna en la que Cav β 3 podría estar ingresando al núcleo a través del mecanismo de *piggy-back*. La Fig. 14 muestra una red de posibles interacciones de Cav β 3 reportadas experimentalmente, en la que se

observa de manera interesante que $\text{Ca}_v\beta 3$ puede interactuar con ZFY y EYA1, ambos factores de transcripción, que al ser analizados por el programa *NLStradamus* se muestra que cuentan con NLS.

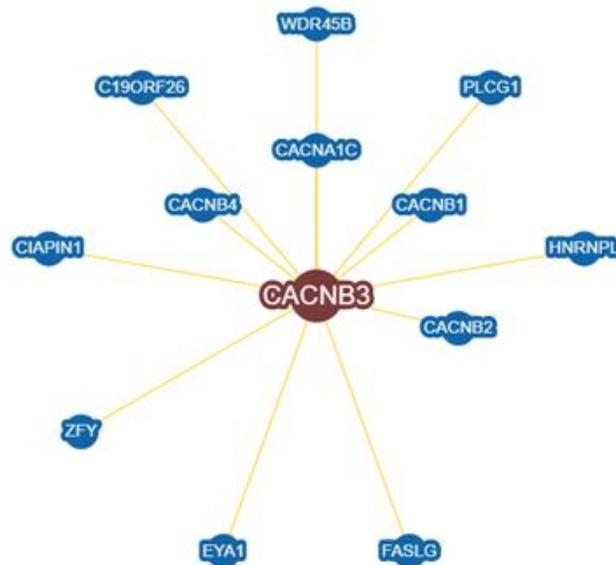


Figura 14. Esquema de posibles interacciones proteicas de $\text{Ca}_v\beta 3$. Las etiquetas azules muestran el nombre genes específicos que codifican para distintas proteínas, mientras que la línea amarilla corresponde a las interacciones probadas por evidencia experimental (BioGRID, 2018).

Por otro lado, Tadmouri y sus colaboradores (2012) realizaron ensayos de doble hibrido, en los cuales reportan que $\text{Ca}_v\beta 3$ interactúa con B56 δ , la subunidad regulatoria de la fosfatasa PP2A. Esta proteína en conjunto con un complejo proteico que incluye a $\text{Ca}_v\beta 4$ participa en la desfosforilación de histonas que inhibe la expresión del gen de la enzima tirosina hidroxilasa. De manera interesante, se ha reportado que B56 δ posee una NLS. Estos

antecedentes apoyan la idea de que el transporte de $Ca_v\beta_3$ al núcleo pudiera estar mediado por proteínas accesorias que contienen NLS dependientes de α - β importinas.

7.3 Perspectivas

Las funciones de las diversas isoformas de $Ca_v\beta$ independientes a su participación en la regulación de los canales Ca_v hasta el momento permanecen muy poco exploradas. Asimismo, la función que este tipo de proteínas cumplen en el núcleo, para el caso particular de $Ca_v\beta_3$, es desconocida. Tomando en consideración el posible mecanismo alternativo de importe nuclear de $Ca_v\beta$ en que se asocia con otra(s) proteína(s) que tiene(n) NLS, las perspectivas a corto plazo para este trabajo incluyen, emplear ensayos de inmunoprecipitación y espectrometría de masas, identificar las posibles interacciones de diferentes proteínas con las que $Ca_v\beta_3$ pudiera estar formando complejos y que puedan estar favoreciendo su localización en el núcleo celular, incluyendo su interacción con α/β importinas, para tratar de verificar si su importe al núcleo se encuentra mediado por una vía de importe clásico y/o por el mecanismo de *piggy-back*.

Las perspectivas a mediano plazo incluyen realizar experimentos con proteínas reporteras fusionadas a $Ca_v\beta_3$ para dilucidar si existen subpoblaciones de $Ca_v\beta_3$. Es decir, si las proteínas localizadas en citoplasma y

núcleo constituyen fracciones distintas de $Ca_v\beta 3$ o, por el contrario, es una misma subpoblación de la proteína que se encuentra a citoplasma y por algún estímulo o proceso celular es enviada al núcleo. Finalmente, las perspectivas a largo plazo incluyen identificar la función que $Ca_v\beta 3$ pudiera estar desarrollando en el núcleo, el cual podría o no estar ligado con la regulación de la expresión de genes.

8 REFERENCIAS

- Beck M, Hurt E. (2017) The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nature Rev* 18, 73-89
- Béguin P, Mahalakshmi RN, Nagashima K, Cher DH, Ikeda H, Yamada Y, Seino Y, Hunziker W. (2006) Nuclear sequestration of β -subunits by Rad and Rem is controlled by 14-3-3 and calmodulin and reveals a novel mechanism for Ca^{2+} channel regulation. *J Mol Biol* 355, 34-46.
- Béguin P, Nagashima K, Gonoï, Shibasaki T, Takahashi K, Kashima Y, Nobuaki O, Geering K, Iwanaga T, Seino S. (2001) Regulation of Ca^{2+} channel expression at the cell surface by the small G-protein kir/Gem. *Nature* 411, 701-706.
- Belkacemi A, Hui X, Wardas B, Laschke M, Wissenbach U, Menger M, Lipp P, Beck A, Flockerzi V. (2018) IP_3 receptor-dependent cytoplasmic Ca^{2+} signals are tightly controlled by Cav β 3. *Cell Rep* 22, 1339-1349.
- Bichet D, Cornet V, Geib S, Carlier E, Volsen S, Hoshi T, Mori Y, De Waard M. (2000) The I-II loop of the Ca^{2+} channel α_1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit. *Neuron* 25, 177-190.
- Buraei Z, Yang J. (2010) The β subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Physiol Rev* 90, 1461-1506.

- Castillo V. (2016) Transporte nuclear de la subunidad $\text{Ca}_v\beta 3$ de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Tesis de Maestría. Departamento de Biología Celular. Cinvestav.
- Catterall WA. (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003947
- Chen YH, Li MH, Zhang Y, He LL, Yamada Y, Fitzmaurice A, Shen Y, Zhang H, Tong L, Yang J. (2004) Structural basis of the α_1 - β subunit interaction of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Nature* 429, 675-680.
- De Waard M, Witcher DR, Pragnell M, Liu H, Campbell KP. (1995) Properties of the α_1 - β anchoring site in voltage-dependent Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 270, 12056-12064.
- De Waard M, Scott VE, Pragnell M, Campbell KP. (1996) Identification of critical amino acids involved in α_1 - β interaction in voltage-dependent Ca^{2+} channels. *FEBS Lett* 380, 272-276.
- Dolphin A. (2003) β subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomemb* 35, 599-620
- Fang K, Colecraft HM. (2011) Mechanism of auxiliary β -subunit-mediated membrane targeting of L-type ($\text{Ca}_v1.2$) channels. *J Physiol* 589(Pt 18), 4437-4455.
- Fahrenkrog B. (2006) The nuclear pore complex, nuclear transport, and apoptosis. *Can J Physiol Pharmacol* 84, 279-286.

- Felix R, Calderon-Rivera A, Andrade A. (2013) Regulation of high-voltage-activated Ca²⁺ channel function, trafficking, and membrane stability by auxiliary subunits. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 2, 207-220.
- Freise D, Himmerkus N, Schroth G, Trost C, Weibgerber P, Freichel M, Flockerzi V. (1999) Mutations of calcium channel β subunits genes in mice. *Biol Chem* 380, 897-902
- Fu X, Liang C, Li F, Wang L, Wu X, Lu A, Xiao G, Zhang G. (2018) The rules and functions of nucleocytoplasmic shuttling proteins. *Int J Mol Sci* 1445 *Review*. 12-19.
- Gandini MA, Sandoval A, Felix R. (2014) Patch-clamp recording of voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *Cold Spring Harb Protoc* 2014, 329-325.
- Kim YH, Han ME, Oh SO. (2017) The molecular mechanism for nuclear transport and its application. *Anat Cell Biol* 50, 77-85.
- Lacinová L. (2005) Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 (Suppl 1), 1-78.
- Lange A, Mills R, Lange C, Stewart M, Devine S, Corbett A. (2007) Classical nuclear localization signals: definition, function and interaction with importin α . *J Biol Chem* 282, 5101-5105.
- Lee BJ, Cansizoglu AE, Süel KE, Louis TH, Zhang Z, Chook YM. (2006) Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin β 2. *Cell* 126, 543-558.

- Marambaud P, Dreses-Werringloer U, Vingtdoux V. (2009) Calcium signaling in neurodegeneration. *Mol Neurodegener* 4, 20.
- Reed S, Staley E, Mayginnes J, Pintel D, Tullis G. (2006) Transfection of mammalian cells using linear polyehylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol Meth* 138, 85-98.
- Reichhart N, Milenkovic V, Halsband C-A, Cordeiro S, Strau O. (2010) Effect of bestrophin-1 on L-type Ca²⁺ channel activity depends on the Ca²⁺ channel β -subunit. *Exp Eye Res* 91, 630-639
- Rima M, Daghsni M, Fajloun Z, M'rad R, Bruses J, Ronjat M, De Waard M (2016). Protein partners of the calcium channel β subunit highlight new cellular functions. *Biochem J* 473, 1831-1844.
- Rima M, Daghsni M, De Waard S, Gaborit N, Fajloun Z, Ronjat M, Mori Y, Bruses J, De Waard M. (2017a) The subunit of the voltage-gated calcium channel (*Cacnb4*) regulates the rate of cell proliferation in Chinese hamster ovary cells. *Int J Biochem Cell Biol* 89, 57-70.
- Rima M, Daghsni, Lopez A, Fajloun Z, Lefrancois L, Dunach M, Mori Y, Merle P, Brusés J, De Waard M, Ronjat M. (2017b) Down-regulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by *Cacnb4*. *Mol Biol Cell* 28, 3699-3708
- Sheridan D, Cheng W, Carbonneau L, Ahern C, Coronado R. (2004) Involvement of a heptad repeat in the carboxyl terminus of the dihydropyridine

- receptor β 1a subunit in the mechanism of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Biophys J* 87, 929-942.
- Simms B, Zamponi G. (2014) Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron* 82, 24-45.
- Soniat M, Chook Y. (2015) Nuclear localization signals for four distinct karyopherin- β nuclear import systems. *Biochem J* 468, 353-362.
- Sun Y, Xian L, Xing H, Yu J, Yang Z, Yang T, Yang L, Ding P. (2016) Factors influencing the nuclear targeting ability of nuclear localization signals. *J Drug Target* 24, 927-933.
- Tadmouri A, Kiyonaka S, Barbado M, Rousset M, Fablet K, Sawamura S, Bahembera E, Pernet-Gallay K, Arnoult C, Miki T, Sadoul K, Gory-Faure S, Lambrecht C, Lesage F, Akiyama S, Khochbin S, Baulande S, Janssens V, Andrieux A, Dolmetsch R, Ronjat M, Mori Y, De Waard M. (2012) *Cacnb4* directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *EMBO J* 31, 3730-3744.
- Van Petegem F, Clark KA, Chatelain FC, Minor DL Jr. (2004) Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel β -subunit and an α -subunit domain. *Nature* 429, 671-675.
- Wagstaff K, Jans D. (2009) Importins and beyond: Non-conventional nuclear transport mechanisms. *Traffic* 10, 1188-1198

- Wagstaff K, Sivakumaran H, Heaton S, Harrich D, Jans D. (2012) Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem J* 443, 851-856.
- Waithe D, Ferron L, Page KM, Chaggar K, Dolphin AC. (2011) β -subunits promote the expression of Cav2.2 channels by reducing their proteasomal degradation. *J Biol Chem* 286, 9598-9611.
- Zhang Y, Yamada Y, Fan M, Bangaru SD, Lin B, Yang J. (2010) The β subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels interact with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6. *J Biol Chem* 285, 2527-2536.
- Zhang T, Taylor J, Jiang Y, Pereyra AS, Messi ML, Wang ZM, Hereñú C, Delbono O. (2015) Troponin T3 regulates nuclear localization of the calcium channel Cav β 1a subunit in skeletal muscle. *Exp Cell Res* 336, 276-286.
- Zou S, Smita J, Kim EY, Dryer S. (2008) The β 1 subunit of L-Type voltage-gated Ca²⁺ channels independently binds to and inhibits the gating of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Mol Pharmacol* 73, 369-378.