



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

UNIDAD ZACATENCO  
Departamento de Biología Celular

Regulación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral de activación (HVA)  
por el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS)

TESIS

Que presenta

**M. en C. Lizbeth Grimaldo Quezada**

Para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

En la especialidad de

**Biología Celular**

Director de Tesis:

**Dr. Ricardo Félix Grijalva**

Ciudad de México

Febrero, 2018

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (Conacyt) por el apoyo financiero brindado a través de una beca académica para realizar mi Doctorado en ciencias.

Al Departamento de Biología Celular del Cinvestav, por haberme aceptado en su programa de Doctorado en Ciencias y a los doctores del mismo que participaron en el desarrollo de mi proyecto.

A mi tutor el Dr. Ricardo Félix, por aceptarme en su laboratorio y guiarme durante mi trabajo de tesis doctoral, agradezco su apoyo.

Al Dr. Alejandro Sandoval Romero, agradezco profundamente tu tiempo y esfuerzo en nuestro proyecto. Sin tu ayuda hubiera sido impensable lograrlo. Tienes mi admiración y gratitud por siempre Alex.

A la bióloga Mercedes Concepción Urbán Nuñez por su excelente ayuda técnica.

A todos mis compañeros de laboratorio por sus valiosas aportaciones en este trabajo.

A la Dra. Liliana Gómez Flores, tu ayuda y apoyo incondicional hicieron que no me rindiera. A ti no solo te agradezco, te dedico mi trabajo. Te admiro en todos los aspectos, eres una investigadora, pero sobre todo admiro tu calidad humana. Tú eres de esas personas que se encuentran una sola vez en la vida.

A la Dra. Alejandra Ordoñez, agradezco el tiempo que compartimos como estudiantes ya que pude conocer a la valiosa persona que eres y que seguirá en mi vida.

Al Dr. Edgar Garza López, por creer en mí, por ayudarme a seguir trabajando y sacar adelante mi proyecto. Nunca lo olvidare.

## Contenido

Prefacio	6
<b>Resumen</b>	8
<b><i>Abstract</i></b>	9
<b>Introducción</b>	10
Clasificación funcional de los canales de Ca <sup>2+</sup> dependientes de voltaje	10
Canales de Cav2.2 (tipo N): diversidad estructural y funcional	16
El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y la familia de enzimas E3 ubiquitina ligasas	18
Regulación de los canales dependientes de voltaje (Cav) por el UPS	21
Regulación de los canales de Ca <sup>2+</sup> tipo N mediante el complejo LC1-UBE2L3	24
Planteamiento del problema e hipótesis de trabajo	27
<b>Objetivo general</b>	29
<b>Objetivos particulares</b>	29
<b>Materiales y métodos</b>	30
Cultivo celular (HEK-293)	30
Transfección transitoria	31
Cultivo de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD)	31
Extracción de proteínas y <i>Western blot</i>	32
Anticuerpos	33

Ensayos de co-inmunoprecipitación	34
Silenciamiento con ARN pequeños de interferencia (siRNAs)	35
Ensayos de biotilación	36
Electrofisiología	36
Análisis de los datos	37
<b>Resultados</b>	39
Identificación de posibles interacciones proteína-proteína <i>in silico</i>	39
Expresión de UBE3A y Parkina y su interacción con MAP1B-LC1	40
Interacción de UBE3A y Parkina con la subunidad Cav2.2 $\alpha_1$	42
Alteración en la expresión funcional de canales Cav2.2 recombinantes por Parkina	48
Disminución en la expresión funcional de canales Cav2.2 nativos por Parkina	55
<b>Discusión</b>	58
Regulación de canales Cav por el UPS	58
Caracterización de la interacción funcional entre Parkina y los canales Cav2.2	60
Entendiendo la regulación de los canales Cav por el UPS usando ubiquitina ligasas genéticamente diseñadas	64
Conclusiones y perspectivas	66
<b>Bibliografía</b>	68

## Prefacio

El presente trabajo de Tesis se desarrolló en el laboratorio 55 del Departamento de Biología (DBC) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN). La tesis fue dirigida por el doctor Diego Ricardo Félix Grijalva, profesor titular del Departamento. El plan experimental se desarrolló con la asesoría de los doctores Guillermo Elizondo Azuela y Enrique Othón Hernández González profesores titulares del DBC, el doctor Bulmaro Cisneros Vega profesor titular del Departamento de Genética y Biología Molecular en el Cinvestav y la doctora Martha C. Rivera Cervantes profesora titular del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Este trabajo tuvo como finalidad estudiar la regulación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo N ( $\text{Ca}_v2.2$ ) por las enzimas del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). Inicialmente se caracterizó la interacción de la subunidad conductora de los iones ( $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$ ) y las enzimas E3 (ubiquitina ligasas) del UPS conocidas como UBE3A (tipo HECT) y Parkina (tipo RBR), y posteriormente se investigó el resultado bioquímico y fisiológico de estas interacciones. La tesis muestra evidencia experimental suficiente para proponer que la Parkina, pero no la UBE3A, forma del complejo molecular junto con la enzima E2 conjugasa UBE2L3 y la cadena ligera (LC1) de MAP1B, a través del cual se favorece la ubiquitinación de los canales y su subsecuente degradación asociada al proteasoma.

Éste estudio es el primero en abordar la regulación de los canales Cav2.2 por una proteína específica del UPS y provee las bases para entender los mecanismos que intervienen en esta regulación. Algunos resultados de este trabajo han sido presentados en dos congresos *FASEB Science Research Conference: Ion Channel Regulation* y *Society for Neuroscience* celebrados en Colorado y Washington (EUA), respectivamente, ambos en el 2017. De igual manera, los resultados forman parte de un artículo de investigación original que se publicó en la revista *PLOS One* 2017; 12: e0185289.

En el periodo que duró mi entrenamiento doctoral conté con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) a través de una beca académica (793149).

## Resumen

Los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo N ( $\text{Cav}2.2$ ) juegan un papel relevante en la liberación de neurotransmisores en el sistema nervioso. Aunque los niveles de expresión de los canales en la membrana celular se regulan de manera precisa, poco se conoce acerca de los mecanismos moleculares que median su síntesis y degradación. Previamente, en el laboratorio se mostró evidencia de que el complejo formado por la cadena ligera de la proteína asociada a microtúbulos LC1-MAP1B y la enzima E2 ubiquitina conjugasa UBE2L3 interacciona con los canales  $\text{Cav}2.2$  promoviendo su ubiquitinación y subsecuente degradación asociada al proteasoma. El presente trabajo muestra nueva evidencia experimental sobre el mecanismo de degradación de los canales  $\text{Cav}2.2$  por el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS). Primero se identificaron a las enzimas UBE3A y Parkina (E3 ubiquitina ligasas) como moléculas que interaccionan con los canales, y posteriormente se evidenció su interacción con el complejo formado por LC1-UBE2L3 y el canal  $\text{Cav}2.2$ . Asimismo, la sobreexpresión de Parkina, redujo la expresión de la proteína, así como la densidad de la corriente a través de canales  $\text{Cav}2.2$ . Asimismo, los registros electrofisiológicos obtenidos en presencia de MG132 mostraron que este inhibidor del proteasoma previene la acción de la Parkina sobre las corrientes macroscópicas a través de los canales  $\text{Cav}2.2$ . Estos hallazgos brindan un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares que controlan la expresión funcional de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje.



## Abstract

N-type  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}_v2.2$ ) channels are widely expressed in the nervous system, where they play important roles in the regulation of transmitter release. Although  $\text{Ca}_v2.2$  channel expression levels are precisely regulated, presently little is known regarding the molecules that mediate its synthesis and degradation. Previously, by using a combination of biochemical and functional analyses, we showed that the complex formed by the light chain 1 (LC1) of the microtubule-associated protein 1B (MAP1B) and the ubiquitin-proteasome system (UPS) E2 enzyme UBE2L3, may interact with the  $\text{Ca}_v2.2$  channels promoting ubiquitin-mediated degradation. The present work aimed to gain further insights into the possible mechanism of the  $\text{Ca}_v2.2$  channel degradation by the UPS. First, we identified the enzymes UBE3A and Parkin, members of the UPS E3 ubiquitin ligase family, as novel  $\text{Ca}_v2.2$  channel binding partners. Immunoprecipitation assays confirmed the interaction between UBE3A and Parkin with  $\text{Ca}_v2.2$  channels heterologously expressed in HEK-293 cells and in neural tissues. Parkin, but not UBE3A, overexpression led to a reduced  $\text{Ca}_v2.2$  protein level, and decreased current density. Recordings performed in the presence of MG132 prevented the actions of Parkin suggesting enhanced channel proteasomal degradation. Together, these results indicate that Parkin mediates the proteasomal degradation of  $\text{Ca}_v2.2$  channels. Together, these findings provide a novel insight into the underlying molecular mechanisms of  $\text{Ca}_v$  channels protein quality control and functional expression.

## Introducción

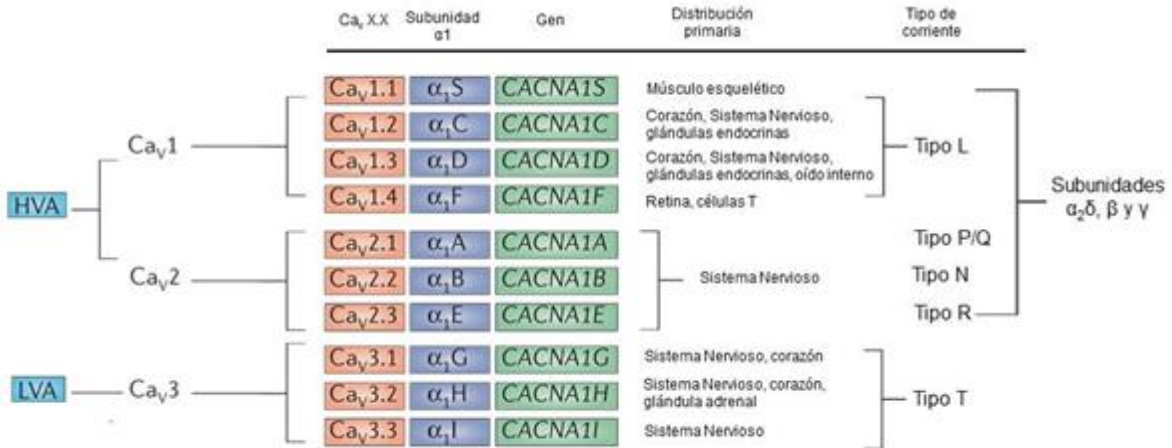
Los canales  $Ca_v$  son complejos heteromultiméricos que traducen las señales eléctricas en la membrana plasmática en procesos intracelulares mediante la producción de cambios transitorios en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ . Así, en respuesta a un cambio en el potencial de la membrana plasmática, los canales  $Ca_v$  experimentan a su vez un cambio conformacional que los hace transitar de un estado no conductor a otro altamente permeable, dando lugar a la entrada de iones de  $Ca^{2+}$  hacia el interior celular (Catterall, 1998; 2011).

### *Clasificación funcional de los canales de $Ca^{2+}$ dependientes de voltaje ( $Ca_v$ )*

Con base en sus propiedades funcionales y farmacológicas los canales  $Ca_v$  se pueden agrupar en dos grandes familias. La primera se denomina de bajo umbral de activación (LVA; por sus siglas en inglés), y agrupa a los canales que necesitan de despolarizaciones pequeñas para activarse (abrirse); a este tipo de canales se les conoce también como canales tipo T (por *tiny* y *transient*), pues muestran una conductancia pequeña y se inactivan rápidamente. El segundo grupo se denomina de alto umbral de activación (HVA; por sus siglas en inglés) y comprende a los canales de tipo L, P/Q, N y R los cuales se activan por despolarizaciones de la membrana de mayor amplitud con respecto a los canales tipo T (Lacinová, 2005; Catterall, 1998; 2011). Dentro de los canales HVA existen varias subfamilias, la primera de ellas engloba a los

canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L que reciben este nombre porque dan lugar a corrientes persistentes (*long lasting*), y se caracterizan por ser sensibles a un grupo de fármacos conocidos como dihidropiridinas. Por su parte, los canales tipo N (neuronales) son sensibles al bloqueo por una toxina proveniente de un caracol marino llamada  $\omega$ -conotoxina GVIA y se identificaron inicialmente por tener una dependencia al voltaje intermedia, es decir más negativa que los tipo L, pero más positiva que los tipo T. Por su parte, los canales tipo P/Q (originalmente descritos en las neuronas de Purkinje) se bloquean por una toxina proveniente de un arácnido llamada  $\omega$ -Agatoxina IVA. Finalmente, los canales tipo R (resistentes), son insensibles a la mayoría de los bloqueadores orgánicos de los otros canales, pero son bloqueados selectivamente por un péptido derivado de una toxina de araña conocido como SNX-482 (Catterall, 1998; 2011; Zamponi *et al.*, 2015).

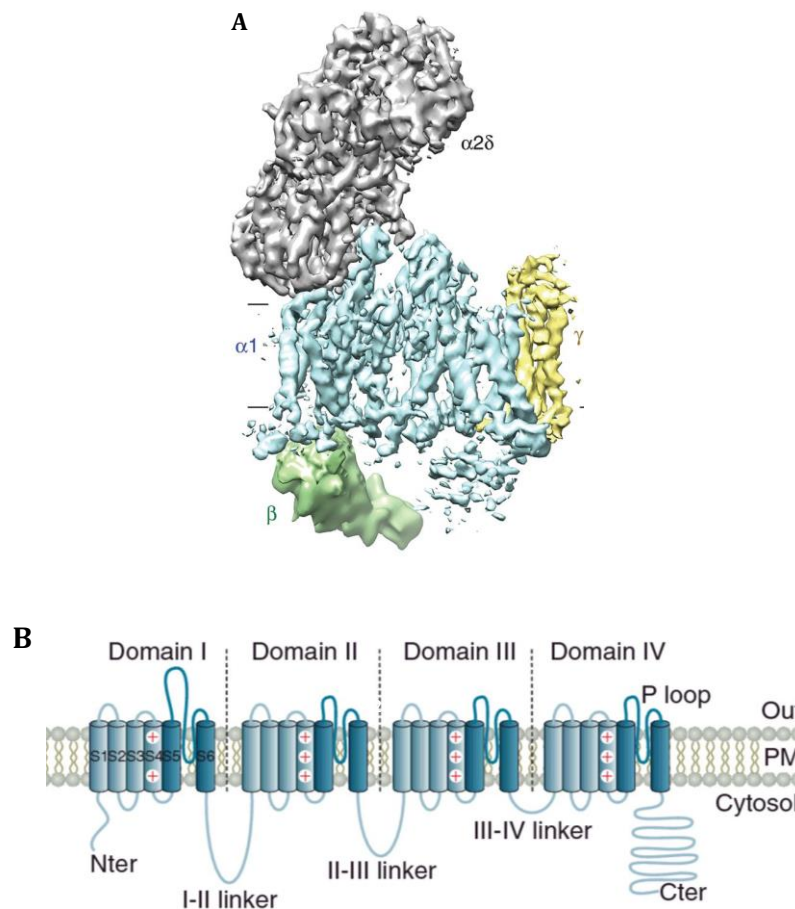
Cabe señalar que existe otra manera de clasificar a los canales  $\text{Ca}_v$  que agrupa a los canales HVA en dos subfamilias  $\text{Ca}_v1$  y  $\text{Ca}_v2$ , mientras que los a canales LVA (tipo T) los incluye en una tercera subfamilia llamada  $\text{Ca}_v3$  (Catterall, 1998; 2011; Zamponi *et al.*, 2015; Fig. 1).



**Figura 1. Clasificación de los canales Cav.** Los canales Cav1 y Cav2 son conocidos como canales de alto umbral de activación (HVA) e incluyen a los tipos L, P/Q, N y R. Los canales Cav3 forman el grupo de canales de bajo umbral de activación (LVA) o tipo T. Los nombres originales se muestran en azul y hacen referencia a los distintos tipos de la proteína conductora de los iones ( $\alpha_1$ ). Tanto los canales HVA como los LVA presentan una distribución diferencial en órganos y tejidos (modificado de Christel & Lee, 2012; Dolphin, 2012).

Las distintas subfamilias de canales Cav se han caracterizado desde diversos puntos de vista. Desde un enfoque bioquímico, los canales HVA (Cav1 y Cav2) presentan una estructura molecular que consiste en al menos tres proteínas o subunidades codificadas por diferentes genes. La subunidad Cav $\alpha_1$  forma el poro del canal y su actividad se regula por la presencia de subunidades auxiliares conocidas como Cav $\beta$  y Cav $\alpha_2\delta$  (Arikkath & Campbell, 2003; Dolphin, 2009; Wu *et al.*, 2015; 2016; Fig. 2A). Las distintas subunidades Cav $\alpha_1$  están codificadas en al menos diez genes diferentes y tienen un peso de ~190-250 kDa. Todas ellas subunidades presentan una estructura común; están formadas por cuatro dominios homólogos repetidos (I-IV), constituidos a su vez por seis segmentos transmembranales (S1-S6; Fig. 2B). El asa

que une a los segmentos S5 y S6 de cada dominio repetido forma el poro conductor de los iones. Asimismo, el segmento S4 de cada dominio repetido forma el sensor de voltaje del canal, cuya función principal es traducir los cambios en el voltaje transmembranal en cambios conformacionales que generan la apertura y el cierre del canal (Bezanilla, 2002; Arikkath & Campbell, 2003; Dolphin, 2009; Catterall, 2011).



**Figura 2. Estructura del complejo del canal Cav1.1.** A) Estructura en detalle del complejo del canal Cav1.1 usando criomicroscopía electrónica (Cryo-EM) a una resolución de 4.2 Å. La proteína Cav $\alpha_1$  es transmembranal y contiene el poro conductor de iones. La actividad de esta subunidad está regulada por las subunidades auxiliares Cav $\beta$  citoplasmática (verde), la subunidad Cav $\alpha_2\delta$  (gris) y Cav $\gamma$  (amarillo). B) La subunidad Cav $\alpha_1$  consiste en cuatro dominios repetidos (I-IV) formados por seis segmentos transmembranales (S1-S6). El asa reentrante entre los segmentos S5 y S6

forma el poro conductor de iones (*P loop*), mientras que el sensor de voltaje se ubica en el S4 (modificado de Wu *et al.*, 2015; 2016; Weiss & Zamponi, 2017).

La subunidad  $\text{Ca}_v\beta$  es una proteína citoplasmática de ~50-65 kDa que se asocia a una región en el asa I-II la subunidad  $\text{Ca}_v\alpha_1$  denominada domino de interacción alfa (AID; por sus siglas en inglés). Se sabe que existen cuatro subfamilias de subunidades  $\text{Ca}_v\beta$  ( $\beta_1$ - $\beta_4$ ), codificadas por cuatro genes diferentes (Buraei & Yang, 2013). Respecto a su función, se ha observado que todas las subunidades  $\text{Ca}_v\beta$  incrementan la actividad de la subunidad  $\text{Ca}_v\alpha_1$ , alterando su sensibilidad al voltaje y su cinética, usualmente acelerando tanto la activación como la inactivación de los canales (Dolphin, 2003; Buraei & Yang, 2013; Weiss & Zamponi, 2017).

La subunidad auxiliar  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$  también forma una subfamilia de cuatro proteínas distintas ( $\alpha_2\delta_1$ - $\alpha_2\delta_4$ ) de ~170 kDa, que son codificadas también por cuatro genes diferentes. Todas las subunidades  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta$  son producto de un solo gen, la forma madura de esta proteína consta de dos polipéptidos producto de procesamiento proteolítico que se mantienen unidos a través de un enlace disulfuro (Calderón-Rivera *et al.*, 2012). La región  $\alpha_2$  se localiza en la parte extracelular, mientras que la región  $\delta$  se encuentra unida a la membrana plasmática mediante un anclaje de glicosilfosfatidilinositol (Davies *et al.*, 2010). Además, las variantes de procesamiento alternativo de cada subunidad de los canales  $\text{Ca}_v$  adicionan un grado mayor de diversidad y complejidad molecular (Catterall, 2011; Dolphin, 2016).

Las subunidades auxiliares regulan distintas propiedades biofísicas de los canales, así como su envío y estabilización en la membrana plasmática, así como su degradación (Dolphin, 2003; 2009; 2013; Felix *et al.*, 2013; Simms & Zamponi, 2014; Felix & Weiss, 2017). Además de las subunidades auxiliares existen algunas proteínas como calmodulina (CaM) que se unen a los canales de  $Ca^{2+}$  y son esenciales en la señalización neuronal. Estas proteínas se pueden asociar a los canales tanto a través de la subunidad  $Cav\alpha_1$  como a las subunidades auxiliares y regular algunas de sus propiedades, así como su localización subcelular (Hidalgo & Neely 2007; Wang *et al.*, 2007; Eroglu *et al.*, 2009; Gandini & Felix, 2012; Kadurin *et al.*, 2017).

Los canales  $Cav$  participan de manera determinante en diversos pasos de la transferencia de información en el sistema nervioso, así como en el desarrollo neuronal, la muerte celular programada, la contracción muscular, la secreción hormonal, la expresión génica, y la actividad enzimática, entre otros muchos eventos fisiológicos (Lipscombe *et al.*, 2013; Zamponi *et al.*, 2015; Dolphin, 2016). Uno de los mecanismos mejor estudiados por la relevancia fisiológica de los canales  $Cav$  es su participación en la secreción y la liberación de neurotransmisores en la pre-sinapsis (Catterall, 1998; 2011; Atlas, 2013; Zamponi *et al.*, 2015; Mochida, 2018).

La liberación de neurotransmisores dependiente de  $Ca^{2+}$  es el mecanismo más importante de señalización para el intercambio de información entre las neuronas. Este proceso se lleva a cabo en zonas activas de las terminales nerviosas en donde existe una alta densidad de canales  $Cav$  (Ackermann *et al.*, 2015). El arribo de un

estímulo nervioso o potencial de acción a las terminales presinápticas provoca que los canales  $Ca_v$  se activen y permitan la entrada  $Ca^{2+}$  al interior de la célula. Una vez en el medio intracelular, el  $Ca^{2+}$  que entra funciona como segundo mensajero capaz de iniciar una serie de reacciones que favorecen el ensamble de la maquinaria excitotónica, la fusión de las vesículas que contienen a los neurotransmisores con la membrana plasmática y la liberación de los neurotransmisores al espacio sináptico (Catterall, 1998; 2011; Schneggenburger *et al.*, 2012; Atlas, 2013; Zamponi *et al.*, 2015; Campiglio & Flucher, 2015; Mochida, 2018).

#### *Canales de $Ca_v2.2$ (tipo N): diversidad estructural y funcional*

Los canales  $Ca_v2$  muestran una distribución predominantemente neuronal. Como ya se mencionó el  $Ca^{2+}$  que entra a través de estos canales funciona como un segundo mensajero permitiendo la liberación de vesículas sinápticas. La entrada de  $Ca^{2+}$  durante la transmisión sináptica ocurre fundamentalmente a través de los canales tipo N ( $Ca_v2.2$ ) y P/Q ( $Ca_v2.1$ ), estos últimos se expresan en todo el cerebro, particularmente en cerebelo, mientras que los canales de tipo N se encuentran distribuidos en todo el sistema nervioso central y son de particular importancia en sistema nervioso periférico maduro (Zamponi *et al.*, 2015; Dolphin, 2016).

Además de su papel relevante en la neurotransmisión, los canales  $Ca_v2.2$  participan en una gran variedad de procesos fisiológicos que van desde la sinaptogénesis hasta la regulación de la excitabilidad neuronal (Brosenitsch & Katz,



2001; Jones *et al.*, 1997). Estudios recientes muestran la relación entre la alteración en la expresión funcional de los canales Cav2.2 con el desarrollo de ciertas enfermedades como el síndrome del X frágil (SXF), uno de los principales trastornos hereditarios que ocasiona discapacidad intelectual, y que se caracteriza por una disfunción sináptica (Ferron *et al.*, 2014; Striessnig, 2016). Sin embargo, no se habían relacionado mutaciones en el canal Cav2.2 con alguna enfermedad congénita hasta un estudio reciente en donde se reportó una mutación congénita en los canales Cav2.2 denominada síndrome similar a la distonía mioclónica (*myoclonus-dystonia-like syndrome*), el cual se asocia con movimientos rápidos, breves y descoordinados que afecta típicamente la parte superior del cuerpo y se acompaña comúnmente de síntomas psicológicos como desordenes obsesivo compulsivo, ansiedad y depresión (Groen *et al.*, 2015; Weiss, 2015).

Por otro lado, uno de los papeles más estudiados de los canales Cav2.2 es su participación en el dolor neuropático ya que están densamente expresados en las fibras C que llegan al asta dorsal en la médula espinal y su expresión membranal se incrementa cuando hay un daño y/o lesión en los nervios espinales como resultado de un aumento en la expresión de la subunidad auxiliar Cav $\alpha_2\delta$ -1 (Patel *et al.*, 2013). Otro dato importante de mencionar es la diversidad en el funcionamiento de los canales Cav2.2 dependiendo del tipo celular en donde se expresan, lo cual sugiere la existencia de heterogeneidad a nivel molecular y estructural. Varios factores pueden influir en esta diversidad funcional, entre los que se encuentran la asociación con

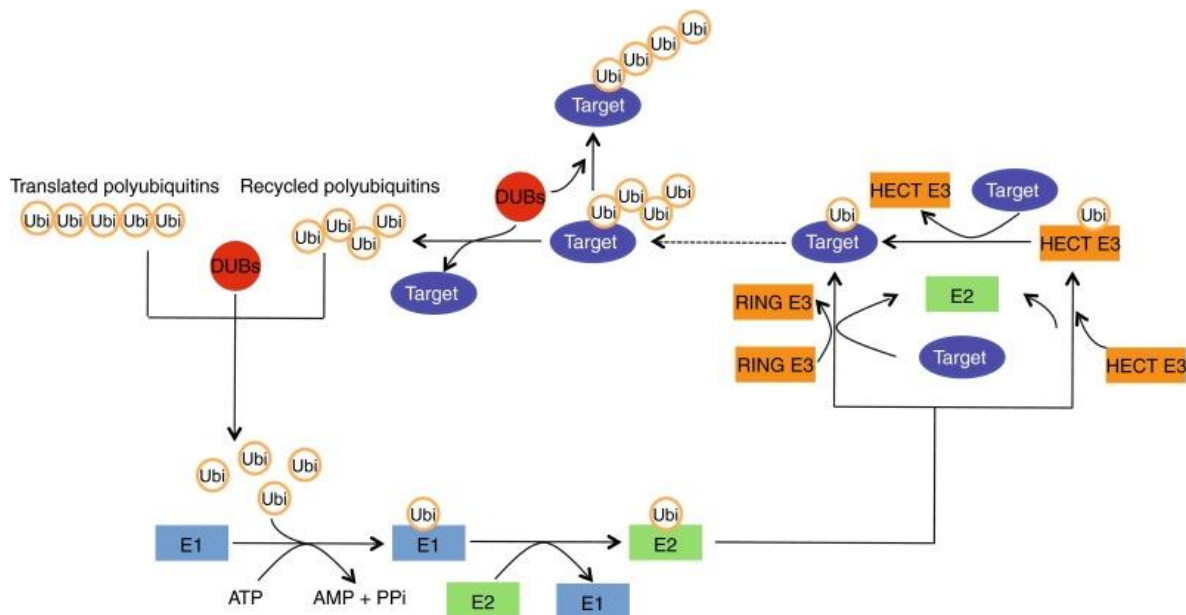
diferentes subunidades auxiliares, con otras proteínas, la presencia de isoformas y modificaciones postraduccionales, como la ubiquitinación (Limpscombe *et al.*, 2013; Felix & Weiss, 2017).

### *El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y la familia de enzimas E3 ubiquitina-ligasas*

El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS, por sus siglas en inglés) es un elemento esencial de la maquinaria del control de la calidad de las proteínas. Si bien en este sistema participan un sinnúmero de proteínas, el elemento central es el proteasoma 26S, un complejo multienzimático en forma de barril que contiene varios centros activos ocultos en su interior o núcleo. Al entrar al proteasoma las proteínas blanco son degradadas a aminoácidos. De esta manera, el UPS regula diversos procesos celulares entre los que destacan la progresión del ciclo celular, la reparación del ADN, la endocitosis, la transcripción y el número de receptores y canales iónicos en la superficie celular, entre muchos otros (Chitra *et al.*, 2012; Jung & Grune, 2012). Asimismo, el funcionamiento correcto del UPS constituye un mecanismo muy importante para el control de las proteínas de vida corta, así como para la eliminación de proteínas mal plegadas (Dikic, 2017).

Bajo distintos estímulos fisiológicos y patológicos diversas proteínas son susceptibles de ser poliubiquitinadas (PolyUb), es decir, pueden unir cadenas de ubiquitina que se enlazan a través de residuos de lisina (Lys48). Son precisamente

estas cadenas las que reconoce el UPS. La ubiquitina (Ub) es una proteína pequeña de 76 aminoácidos (~8 kDa) que se une de manera covalente a otras proteínas. La actividad coordinada de tres enzimas, E1 de activación (se han descrito 2 en el proteoma humano), E2 de conjugación (~40) y E3 de ligación (~600) conducen a la activación y transferencia de la Ub a las proteínas blanco mediante el proceso conocido como ubiquitinación (Fig. 3).



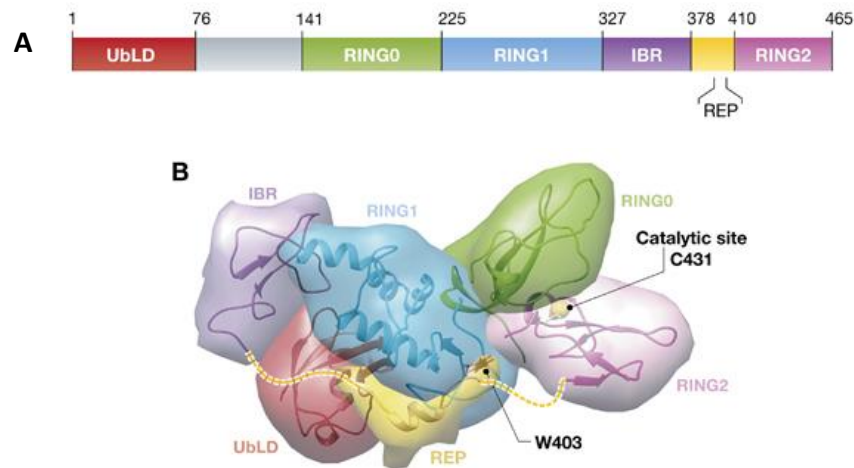
**Figura 3. Maquinaria enzimática implicada en la ubiquitinación de proteínas.** En la ubiquitinación, una molécula de ubiquitina (Ub) es activada mediante la formación de un enlace covalente en un residuo de glicina en su extremo C-terminal, en donde existe el motivo Leu-Arg-Gly-Gly. La glicina final es la que se adenila como parte de la activación en la primera reacción de la vía mediante una reacción que requiere de ATP. En una segunda reacción, la Ub activada se une a un residuo de cisteína de la enzima E1 mediante un intermediario tioéster de alta energía. La Ub es transferida posteriormente a una enzima E2 ubiquitina conjugasa en una reacción de transtiolación que resulta en la formación de otro intermediario tioéster de alta energía. La enzima E3 ubiquitina ligasa se une a su sustrato e interactúa con el

complejo E2-Ub. Finalmente, la Ub se liga al sustrato en uno de sus residuos de lisina mediante un enlace isopeptídico (Tomado de Zhang *et al.*, 2014).

Las enzimas responsables de interactuar con las proteínas blanco son las E3 de ligación, las cuales acoplan a las proteínas blanco con las enzimas E2 ubiquitina conjugasas, unas veces participando directamente en la catálisis, y otras sirviendo sólo de enlace con la enzima E2 y el sustrato a ubiquitinar (Fig. 3). En este último caso la ubiquitina pasa directamente de la enzima E2 a la proteína blanco (Dikic, 2017). Las enzimas E3 ubiquitina ligasas constituyen un grupo diverso de proteínas, que se dividen en cuatro grandes grupos 1) *really interesting new gene (RING-finger)*; 2) *U-box*; 3) *homologous to E6-AP carboxyl terminus (HECT)*; y 4) *RING in between RING-RING (RBR)*.

Las enzimas E3 ubiquitina ligasas con dominios RING y U-box reconocen al sustrato, pero la encargada de transferir la Ub es la enzima E2. Por su parte las enzimas E3 con dominio HECT aceptan la Ub de la enzima E2 y la transfieren directamente a las proteínas blanco (Fig. 3). Estas enzimas contienen un dominio con un residuo de cisteína conservado en el cual la Ub es transferida de la enzima E2 y luego al sustrato a través de un enlace covalente isopeptídico (Hegde, 2004; Komander & Rape, 2012; Sadowski *et al.*, 2012; Husnjak & Dikic, 2012). Además de estas enzimas E3, existe un grupo denominado RBR (*RING in between RING-RING*; Fig. 4). Las enzimas E3-RBR usan un mecanismo conjunto entre tipo RING y HECT, en donde el dominio RING1 es el sitio de unión de la enzima E2, el dominio IBR confiere

una conformación que permite que se aproxime el dominio RING1/E2-Ub con el dominio RING2 que facilita la transferencia de la Ub a la proteína blanco (Ardley & Robinson, 2005; Smit & Sixma, 2014; Wenzel *et al.*, 2011).



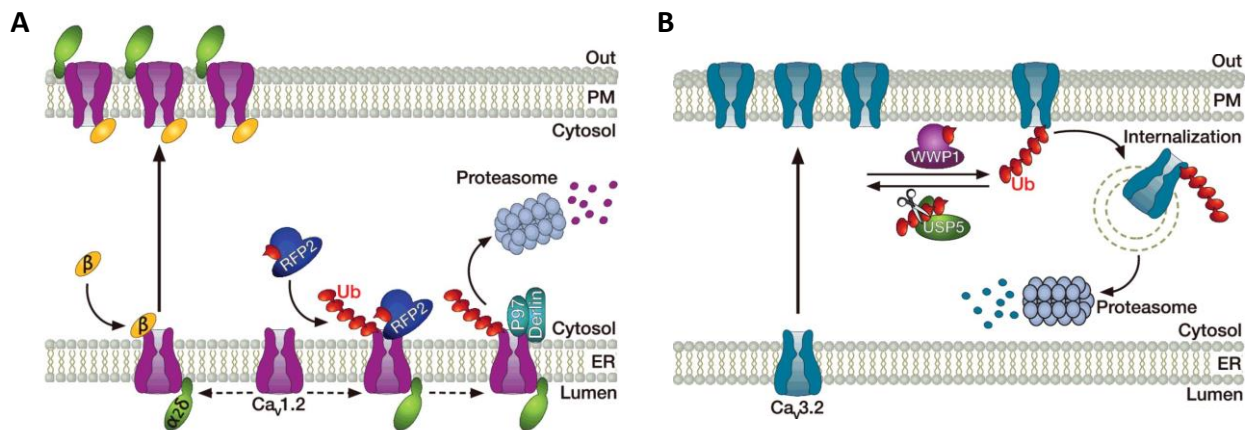
**Figura 4. Las enzimas E3 ubiquitina ligasas RBR tienen un mecanismo de tipo RING/HECT.** (A) dominios estructurales de Parkina. (B) Representación estructural de Parkina que destaca las interacciones de los dominios en la estructura tridimensional de la proteína, el residuo catalítico C431 y el residuo W403 dentro del dominio REP, que desempeña un papel en la estabilización de la forma autoinhibida de la enzima (Modificado de Byrd & Weissman, 2013).

#### *Regulación de los canales dependientes de voltaje (Ca<sub>v</sub>) por el sistema UPS*

Los canales Ca<sub>v</sub> son susceptibles de regulación por diversos mecanismos celulares entre los que se encuentran la activación de los receptores acoplados a proteínas G, y modificaciones postraduccionales como la fosforilación y la glicosilación. De manera reciente, la ubiquitinación ha emergido como un nuevo mecanismo esencial que controla la expresión y la función de los canales Ca<sub>v</sub> (Dolphin,

2003; Müller *et al.*, 2010; Zamponi & Currie, 2013; Felix & Weiss, 2017). En específico, la PolyUb en el residuo de lisina 48 y la subsecuente degradación proteasomal, es un tema que ha interesado a varios grupos de investigación al ser un importante mecanismo que controla la cantidad de canales  $Ca_v$  en la superficie celular en particular, y la actividad neuronal en general (Mabb & Ehlers, 2010; Altier *et al.*, 2011; Kantamneni *et al.*, 2011; Marangoudakis *et al.*, 2012; Lipscombe *et al.*, 2013).

En este contexto, diversos trabajos muestran que la subunidad que forma el poro conductor de iones  $Ca_v\alpha_1$  así como la subunidad auxiliar  $Ca_v\beta$  pueden ser blanco de ubiquitinación y degradación proteasomal (Kawaguchi *et al.*, 2006; Altier *et al.*, 2011; Gregory *et al.*, 2011; Rougier *et al.*, 2011; Marangoudakis *et al.*, 2012; Weiss & Zamponi, 2017). Asimismo, se ha reportado que la ubiquitinación de la subunidad  $Ca_v\alpha_1$  disminuye al co-expresar a la subunidad auxiliar  $Ca_v\beta$  debido a que ésta última evita su degradación (Waithe *et al.*, 2011; Altier *et al.*, 2011) (Fig. 5).



**Figura 5. Control de la expresión de los canales  $Ca_v$  por el UPS.** (A) La ubiquitinación (cadena roja) de los canales  $Ca_v1.2$  por la ubiquitina ligasa RFP2

desencadena la asociación del canal con las proteínas ERAD Derlin1 y P97, lo que conduce a la degradación del complejo del canal por el sistema del proteasoma. En presencia de una subunidad  $\beta$ , Cav1.2 está protegido de la ubiquitinación dependiente de RFP2, lo que permite el tráfico del canal a la membrana celular. (B) Aunque la ubiquitinación de los canales Cav3.2 por la ubiquitina ligasa WWP1 desencadena su internalización y degradación, la eliminación de restos de ubiquitina por la deubiquitinasa USP5 aumenta la estabilidad del canal en la membrana plasmática (Modificado de Weiss & Zamponi, 2017).

Estos trabajos en su conjunto ponen en evidencia que el número de canales Cav puede ser regulado mediante ubiquitinación y degradación proteasomal, pero además muestran que este proceso se lleva a cabo por enzimas específicas del UPS, como es el caso de la enzima E3 ubiquitina ligasas RFP2, la cual promueve la degradación de los canales Cav1.2 mediante un mecanismo asociado a retículo endoplásmico conocido como ERAD (Altier *et al.*, 2011; Fig. 5). Asimismo, se conoce que la enzima RFP14, se encuentra presente en el nanoambiente de los canales Cav2 e interacciona con ellos y podría estar regulando su actividad (Müller *et al.*, 2010). Asimismo, se ha descrito un mecanismo adicional donde la enzima Nedd4-1 regula a la subunidad auxiliar Cav $\beta$  y de esta forma regula el envío del canal Cav1.2 recién sintetizado a la membrana plasmática (Rougier *et al.*, 2011).

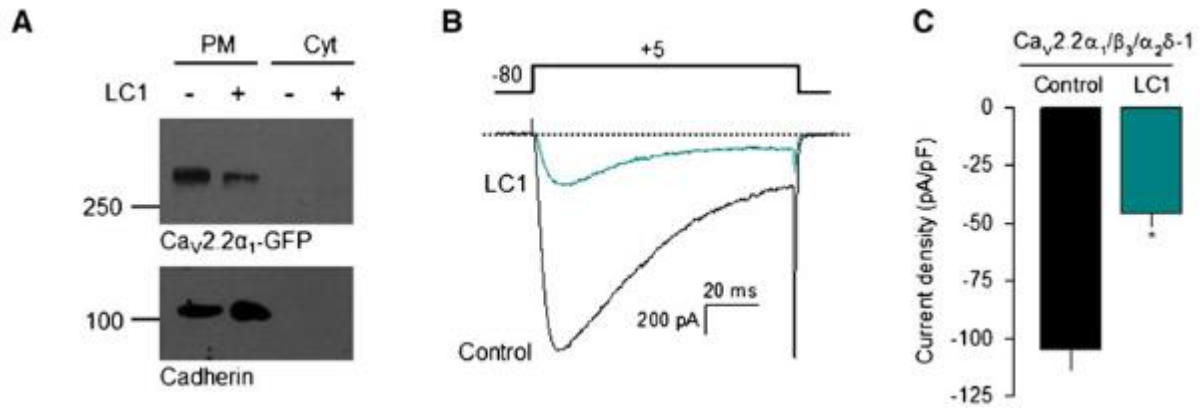
Otro nivel de control dentro del proceso de ubiquitinación antes mencionado es el representado por la actividad de las deubiquitininas (DUB), una familia de proteasas que liberan la ubiquitina de la proteína blanco. Esto remueve la señal de degradación, puede “editar” la poliubiquitinación y cambia el destino de las proteínas. Además, el desensamble de las cadenas de ubiquitina mantiene una reserva de

monómeros de ubiquitina y sus precursores para reiniciar el proceso de ubiquitinación. Existen cerca de 95 tipos de DUB codificadas en el genoma humano y se han dividido en cinco categorías (UCH, USP, MJD, OTU y JAMM) con base en la homología de su dominio catalítico (Ndubaku & Tsui, 2015; Nijman *et al.*, 2005; Ristic *et al.*, 2014).

### *Regulación de los canales de $Ca^{2+}$ tipo N mediante el complejo LC1-UBE2L3*

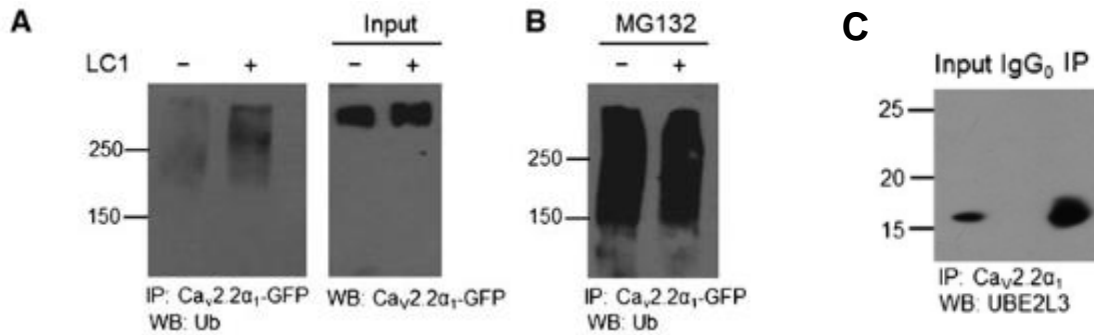
En este contexto, nuestro grupo de investigación ha mostrado evidencias de la regulación de los canales  $Ca_v2.2$  (tipo N) por la cadena ligera 1 (LC1) de la proteína asociada a microtúbulos B (MAP1B; Fig. 6). En particular, se observó que LC1 colocaliza e interacciona funcionalmente con la subunidad  $Ca_v2.2\alpha_1$  y no así con las subunidades auxiliares  $\beta_3$  y  $\alpha_2\delta-1$  (Gandini *et al.*, 2014a; 2014b). Esta interacción funcional resulta en una disminución en el número de canales en la membrana, así como una reducción en la densidad de corriente causada por la sobreexpresión de LC1 (Gandini *et al.*, 2014a; Fig. 6).





**Figura 6. La LC1 regula la expresión membranal de los canales Cav2.2 en células HEK-293.** (A) Comparación por *Western blot* semicuantitativo de la cantidad de proteínas de membrana en presencia o en ausencia de LC1 empleando un anticuerpo anti-GFP. (B) Trazos representativos de corriente a través de los canales Cav2.2 en ausencia (trazo negro) o presencia de LC1 (trazo azul). (C) Comparación de la densidad de corriente a través de canales Cav2.2 en ausencia (barras negras) y en presencia (barras azules) de LC1 se muestra en el panel derecho (modificado de Gandini, 2014a).

Estos estudios muestran además que la interacción entre LC1 y el complejo de los canales tipo N se lleva a cabo a través de la subunidad formadora del poro del canal Cav2.2α<sub>1</sub> (Gandini, 2014a; 2014b). Asimismo, se encontró que la sobreexpresión de LC1 aumenta el nivel de ubiquitinación de los canales Cav2.2 expresados heterológicamente en la línea celular HEK-293 (Figs. 7A), y de manera consistente con estos datos, el tratamiento con el inhibidor del proteasoma MG132 previno la degradación de los canales Cav2.2 y restauró el número de canales a la membrana (Fig. 7B).



**Figura 7. La expresión de LC1 aumenta el nivel de ubiquitinación de los canales  $\text{Ca}_v2.2$  recombinantes.** (A) Los canales se inmunoprecipitaron con un anticuerpo anti-GFP y los niveles de ubiquitinación se estudiaron mediante *Western blot* empleando un anticuerpo anti-ubiquitina en ausencia y en presencia de LC1 según se indica. (B) Comparación de los niveles de ubiquitinación de los canales en presencia (+) o ausencia de LC1 (-) y de MG132. (C) Ensayo de inmunoprecipitación que muestra la interacción entre los canales  $\text{Ca}_v2.2$  y la enzima UBE2L3 (modificado de Gandini, 2014a).

Por último, mediante el uso del sistema de doble híbrido en levadura se mostró la interacción entre LC1 y la enzima de conjugación UBE2L3 (también llamada UbcH7, L-UBC, UbcM4 o E2-F1) en células HEK-293. Esta novedosa interacción molecular se validó en ensayos de inmunoprecipitación (Fig. 7C). Más aún, se encontró que el complejo LC1/UBE2L3 puede interactuar con los canales  $\text{Ca}_v2.2$ , sugiriendo que LC1 puede actuar como una proteína de soporte a fin de aumentar la ubiquitinación de los canales mediada por UBE2L3 (Gandini *et al.*, 2014a; 2014b).

## Planteamiento del problema e hipótesis de trabajo

Los canales  $Ca_v2.2$  son proteínas que se expresan predominantemente en la sinapsis regulando la liberación de neurotransmisores para una transferencia rápida de la información nerviosa. El procesamiento apropiado de esta información incide en una gran variedad de eventos fisiológicos como la memoria y el aprendizaje, entre muchos otros.

Diversos estudios han demostrado que los canales  $Ca_v2.2$ , así como otros canales de  $Ca^{2+}$  activados por voltaje como  $Ca_v1.2$ ,  $Ca_v1.3$ ,  $Ca_v2.1$  y la subunidad auxiliar  $Ca_v\beta$  son sujetos al proceso de ubiquitinación y a la subsecuente degradación proteasomal (Felix & Weiss., 2017; Weiss & Zamponi, 2017; Altier *et al.*, 2011; Gregory *et al.*, 2011; Marangoudakis *et al.*, 2012; Waithe *et al.*, 2011). Este proceso es específico y llevado a cabo por enzimas particulares del sistema UPS, como es el caso de la enzimas E3 ubiquitina ligasas RFP2, Nedd4-1 y RFP18 (Altier *et al.*, 2011; Rougier *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2017).

Hasta hace unos años, poco se sabía sobre la degradación de los canales de calcio dependientes de voltaje, sin embargo, hoy en día varios grupos de investigación incluyendo el nuestro trabajan para dilucidar los mecanismos moleculares que participan en este tan relevante proceso fisiológico. Es importante mencionar que desde el punto de vista molecular el sistema de ubiquitinación está conformado por tres enzimas: la E1 (de activación), la E2 (de conjugación) y la E3 (de ligación). Se sabe

que la ubiquitinación de los canales  $Ca_v2.2$  se lleva a cabo a través de la acción de la enzima E2 ubiquitina conjugasa UBE2L3 con la ayuda de una enzima E3 ubiquitina ligasa aún desconocida. En este sentido se sabe además que UBE2L3 tiene una alta afinidad por las enzimas de tipo HECT del UPS, específicamente UBE3A (Sheng *et al.*, 2012; Ronchi *et al.*, 2013) y de tipo RING, particularmente Parkina (Chaugule *et al.*, 2011; Wenzel *et al.*, 2011). Es por ello que como parte central del presente proyecto de tesis se investigó si las enzimas UBE3A y Parkina podrían ser parte del complejo LC1/UBE2L3, y de ser así, si participaban en la degradación proteasomal de los canales  $Ca_v2.2$ . De esta manera, aquí se plantea la hipótesis de que las enzimas E3 del UPS, UBE3A (tipo HECT) y Parkina (tipo RBR), forman parte del complejo LC1/UBE2L3, y promueven la ubiquitinación y subsecuente degradación proteasomal de los canales  $Ca_v2.2$ .

## **Objetivo general**

Investigar la participación de las enzimas E3 ubiquitina ligasas del sistema ubiquitina proteasoma UBE3A y Parkina en la regulación de la expresión funcional de los canales Cav2.2 (tipo N).

## **Objetivos particulares**

1. Caracterizar la interacción entre los canales Cav2.2 y los complejo LC1/UBE2L3/UBE3A y LC1/UBE2L3/Parkina.
2. Investigar si estas interacciones moleculares modifican la ubiquitinación de los canales Cav2.2.
3. Determinar el efecto la interacción de los canales Cav2.2 con los complejo LC1/UBE2L3/UBE3A y LC1/UBE2L3/Parkina sobre la localización y expresión membranal de los canales Cav2.2.

## **Materiales y Métodos**

### *Cultivo celular (HEK-293)*

Para el desarrollo de este proyecto se empleó la línea celular HEK-293 (ATCC, Manassas, VA) como sistemas modelo de experimentación. Esta línea celular se estableció a partir del riñón embrionario humano al transformarlas con un adenovirus tipo 5 (Graham *et al.*, 1977; Robinson & Goochee, 1991). Su uso es muy común en los laboratorios donde se estudian canales Cav, ya que estas células no expresan estas proteínas de manera endógena (Avila *et al.*, 2004), pero es posible inducir su expresión por medio de transfección transitoria, generando condiciones relativamente controladas para estudiar su comportamiento bajo diversas condiciones experimentales. El medio de cultivo empleado para el mantenimiento de esta línea celular fue DMEM suplementado con 10% de suero equino, 2 mM de L-Glutamina, 110 mg/L de piruvato de sodio, 100 U/L de penicilina y 100 µg de estreptomicina. Las células se mantuvieron en cajas de cultivo de 60 mm de diámetro (cultivo madre), y se resembraron cada 3 d a un quinto de su densidad original. El cultivo celular se mantuvo a 37°C en una atmósfera con 80% de humedad relativa y 5% de CO<sub>2</sub>.

### *Transfección transitoria*

La transfección de las clonas de ADNc se realizó usando el reactivo Lipofectamina Plus (Invitrogen). Para las cajas petri de 35 mm de diámetro se usaron 1.6  $\mu\text{g}$  del plásmido que codifica para la subunidad  $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$  de conejo (número de acceso a GenBank D14157), en conjunto con el ADNc que codifica para las subunidades auxiliares  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$  y  $\text{Ca}_v\beta_3$  de rata (números de acceso a GenBank M86621 y M88751, respectivamente). Asimismo, se emplearon 1.6  $\mu\text{g}$  de los plásmidos HA-UBE3A, HA-Parkina y HA-UBE2L3 de humano (Addgene #8648, 17613 y 27561, respectivamente). La construcción Myc-MAPB1-LC1 se usó como se describió previamente (Gandini *et al.*, 2014a). Para la transfección de los siRNAs se empleó el reactivo Lipofectamina RNAimax (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los ensayos de electrofisiología, las células HEK-293 se sembraron sobre cubreobjetos cubiertos con poli-D-lisina en cajas de 35 mm de diámetro y se sometieron a registro 48 h después de la transfección. El inhibidor del proteasoma MG132 se usó en los ensayos de IP, así como los de ubiquitinación a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  por 6 h.

### *Cultivo de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD)*

En el presente trabajo también se emplearon neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD) de ratones BALB/c de 5-7 d de edad como sistema modelo. Todos los

procedimientos experimentales que se llevaron a cabo con estas células contaron con la aprobación del Comité de Ética experimental de Cinvestav y de acuerdo con el estándar actual Mexicano de cuidado y uso de animales con fines de experimentación científica. Las neuronas disociadas de los GRDs se mantuvieron en medio de cultivo Neurobasal suplementado con B27, N2, Glutamax, antibiótico-antimicótico y piruvato de sodio hasta su uso en los registros electrofisiológicos.

#### *Extracción de proteínas y Western blot*

Las células transfectadas así como las muestras de tejido cerebral de rata se lavaron con PBS frío (en mM) 136 NaCl, 2.5 KCl, 1.5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 6.5 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> [pH 7.4]), se centrifugaron y se resuspendieron en *buffer* de lisis RIPA (en mM) 150 NaCl, 0.5 PMSF y 25 Tris-HCl [pH 7.6], con 1% de NP-40, 1% de desoxicolato de sodio, 0.1% de SDS, y Complete 1X). Treinta o cincuenta µg de proteína se hirvieron durante 5 min en *buffer* de carga de proteínas que contenía 2-mercaptoetanol 0.1 M, Tris-Cl 58 mM, SDS al 1.7%, glicerol al 5% y azul de bromofenol al 0.002% [pH 6,8]. Las muestras se separaron electroforéticamente después mediante SDS-PAGE al 8-15%, se transfirieron a membranas de PVDF y las proteínas de interés se detectaron usando los anticuerpos descritos a continuación.



### *Anticuerpos*

Para los experimentos de co-inmunoprecipitación (Co-IP) y *Western blot* (WB), se usaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-Cav<sub>v</sub>2.2α<sub>1</sub> (Co-IP; generosamente donado por el Dr. K.P. Campbell, U Iowa); anti-Cav<sub>v</sub>2.2α<sub>1</sub> (Co-IP, WB; dilución 1:250; Alomone, # catálogo ACC-002); anti-UBE2L3 (Co-IP, WB; dilución 1:3000; Abcam, # catálogo ab37913); anti-MAP1B-LC1 (Co-IP, WB; dilución 1:1000, Santa Cruz, # catálogo H-130); anti-UBE3A (Co-IP, WB; dilución 1:3000; Cell Signaling, # catálogo D10D3); anti-Parkina (Co-IP, WB; dilución 1:3000, Santa Cruz, # catálogo H-300); anti-N-Cadherina (WB dilución 1: 1000 Santa Cruz, # catálogo H-63); anti-C-Myc (Co-IP, WB; dilución 1:1000, Santa Cruz, # catálogo 9E10); anti-C-Myc (Co-IP, WB; dilución 1: 500; Aves Lab, # catálogo ET-MY100); anti-GFP (Co-IP, WB; dilución 1:500; Novus Biologicals, # catálogo NB600-308); anti-GFP (Co-IP, WB; dilución 1:500; Aves laboratorio, # catálogo GFP-1020); anti-HA (Co-IP, WB; dilución 1:1000, Santa Cruz, # catálogo F-7); anti-Ubiquitina (WB; 1:10000; Cell Signaling, # catálogo P4D1); anti-Actina (WB; dilución 1:250, generosamente donado por el Dr. J.M. Hernández Cinvestav, México); anti-β-actina (WB; dilución 1:10000; Genetex, # catálogo GT5512).

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: anti-HRP de pollo (Jackson Immunolabs, # catálogo 303-035-003); HRP anti-cabra (Jackson Immunolabs, # catálogo 805-035-180); HRP anti-ratón (Jackson Immunolabs, # catálogo 115-035-

003); Anti-HRP de conejo (Jackson Immunolabs, # catálogo 111-035-003); IgG anti-conejo (Abcam, # catálogo ab131366); Anti-IgG de conejo (Jackson Immunolabs, # catálogo 211-032-171); IgG anti-ratón (Jackson Immunolabs, # catálogo 115-035-174); y anti-IgG de cabra (Abcam, # catálogo ab157532). Después de la incubación con los anticuerpos secundarios, las membranas se revelaron usando un sistema de detección de quimioluminiscencia (Thermo Scientific) y se visualizaron con el sistema de imágenes Odyssey Fc (LI-COR). Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Las mediciones densitométricas se realizaron empleando el programa ImageJ disponible en la dirección electrónica <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

#### *Ensayos de co-inmunoprecipitación*

Las muestras de tejido cerebral de rata y de células HEK-293 se solubilizaron en *buffer* de lisis RIPA que contenía una mezcla de inhibidores de proteasas. Los materiales no solubilizados se eliminaron por centrifugación. Las muestras de proteína (1-2 mg) se incubaron con 3-5 µg de anticuerpos específicos o irrelevantes como un control, a 4°C durante toda la noche, y posteriormente los complejos se incubaron con 20 µl de proteína G recombinante (rProteína G) agarosa (Invitrogen). Los inmunoabsorbentes se recuperaron por centrifugación (5 min a 12,000 rpm) y se lavaron tres veces con *buffer* de lavado (en mM) NaCl 150, EDTA 1, Triton X-100 al

1%, SDS al 0,1%, PMSF 0.5 y Tris 50 Tris- [pH 8.0], y dos veces con PBS. Las muestras se eluyeron en 30  $\mu$ l de *buffer* de carga.

#### *Silenciamiento con ARN pequeños de interferencia (siRNAs)*

Para la inhibición de la expresión de Parkina se utilizaron los siRNAs pre-diseñados 5'-CUCAGAUUAUGAGGUUGAU (dT) y 5'-AUCAACCUCAUAAUCUGAG (dT) (Santa Cruz sc-42159, # catálogo 50873), y se usó una secuencia aleatoria de codificación como control. Estos oligonucleótidos se marcaron usando el paquete comercial de marcaje Cy3 (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada experimento, las células de los GRDs se sembraron en placas de 35 mm de diámetro en 800  $\mu$ l de medio de cultivo, y se transfectaron con 75 pmol de cada siRNA disueltos en 100  $\mu$ l de medio de transfección específico (Santacruz), y en otros 100  $\mu$ l conteniendo 9  $\mu$ l de Lipofectamina RNAiMax durante 5 min antes de mezclar ambos tubos. Después de 20 min, se añadieron 200  $\mu$ l de la mezcla de Lipofectamina/siRNA a las células. Asimismo, 6 h después de la transfección se añadió 1 ml de medio de cultivo fresco a las cajas de cultivo. Las células se cultivaron posteriormente durante 36 h a 37°C para obtener un silenciamiento óptimo de los genes blanco. La eficacia del silenciamiento génico se evaluó mediante *Western blot* usando anticuerpos anti-Parkina y  $\beta$ -actina (como control de carga).

### *Ensayos de biotinylación*

Para estos ensayos se usó un paquete comercial de marcaje con biotina (Thermo Scientific # de catálogo 89881). Cuando se usaron células HEK-293, estas se lavaron con PBS frío y se marcaron con 0.25 mg/ml del reactivo de biotinylación impermeable a la membrana sulfo-NHS-SS-biotina durante 30 min a 4°C. Posteriormente, se añadió una solución de enfriamiento rápido para detener la reacción. Las células se levantaron mecánicamente de la superficie donde se sembraron, y posteriormente se lavaron con PBS para eliminar la biotina no unida. A continuación, se resuspendieron en *buffer* de lisis que contenía inhibidores de proteasa, y se lisaron por sonicación. Después de una incubación en hielo durante 30 min, los lisados se clarificaron y las proteínas biotinyladas se recuperaron mediante incubación con NeutrAvidin-gel. Las proteínas unidas se liberaron mediante incubación con *buffer* de muestra para SDS-PAGE (Tris-Cl 58 mM, DTT 50 mM, SDS al 1.7%, glicerol al 5% y azul de bromofenol al 0.002% [pH 6.8]), utilizando un anticuerpo anti-GFP. Como control de carga, las membranas se incubaron con un anticuerpo anti- $\beta$ -actina y un anticuerpo anti-N-Cadherina para verificar la pureza de las fracciones.

### *Electrofisiología*

Las neuronas de los GRDs de ratón y las células HEK-293 transfectadas se sembraron en cubreobjetos de vidrio previamente recubiertos con poli-L-lisina colocados en placas de cultivo de 35 mm de diámetro, y se sometieron a registro

electrofisiológico de acuerdo con la configuración de células completa de la técnica de *patch-clamp* (Hamill *et al.*, 1981; Gandini *et al.*, 2014c). Las corrientes macroscópicas se registraron utilizando la siguiente solución extracelular (en mM): 120 TEA-Cl, 5 BaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES y 10 glucosa [pH 7.4]. La solución intracelular estaba compuesta de (en mM) 110 CsCl, 5 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 4 Mg-ATP, 0,1 GTP y 10 EGTA [pH 7.1]. Los registros se realizaron con un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices). La adquisición y el análisis de los datos se realizaron utilizando los programas pClamp10 y Sigma Plot 11.0. Las señales de corriente se filtraron y digitalizaron a 2 y a 5.7 kHz, respectivamente. Los componentes lineales y la capacitancia parasitaria se restaron en línea usando un protocolo estándar P/4. La capacitancia de la membrana ( $C_m$ ) se utilizó para normalizar las corrientes (Avila *et al.*, 2004). Las pipetas de registro se hicieron de vidrio de borosilicato y la resistencia eléctrica típica fue de 2-3 M $\Omega$  cuando se llenaron con la solución interna. Las corrientes se evocaron por mediante pulsos despolarizantes de 140 ms entre -50 y +70 mV, en incrementos de 5 mV, desde un potencial de mantenimiento ( $V_h$ ) de -80 mV.

### *Análisis de los datos*

Las gráficas representan la media  $\pm$  el error estándar de los datos obtenidos. Las diferencias estadísticamente significativas se establecieron usando la prueba *t* de Student ( $P < 0.05$ ). El análisis de la densidad de las señales en los experimentos de

*Western blot* realizó empleando el programa *ImageJ*. Los datos se graficaron usando el programa *Sigma Plot 12.0* (Systat Software Inc.).

## Resultados

### *Identificación de posibles interacciones proteína-proteína in silico*

Estudios previos del laboratorio sugieren un aumento en la degradación de los canales Cav2.2 por el UPS como resultado de su interacción con el complejo MAP1B-LC1 con la enzima E2 del UPS conocida como UBE2L3. Sin embargo, se desconoce qué enzima E3 ubiquitina ligasa forma parte de este complejo, por lo que el paso inicial del presente trabajo de tesis consistió en el uso de herramientas bioinformáticas para estudiar las posibles asociaciones entre proteínas y poder determinar cuál(es) proteína(s) del UPS tendrían interaccionar o asociarse con la enzima conjugasa UBE2L3, y forma formar parte del complejo de ubiquitinación y degradación proteasomal de los canales. El uso de los programas STRING y BioGRID3.4 evidenció dos candidatos con asociaciones experimentalmente probadas. Por una parte, UBE3A una enzima que pertenece a la familia de tipo HECT y por otra parte Parkina, un miembro de la familia RBR. Estas interacciones han sido caracterizadas experimentalmente por ensayos bioquímicos tanto *in vivo* como *in vitro*, así como en ensayos inmunohistoquímicos y de microscopía (Fig. 8)



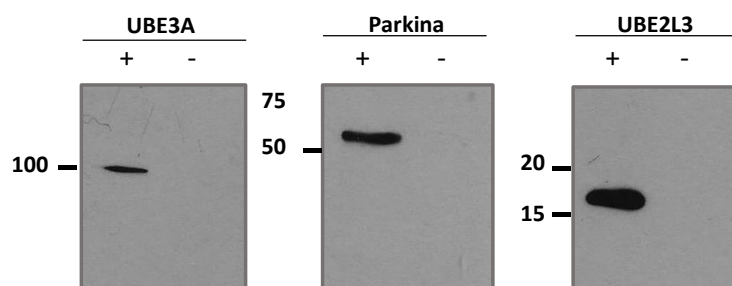
**Figura 8. Interacción de UBE2L3 con otras enzimas del UPS.** UBE2L3 es una enzima E2 ubiquitina conjugasa que actúa específicamente con las enzimas E3 ubiquitina ligasas de la familia RBR y de tipo HECT. UBE2L3 generalmente no funciona con la mayoría de las ligasas que contienen RING porque carece de reactividad intrínseca independiente de E3 con lisina. Por el contrario, tiene actividad con las enzimas E3 de la familia RBR, como Parkina y ARIH1. También puede interactuar con la enzima E3 ubiquitina ligasa UBE3A. UBE2L3 acepta la ubiquitina del complejo E1 y cataliza su unión covalente a otras proteínas. Se ha visto que UBE2L3 cataliza la poliubiquitinación ligada a Lys-11 *in vitro* y está involucrada en la degradación selectiva de proteínas de vida corta o plegadas anormalmente.

#### *Expresión de UBE3A y Parkina y su interacción con MAP1B-LC1*

El siguiente paso fue investigar si las enzimas UBE3A y Parkina interactúan con el complejo LC1/UBE2L3/Cav2.2 y si esta interacción tiene un efecto funcional. Para realizar estos experimentos iniciales se empleó a la línea celular HEK-293 como sistema modelo ya que estas células no expresan canales Cav de manera endógena, pero se sabe que es posible inducir su expresión después de la transfección de los ADNc recombinantes correspondientes. Conviene iniciar señalando que las clonas de

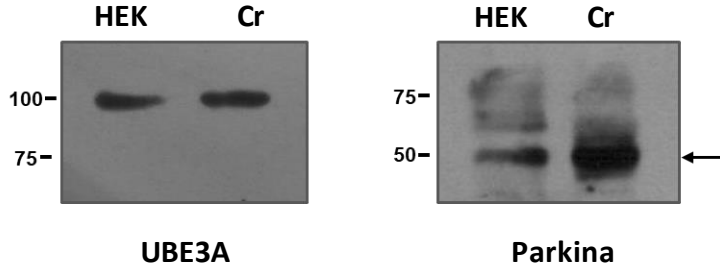


ADNc de Parkina, UBE3A y UBE2L3 se adquirieron de fuentes comerciales y su identidad e integridad se verificó mediante ensayos de restricción con endonucleasas y mediante análisis de *Western blot* (Fig. 9).



**Figura 9. Las enzimas E3 ubiquitina ligasas UBE3A y Parkina recombinantes se expresan en la línea celular HEK-293.** Las clonas de ADNc para UBE3A-HA, Parkina-HA y UBE2L3-HA se transfectaron en las células HEK-293. Las proteínas se extrajeron y se realizó un ensayo de *Western blot* empleando un anticuerpo anti-HA; como control negativo se usaron proteínas de células sin transfectar (-).

Asimismo, se investigó la posibilidad de que estas enzimas E3 del UPS (UBE3A y Parkina) se expresaran de manera endógena en las células HEK-293. Con este fin, se utilizaron extractos totales de células HEK-293 y se realizaron ensayos de *Western blot* empleando anticuerpos anti-UBE3A y anti-Parkina. Los resultados de este análisis muestran la presencia de una banda con el peso esperado para las enzimas de interés (Fig. 10). Este hallazgo sugiere que UBE3A y Parkina podrían ser formar parte del complejo que regula el proceso de ubiquitinación de los canales Cav2.2.

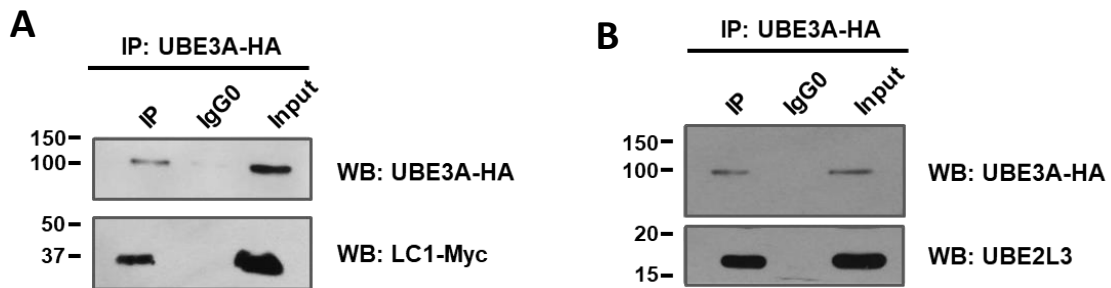


**Figura 10. Las enzimas E3 ubiquitina ligasas UBE3A y Parkina se expresan en la línea celular HEK-293 de forma endógena.** La expresión de las proteínas en las células HEK-293 (HEK) se confirmó mediante *Western blot* usando anticuerpos anti-UBE3A o anti-Parkina según se indica. La posición de la banda de Parkina se señala mediante una flecha. Como control positivo se usaron proteínas de cerebro de rata (Cr).

#### *Interacción de UBE3A y Parkina con la subunidad Cav2.2 $\alpha_1$*

A continuación, se investigó si Parkina y UBE3A interaccionaban con los otros elementos del complejo que regula a los Cav2.2. Para este fin, las células se co-transfectaron primero con las clonas de ADNc que codifican para las proteínas LC1-myc y UBE3A-HA. A continuación, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación (co-IP) recíprocos tanto para MAP1B-LC1 como para la enzima E3 ubiquitina ligasa, usando anticuerpos anti-myc y anti-HA. La Figura 11A muestra que el complejo de proteínas en la IP contenía tanto LC1 como UBE3A corroborando su interacción. También se realizaron ensayos de co-IP usando lisados de células HEK-293 expresando transitoriamente la construcción de UBE3A-HA y la enzima E2 del UPS UBE2L3. En estos ensayos se observaron bandas cercanas al peso molecular de

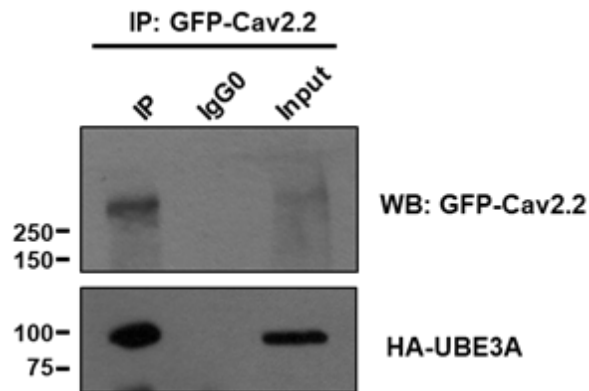
UBE3A y UBE2L3 (Fig. 11B), lo cual sugiere una interacción entre las dos enzimas. Por el contrario, utilizando un anticuerpo anti-IgG<sub>0</sub> como control negativo, no observamos ninguna interacción.



**Figura 11. Interacción entre la enzima E3 ubiquitina ligasa UBE3A, la cadena ligera de MAP1B-LC1 y la enzima E2 ubiquitina conjugasa UBE2L3.** Las proteínas obtenidas de células HEK-293 co-transfectadas con las construcciones UBE3A-HA, LC1-myc y UBE2L3-HA se inmunoprecipitaron (IP) con anticuerpos anti-HA, anti-myc o control (IgG<sub>0</sub>), y se sometieron a análisis por *Western blot* usando anticuerpos específicos como se indica en las figuras. (A) La proteína LC1 se inmunoprecipitó usando el anticuerpo anti-HA (UBE3A) y se detectó con anticuerpos anti-HA y anti-myc. (B) La enzima UBE2L3 se inmunoprecipitó usando el anticuerpo anti-HA (UBE3A) y se detectó con anticuerpos anti-HA y UBE2L3. Los experimentos recíprocos produjeron resultados idénticos. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Estos resultados sugieren que UBE3A podría ser parte del complejo LC1/UBE2L3 y de esta forma participar en la ubiquitinación y degradación mediada por UPS de los canales Cav2.2. Del mismo modo, la interacción entre UBE3A y la subunidad formadora del poro del canal (Cav2.2 $\alpha_1$ ) se investigó en la línea celular HEK-293. Con este fin, las células se co-transfectaron con las clonas de ADNc que

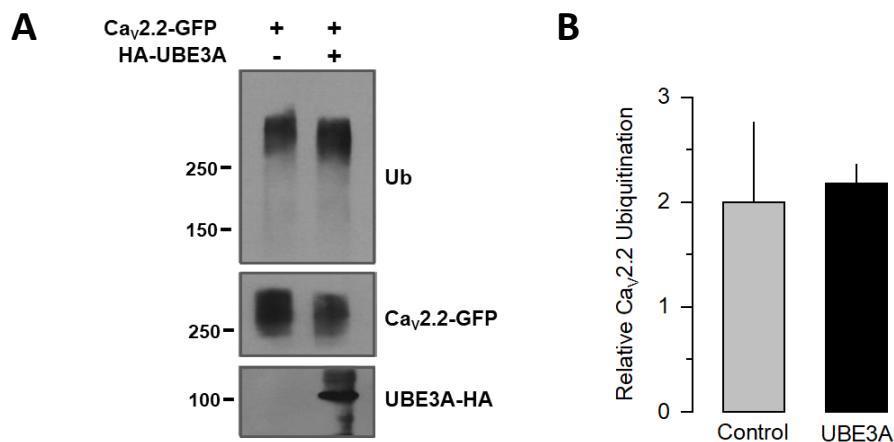
codifican para Cav2.2 $\alpha_1$  y la construcción UBE3A-HA. A continuación, se realizaron ensayos de Co-IP tanto de Cav2.2 $\alpha_1$  como de la enzima E3 ubiquitina ligasa, usando anticuerpos específicos (Fig. 12). Los resultados de estos estudios sugieren que UBE3A puede interactuar con el complejo junto con Cav2.2 $\alpha_1$ .



**Figura 12. Interacción entre la subunidad Cav2.2 $\alpha_1$  y la enzima UBE3A del UPS en células HEK-293.** La subunidad  $\alpha_1$  de los canales Cav2.2 se inmunoprecipitó usando un anticuerpo anti-GFP correspondiente a la etiqueta de esta construcción y se detectó a UBE3A con un anticuerpo anti-HA.

Para investigar si la interacción de UBE3A podía afectar los niveles de ubiquitinación y la degradación mediada por el UPS de los canales Cav2.2, a continuación, se usaron células HEK-293 que fueron transfectadas con los ADNc que codifican tanto la subunidad Cav2.2 $\alpha_1$  junto con las construcciones LC1-Myc y UBE2L3-HA, en presencia o ausencia de UBE3A-HA. Los ensayos de Co-IP se realizaron utilizando un anticuerpo anti-GFP, seguido de un análisis de los niveles de ubiquitinación mediante *Western blot* empleando un anticuerpo específico anti-Ub. La

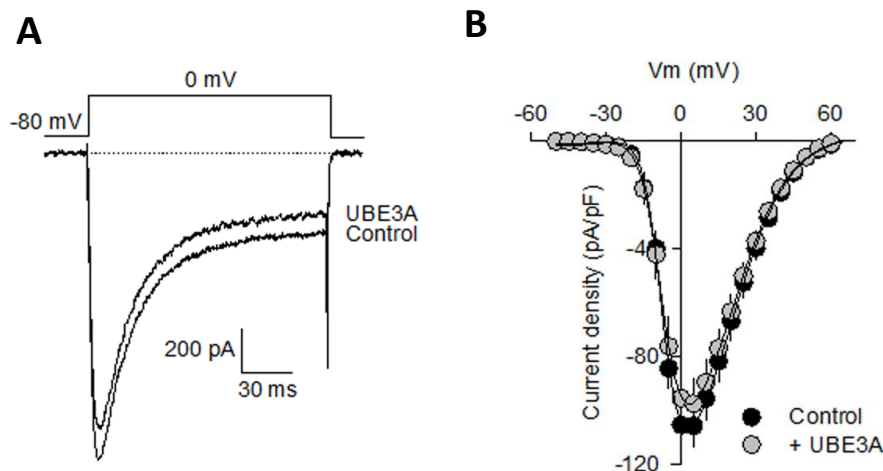
Figura 13A muestra que después de la co-expresión de UBE3A, no existe un cambio significativo en la intensidad de la señal para ubiquitina en los canales de  $Ca_v2.2$  con respecto a la condición de control (en ausencia de UBE3A). En el análisis de los datos de estos experimentos sugieren que, aunque UBE3A interactúa con el complejo LC1/UBE2L3/ $Ca_v2.2$ , la enzima no regula la poli-ubiquitinación de  $Ca_v2.2\alpha_1$  (Fig. 13B). No obstante, estos resultados no excluyen la posibilidad de que UBE3A puede estar regulando otros elementos que forman parte del complejo de los canales como LC1.



**Figura 13. UBE3A no altera significativamente los niveles de ubiquitinación de los canales  $Ca_v2.2$ .** A) *Western blot* que muestra los niveles de ubiquitinación (Ub) de la subunidad  $Ca_v2.2\alpha_1$ -GFP en las células HEK-293 en presencia o ausencia de UBE3A según se indica. B) Comparación de la intensidad relativa de la señal de las subunidades  $Ca_v2.2\alpha_1$ -GFP ubiquitinadas en ausencia (control) o en presencia de UBE3A.

A continuación, se investigó si la co-transfección con la enzima E3 del UPS, UBE3A, tenía algún efecto sobre la expresión de los canales a nivel de la membrana

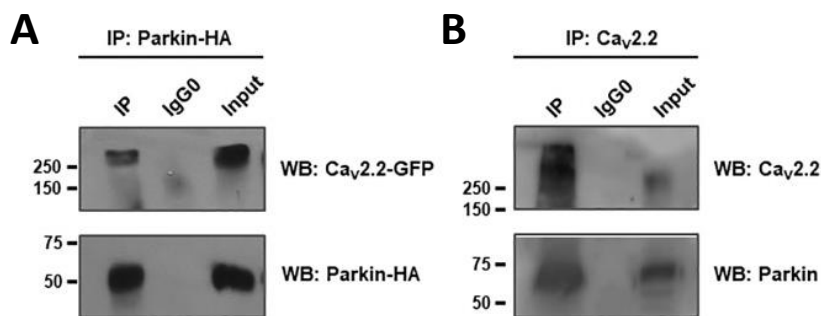
celular. Para esto se realizaron ensayos electrofisiológicos mediante la técnica de *patch-clamp*, los cuales confirmaron que la co-expresión de UBE3A no ejercía un efecto aparente sobre las corrientes de  $Ba^{2+}$  ( $I_{Ba}$ ) a través de los canales de  $Ca^{2+}$   $Ca_v2.2$  (de tipo N) recombinantes expresados heterológamente en células HEK-293 (Fig. 14).



**Figura 14. UBE3A no afecta significativamente la expresión funcional de los canales  $Ca_v2.2$ .** A) Corrientes características registradas a través de los canales recombinantes de tipo N ( $Ca_v2.2\alpha_1/Ca_v\beta_3/Ca_v\alpha_2\delta-1$ ) en ausencia (control) y la presencia de UBE3A, como se indica. B) Promedio de la densidad de corriente (pA/pF) en función del voltaje en células HEK-293 transfectadas con los canales como en la figura A ( $n = 13-25$ ).

A continuación, se procedió a determinar si Parkina, otra de las enzimas E3 ubiquitina ligasas de interés, podría estar interaccionando con la subunidad formadora del poro del canal  $Ca_v2.2$ . Para ello, en primer lugar, se transfectaron células HEK-293 con las clonas de ADNc que codifican para la subunidad  $Ca_v2.2\alpha_1$ -GFP y la construcción de Parkina-HA, y se prepararon extractos de proteínas que se

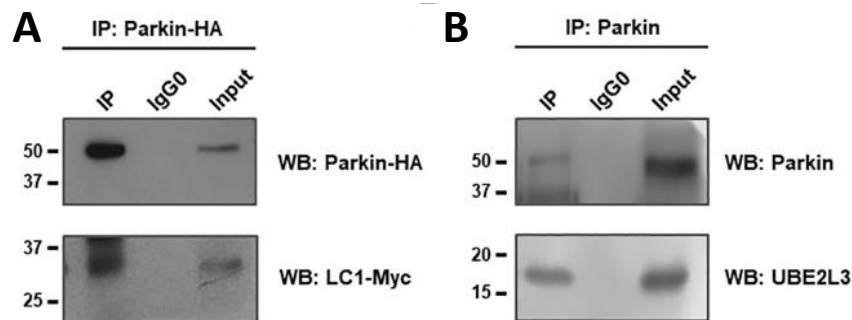
usaron en ensayos de Co-IP, donde se inmunoprecipitó a la subunidad  $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$  con un anticuerpo anti-GFP y usando un anticuerpo anti-HA se detectó la presencia de la enzima del UPS en el complejo. Los resultados de estos experimentos muestran que el complejo de proteínas inmunoprecipitadas contenía Parkina (Fig. 15A), evidenciando de esta forma su interacción con la subunidad formadora del poro del canal  $\text{Ca}_v2.2$ . Además, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación adicionales usando extractos proteicos de cerebro de rata, para corroborar la interacción directa entre  $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$  y Parkina (Fig. 15B).



**Figura 15. Identificación de Parkina como un nuevo actor molecular en el complejo del canal  $\text{Ca}_v2.2$ .** (A) Las proteínas obtenidas de las células HEK-293 co-transfectadas con  $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$ -GFP y Parkina-HA se inmunoprecipitaron usando anticuerpos anti-GFP o control (IgG<sub>0</sub>), y las proteínas unidas se analizaron mediante *Western blot* usando anticuerpos anti-GFP y anti-HA. (B) Los lisados cerebrales de rata se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti- $\text{Ca}_v2.2$  o control y las proteínas unidas se analizaron mediante *Western blot* usando anticuerpos anti- $\text{Ca}_v2.2$  y anti-Parkina.

Del mismo modo, se realizaron ensayos de Co-IP con extractos proteicos de células HEK-293 transfectadas transitoriamente con las clonas de ADNc que codifican para Parkina-HA y la construcción de LC1-Myc (Fig. 16A). Estos experimentos

revelaron una interacción entre la proteína LC1 y la enzima E3 del UPS. Además, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación usando extractos proteicos de cerebro de rata en donde se confirma la interacción entre Parkina y UBE2L3 (Fig. 16B). Estos resultados sugieren que la enzima E3 ubiquitina ligasa Parkina junto con la enzima de conjugación UBE2L3 podría regular conjuntamente la expresión de los canales  $Ca_v2.2$ .



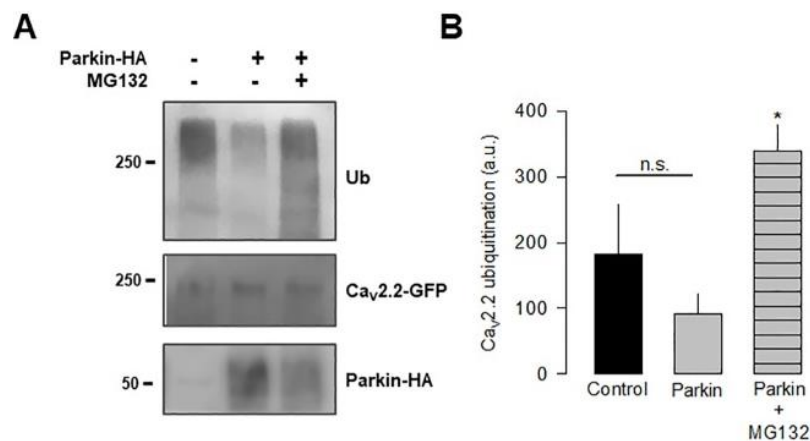
**Figura 16. Interacción entre Parkina y el complejo LC1/UBE2L3.** (A) Las proteínas obtenidas de las células HEK-293 transfectadas con las construcciones LC1-myc y Parkina-HA se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-myc, anti-HA o control (IgG<sub>0</sub>), y se analizaron mediante *Western blot* usando anticuerpos anti-myc y anti-HA. (B) Ensayos de *Western blot* que muestran la inmunoprecipitación de Parkina-HA y UBE2L3 en lisados cerebrales de rata.

#### *Alteración en la expresión funcional de canales $Ca_v2.2$ recombinantes por Parkina*

A continuación, se investigó si la interacción de la subunidad  $Ca_v2.2\alpha_1$  con Parkina podía afectar la expresión funcional de los canales. Con esta finalidad, en una primera serie de experimentos se evaluó el nivel de ubiquitinación de la subunidad  $Ca_v2.2\alpha_1$ -GFP mediante ensayos de Co-IP y *Western blot*, utilizando un anticuerpo que reconoce a las proteínas ubiquitinadas. Si la ubiquitina se conjuga con la proteína de



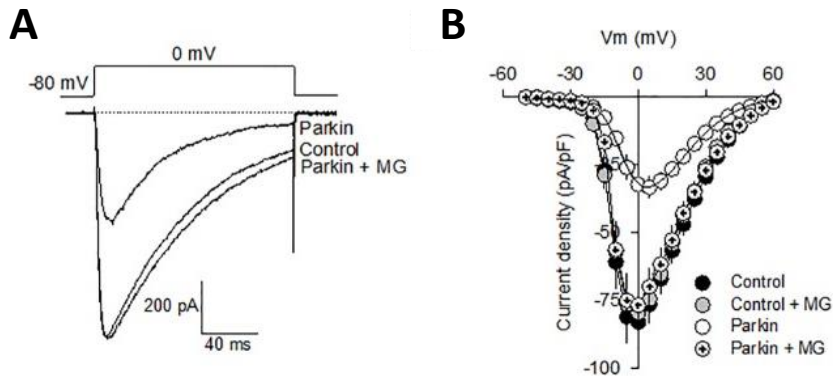
interés, se puede observar una señal con un gradiente de peso molecular mayor al peso esperado de la proteína el cual está asociado a los diferentes niveles de ubiquitinación de la proteína. Los resultados de estos experimentos mostraron que los canales  $Ca_v2.2$  (tipo N) se ubiquitan tanto en ausencia como en presencia de Parkina, y que la presencia de la enzima no aumenta la intensidad de la señal de ubiquitina con respecto a la condición de control. De hecho, los resultados sugieren una disminución en la ubiquitinación de los canales en presencia de la enzima (Fig. 17). Aunque la razón de este resultado inesperado es poco clara, pero podría estar relacionado con un aumento drástico en la velocidad con que se lleva a cabo de ubiquitinación/degradación causada por la sobre-expresión de la enzima E3 ubiquitina ligasa en el sistema heterólogo.



**Figura 17. Parkina altera los niveles de ubiquitinación de los canales de  $Ca_v2.2$  recombinantes.** (A) Análisis por *Western blot* que muestra la ubiquitinación (Ub) de la subunidad  $Ca_v2.2\alpha_1$ -GFP en condiciones control y después de la sobre-expresión de Parkina. (B) Comparación de la intensidad de la señal de ubiquitinación de la subunidad  $Ca_v2.2\alpha_1$ -GFP con respecto al control después de la transfección de

Parkina, en ausencia o presencia del inhibidor del proteasoma MG132. La cuantificación se llevó a cabo a partir de al menos tres experimentos separados.

Posteriormente se estudió si la interacción con Parkina podía disminuir la densidad de la corriente a través de los  $\text{Ca}_v2.2$ . La Figura 18A muestra trazos de corrientes representativos obtenidos mediante la despolarización de la membrana celular usando pulsos a diferentes voltajes. Los resultados de estos experimentos muestran que la Parkina induce una disminución significativa en la amplitud de la corriente. Consistente con esto, el promedio de la densidad de corriente (pA/pF) se redujo significativamente ( $\sim 2.5$  veces) en células HEK-293 que expresaban Parkina en comparación con el control (Fig. 18B). El papel de la Parkina sobre la expresión funcional de los canales  $\text{Ca}_v2.2$  se corroboró en experimentos en que utilizó el inhibidor de proteasoma MG132. Para ello, las células HEK-293 se co-transfectaron con los canales  $\text{Ca}_v2.2$  y/o Parkina, y los registros se llevaron a cabo en ausencia o en presencia del inhibidor del proteasoma MG132 ( $25\mu\text{M}$ ) por 6 h. Los resultados muestran que el MG132 previno la disminución en la densidad de la corriente mediada por la sobreexpresión de Parkina. Estos datos sugieren la posibilidad de que la enzima E3 Parkina pudiera estar involucrada en la degradación de los canales  $\text{Ca}_v2.2$  mediada por el UPS. Estos datos, asimismo, muestran un aumento en los niveles de ubiquitinación de la subunidad  $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$  en la presencia del inhibidor de proteasoma, lo cual es consistente con una acumulación de proteínas del canal ubiquitinado (véase Fig. 17B).



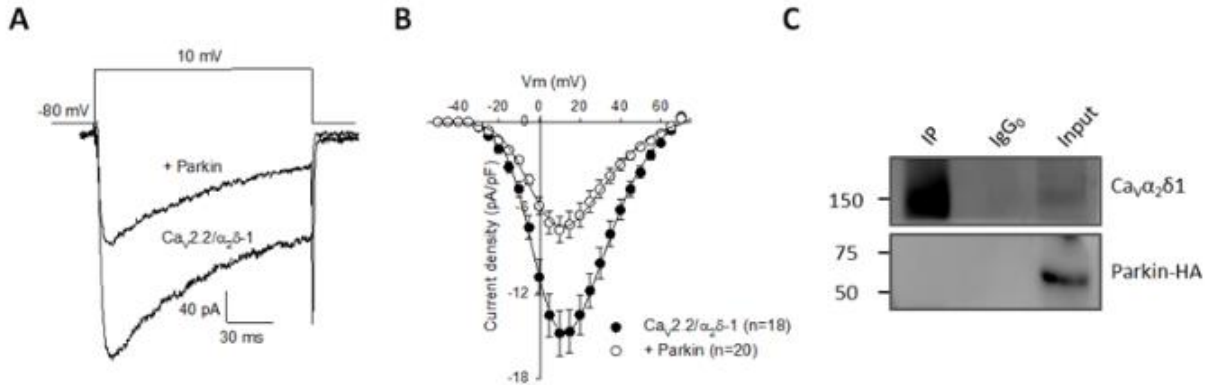
**Figura 18. Parkina reduce la expresión funcional de los canales de  $Ca_v2.2$  recombinantes.** (A) Trazos representativos de las corrientes registradas en células HEK-293 que expresan canales de  $Ca^{2+}$  recombinantes de tipo N ( $Ca_v2.2\alpha_1/Ca_v\beta_3/Ca_v\alpha_2\delta-1$ ), en la condición control y después de la co-expresión de Parkina, en ausencia o presencia de MG132. (B) Promedio de las densidades de corriente (pA/pF) en función del voltaje en células HEK-293 transfectadas con los canales como en la figura A ( $n = 14-30$ ).

Por otra parte, también se investigó la posibilidad de que los efectos de Parkina pudieran ser explicados por alteraciones en las propiedades cinéticas de los canales. Los resultados de este análisis muestran que, a excepción de la marcada reducción de la densidad de corriente máxima, los parámetros de activación e inactivación de la corriente fueron similares en ambas condiciones experimentales. Cabe mencionar que, aunque hubo un ligero cambio en la curva  $I-V$  en dirección despolarizante en la presencia de Parkina ( $\sim 5$  mV), pero que esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por lo tanto, dado que la forma de onda y la dependencia al voltaje de las corrientes macroscópicas en ausencia y presencia de Parkina no se modificaron de forma significativamente, existen dos explicaciones posibles para las diferencias en la amplitud de las corrientes que se muestran en la figura 18. La primera es que la co-

expresión con Parkina pudiera afectar la probabilidad de apertura de los canales ( $P_o$ ), y la segunda posibilidad es que Parkina pudiera disminuir el número de canales ( $N$ ) en la membrana plasmática. Con base en los experimentos que se han descrito hasta ahora, la explicación más plausible es que la co-expresión con Parkina reduce la cantidad de canales en la superficie de la célula.

Es importante mencionar, asimismo, que los resultados obtenidos sobre la densidad de la corriente después de la sobreexpresión de Parkina podrían estar mediados por la ubiquitinación de los otros miembros del complejo del canal  $Ca_v2.2$ , y en particular por la subunidad auxiliar  $Ca_v\beta$ . Por esta razón, a continuación, se decidió realizar los mismos experimentos, pero empleando canales recombinantes constituidos únicamente por las subunidades  $Ca_v2.2\alpha_1$  y  $Ca_v\alpha_2\delta-1$  (sin  $Ca_v\beta$ ), en presencia o en ausencia de Parkina. Los resultados indican que el efecto de Parkina sobre los canales persistió incluso en ausencia de  $Ca_v\beta$ , excluyendo a la subunidad auxiliar como blanco de la enzima E3 ubiquitina ligasa (Fig. 19A y 19B). Asimismo, se consideró la posibilidad de que la Parkina pudiera estar actuando sobre la subunidad  $Ca_v\alpha_2\delta-1$ . Sin embargo, dado que esta proteína es completamente extracelular resultaba poco probable que el efecto sobre la corriente después de la co-expresión de Parkina esté mediado a través de esta subunidad auxiliar. Así, tal y como se podía adelantar, los resultados de los ensayos de inmunoprecipitación muestran de Parkina no co-precipita con  $Ca_v\alpha_2\delta-1$  (Fig. 19C). Tomados en su conjunto, estos datos sugieren

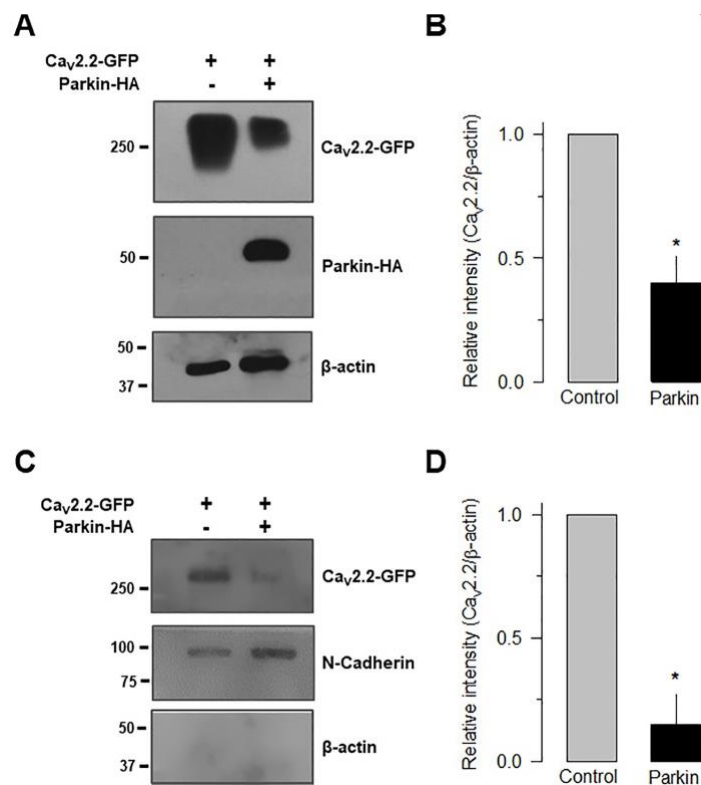
fuertemente que la subunidad  $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$  del complejo del canal es el único blanco de la Parkina.



**Figura 19. Parkina reduce la expresión funcional de los canales recombinantes en ausencia de  $\text{Ca}_v\beta$ .** A) Trazos representativos de las corrientes registradas en células HEK-293 que expresaban a las subunidades  $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$  y  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$  de los canales de tipo N (sin la subunidad  $\text{Ca}_v\beta$ ), en la condición control y en presencia de Parkina. B) Promedio de las densidades de corriente (pA/pF) en función del voltaje en células HEK-293 transfectadas como en la figura A ( $n = 18-20$ ) C) Análisis por *Western blot* de proteínas obtenidas de las células HEK-293 co-transfectadas con  $\text{Ca}_v\alpha_2\delta-1$  y Parkina. Los ensayos de inmunoprecipitación se llevaron a cabo empleando anticuerpos anti-HA o control ( $\text{IgG}_0$ ), seguido por una incubación usando anticuerpos como se indica en la figura.

Los resultados de los ensayos funcionales se corroboraron midiendo el nivel de expresión de la proteína total y de membrana de la subunidad  $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$ , en presencia y en ausencia de Parkina. Inicialmente, se observó una disminución significativa en la cantidad de proteína  $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$  total en células HEK-293 que co-expresaban a la enzima E3 Parkina en comparación con el control, usando  $\beta$ -actina como control de carga (Figs. 20A y 20B). Posteriormente, se realizaron ensayos de biotilación en los que empleó un anticuerpo anti-N-Cadherina como control de carga membranar. Los

resultados muestran una importante disminución en la cantidad de la proteína  $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$  en la membrana plasmática de las células HEK-293 que co-expresaban a los canales recombinantes y a la Parkina, en comparación con la condición control (Figs. 20C y 20D). En estos experimentos, la expresión de la subunidad  $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$  se detectó mediante el uso de un anticuerpo específico para GFP. Estos resultados corroboran los hallazgos en los registros electrofisiológicas y corroboran también la observación de que la Parkina puede regular la cantidad de canales recombinantes de tipo N ( $\text{Ca}_v2.2$ ) presentes en la superficie celular.



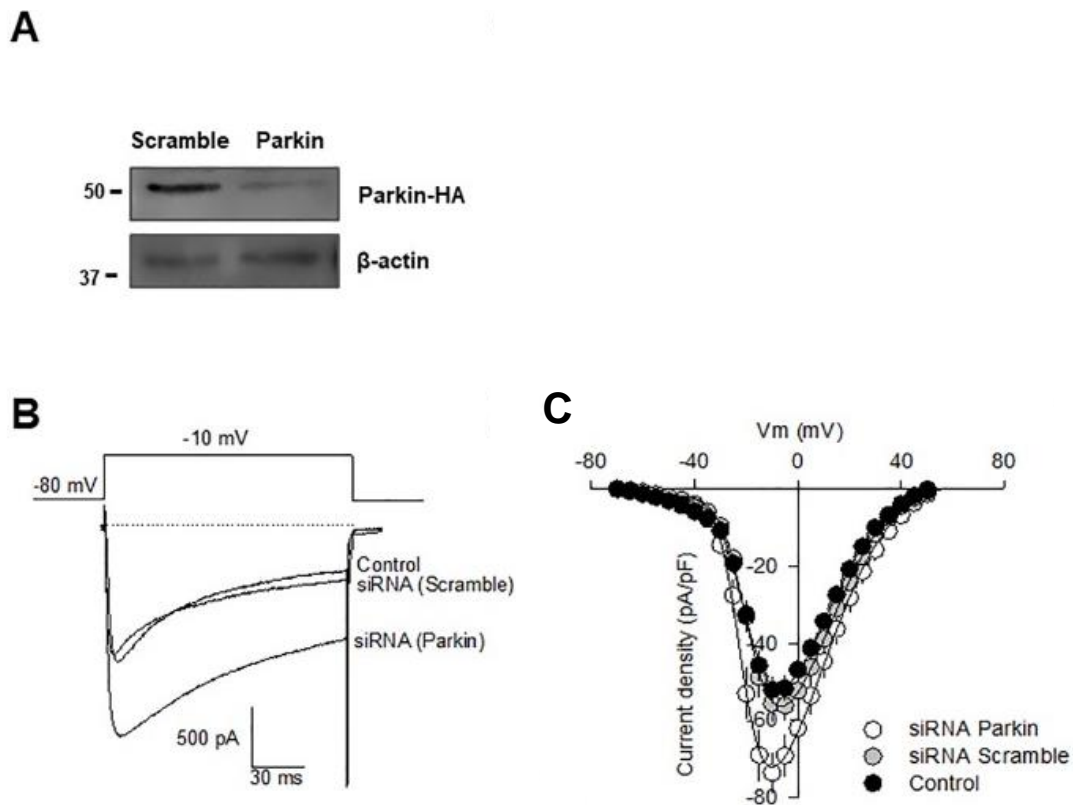
**Figura 20. Parkina disminuye la expresión total y membranal de los canales  $\text{Ca}_v2.2$ .** A) Análisis por *Western blot* de lisados totales de células HEK-293 que expresaban canales de  $\text{Ca}^{2+}$  recombinantes de tipo N ( $\text{Ca}_v2.2\alpha_1\text{-GFP}/\text{Ca}_v\beta_3/\text{Ca}_v\alpha_2\delta\text{-1}$ ), en la condición de control o co-expresando a Parkina, usando anticuerpos específicos

anti-GFP, anti-Parkina y anti- $\beta$ -actina (como control de carga). B) Análisis por *Western blot* semicuantitativo de tres experimentos como en (A). C) Detección de la subunidad  $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$  en ensayos de biotilación de proteínas de membrana en células HEK-293. La señal para N-Cadherina se usó como control de carga. D) Análisis por *Western blot* semicuantitativo de tres experimentos que muestra una disminución significativa en la expresión membranal de la proteína  $\text{Ca}_v2.2\alpha_1$  cuando se co-expresa Parkina.

#### *Disminución en la expresión funcional de canales $\text{Ca}_v2.2$ nativos por Parkina*

Para verificar si la expresión de Parkina afecta la densidad de corriente a través de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N ( $\text{Ca}_v2.2$ ) nativos, a continuación, se realizaron experimentos de silenciamiento utilizando ARNs pequeños de interferencia (siRNAs, por sus siglas en inglés) específicos para Parkina. En primer lugar se verificó la especificidad del silenciamiento (*knockdown*) de la enzima E3 ubiquitina ligasa en neuronas provenientes del ganglio de la raíz dorsal (GRD) de ratón neonato (3-5 d de nacidos), mediante *Western blot* semicuantitativo usando un anticuerpo anti-Parkina (Fig. 21A). El análisis de la expresión de la proteína confirmó una disminución significativa en los niveles de Parkina después de realizar el silenciamiento. Del mismo modo, y de acuerdo con los resultados obtenidos en la línea celular HEK-293, se encontró que el silenciamiento de Parkina mediante el uso de siRNAs específicos, aumentó significativamente la densidad de la corriente a través de los canales  $\text{Ca}_v2.2$  (en ~25%) en comparación con la condición control o empleando un siRNA inespecífico (*Scramble*). La figura 21B muestra trazos de corriente representativos usando al  $\text{Ba}^{2+}$  como acarreador de carga ( $I_{\text{Ba}}$ ), obtenidos aplicando pulsos de prueba despolarizantes a -10 mV, a partir de un potencial de mantenimiento ( $V_h$ ) de -80mV, en neuronas del

GRD en la condición control, y después de la transfección con los siRNAs control (*scramble*) o específicos para Parkina. Los resultados muestran que el silenciamiento de Parkina incrementa significativamente la densidad de la corriente macroscópica total en las neuronas del GRD. Es importante destacar que las neuronas del GRD expresan mayoritariamente canales de tipo N, por lo que es altamente probable que el efecto del silenciamiento sea sobre estos canales (Fig. 21C).



**Figura 21. El silenciamiento de Parkina aumenta la densidad de las corrientes nativas en las neuronas del GRD del ratón.** (A) Las células se transfectaron con los siRNAs control (*scramble*) y específicos para Parkina, y los niveles de expresión de las proteínas se analizaron 48 h después mediante *Western blot* usando anticuerpos específicos;  $\beta$ -actina se empleó como control de carga. (B) Trazos representativos de la corriente de  $Ba^{2+}$ , a través de canales de  $Ca^{2+}$ , registrados en las neuronas de los



GRDs en la condición de control, o después de la transfección con los siRNAs control (*scramble*) y específicos para Parkina. (C) Comparación de la densidad de corriente ( $I_{density}-V$ ) registrada en las neuronas de los GRDs en condiciones de control y después del silenciamiento de Parkina ( $n = 13-23$ ).

## Discusión

Estudios previos han mostrado que la expresión funcional de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje ( $\text{Ca}_V$ ) se encuentra regulada a través de interacciones con una gran variedad de proteínas, así como por modificaciones postraduccionales. Estos son procesos dinámicos que resultan en cambios en el número de canales en la superficie celular, pues en algunos casos se favorece y en otros se frena el envío de las proteínas como resultado de dichas interacciones moleculares.

Uno de estos procesos que regulan la expresión funcional de las proteínas es la ubiquitinación y subsecuente degradación proteasomal, y los canales iónicos en general, y los de  $\text{Ca}^{2+}$  en particular, están sujetos a este importante mecanismo celular homeostático. Pese a ello, existen pocos trabajos hasta la fecha que describan la regulación de los canales  $\text{Ca}_V$  por enzimas E3 del UPS.

### *Regulación de canales $\text{Ca}_V$ por el UPS*

Dentro del proceso de regulación de los canales  $\text{Ca}_V$  por el UPS existen varios factores que determinan su destino final, entre los que se encuentra la composición de los canales en términos de las subunidades que los conforman, las diferentes combinaciones de cadenas de ubiquitina que se les añaden en el proceso y la interacción con enzimas específicas E3 ubiquitina ligasas del UPS.

En este sentido, estudios previos han propuesto un novedoso e interesante mecanismo en donde enzimas del UPS participan de forma directa en el reconocimiento, ubiquitinación y degradación vía proteasoma de algunos canales Cav. Altier y sus colaboradores (2011) encontraron que la subunidad auxiliar Cav $\beta$  incrementa la expresión de los canales Cav1.2 en la membrana plasmática evitando la degradación proteasomal asociada a retículo endoplásmico (ERAD). En ausencia de la subunidad auxiliar Cav $\beta$  los canales Cav1.2 son sujetos al proceso de ubiquitinación llevado a cabo por la enzima E3 de ligación RFP2, la cual interactúa con las proteínas asociadas al complejo ERAD llamadas derlina-1 y p97. En este caso, la subunidad auxiliar Cav $\beta$  interfiere con el reconocimiento y la ubiquitinación llevado a cabo por esta enzima y facilita de esta forma el envío de los canales del retículo endoplásmico a la membrana celular (Altier *et al.*, 2011).

Se sabe, asimismo, que la sobreexpresión de la enzima E3 de ligación Nedd4-1 disminuye el número de canales Cav1.2 totales y en la membrana celular. De manera interesante, la subunidad formadora del poro del canal Cav1.2 $\alpha_1$  aparentemente no es blanco de ubiquitinación por la enzima, sino que la regulación se ejerce sobre la subunidad auxiliar Cav $\beta$ , y de esta forma se regula “indirectamente” la expresión membranar de los canales Cav1.2 (Rougier *et al.*, 2011).

En un trabajo reciente, Fu y sus colaboradores (2017) observaron que a la enzima E3 de ligación RNF138 participa en la regulación de los canales Cav2.1 en las neuronas, coexistiendo en el mismo complejo proteico y además compartiendo una

co-localización pre y postsináptica. La sobreexpresión de RNF138 promueve la poliubiquitinación acelerando la degradación de los canales Cav2.1. Asimismo, la disrupción de la expresión endógena de la enzima E3 ubiquitina ligasa mediante el uso de una construcción dominante-negativa (RNF138-H36E) así como con el uso de ARNs de interferencia (shRNA) incrementa significativamente los niveles de la proteína, así como la vida media del canal Cav2.1 (Fu *et al.*, 2017). En conjunto, estos trabajos muestran el papel del proceso de ubiquitinación como un nuevo mecanismo de regulación funcional de los canales Cav, y que este proceso se lleva a cabo por enzimas específicas del UPS.

En este mismo contexto, en un trabajo previo de nuestro laboratorio se describió la formación de un complejo molecular entre la proteína MAP1B-LC1 con la enzima E2 ubiquitina conjugasa UBE2L3, mismo que se probó interaccionaba con los canales Cav2.2 y aumentaba su degradación proteasomal, disminuyendo en consecuencia su expresión membranaral (Gandini *et al.*, 2014a; 2014b).

#### *Caracterización de la interacción funcional entre Parkina y los canales Cav2.2*

Con base en estos hallazgos, en el presente trabajo de tesis se decidió investigar con mayor detalle los componentes de este complejo, y en particular identificar la(s) enzima(s) E3 de ligación que forman parte del mismo. En los antecedentes de este trabajo se describió la posible existencia de un patrón de interacción entre las enzimas E3 de ligación UBE3A y Parkina con la enzima E2 ubiquitina conjugasa UBE2L3. De

igual manera, los resultados mostrados indican que estas enzimas se expresan de manera endógena en las células HEK-293, por lo que se consideraron fuertes candidatos a formar parte del complejo molecular en cuestión.

Así, mediante ensayos de Co-IP se corroboró la interacción directa entre Parkina y UBE3A con UBE2L3, y además se evidenció la interacción entre Parkina y UBE3A con MAP1B-LC1 y la subunidad  $Ca_v2.2\alpha_1$ . Al determinar el grado de ubiquitinación de los canales  $Ca_v2.2$  después de la co-expresión con estas enzimas del UPS, se observó que Parkina, pero no UBE3A, modificaba la ubiquitinación de  $Ca_v2.2\alpha_1$ . Los registros electrofisiológicos, por su parte, mostraron que la Parkina disminuye la densidad de corriente a través de los canales  $Ca_v2.2$ , mientras que UBE3A no ejerce un efecto aparente sobre las corrientes. Sin embargo, con los datos que se cuenta actualmente, no se podría descartar que la enzima UBE3A pudiera estar regulando el complejo del canal promoviendo la monoubiquitinación y de esta forma regular la internalización del canal para una posterior degradación asociada a lisosoma, o su reciclaje a la membrana plasmática. Este es un interesante tópico para estudios futuros.

Asimismo, se encontró que el efecto sobre la corriente después de la sobreexpresión de Parkina podría estar asociado con una disminución en la cantidad de proteína total y particularmente con la cantidad de canales que llegan a la membrana plasmática. Para conocer si el efecto de la Parkina sobre los canales  $Ca_v2.2$  está asociado a degradación vía proteasoma, se usó el inhibidor del UPS MG132, el cual previno el efecto de la Parkina sobre las corrientes. La participación de la Parkina

en la regulación por el UPS de los canales  $Ca_v2.2$  se confirmó posteriormente mediante experimentos de silenciamiento de la expresión endógena de Parkina usando siRNAs específicos en neuronas del GRD, donde estos canales tienen una expresión predominante en comparación con otros tipos de canales de calcio. En este caso, silenciamiento de Parkina incrementó la expresión funcional de los canales  $Ca_v2.2$  observado como un aumento en la densidad de la corriente de  $Ca^{2+}$  en las neuronas del GRD. Así, los datos del presente trabajo, junto con los antes mencionados, corroboran el papel de la enzima E3 del UPS Parkina en la regulación homeostática de los canales  $Ca_v$  neuronales.

En relación con el trabajo de Rougier y sus colaboradores (2011), en donde la enzima E3 ubiquitina ligasa regula de manera indirecta la expresión de la subunidad formadora del poro ( $Ca_v\alpha_1$ ) de los canales  $Ca_v2.1$  (tipo P/Q), al controlar la degradación de la subunidad auxiliar  $Ca_v\beta$ , cabe mencionar que los mecanismos de degradación proteasomal que involucran subunidades auxiliares aún no se han reportado para los canales neuronales de  $Ca_v2.2$ . Por tal motivo, en este trabajo se investigó si la Parkina podía participar en la ubiquitinación de las subunidades  $Ca_v\beta$  y/o  $Ca_v\alpha_2\delta-1$ . Al realizar ensayos de Co-IP y registros electrofisiológicos en presencia o ausencia de estas subunidades auxiliares y al sobreexpresar Parkina, no se observó un efecto aparente, lo cual sugiere que el efecto de la enzima E3 ubiquitina ligasa es directo sobre la subunidad  $Ca_v2.2\alpha_1$ . Sin embargo, con los datos disponibles, no se

puede descartar que alguna otra enzima del UPS pudiera estar regulando la degradación proteasomal de los canales Cav2.2 a través de las subunidades auxiliares.

Otro aspecto importante de la discusión del presenta trabajo, es la diferencia en el grado de ubiquitinación presentada en la subunidad Cav2.2 $\alpha_1$  cuando se sobre-expresa a Parkina. Los datos muestran una disminución inesperada en los niveles de ubiquitinación de Cav2.2 $\alpha_1$ . Aunque el motivo de esta discrepancia es aún desconocido, este hallazgo podría estar relacionado con un aumento en la velocidad de ubiquitinación mediada por la Parkina.

Una de las posibilidades para explicar la reducción en el grado de ubiquitinación de la subunidad Cav2.2 $\alpha_1$  después de la sobreexpresión de Parkina podría estar asociada a un cambio de la vida media de la proteína, lo cual reduciría el número de canales. En ese sentido los mecanismos de síntesis y reciclaje no compensarían el efecto de la Parkina sobre los canales en el sistema heterólogo empleado. Por otro lado, el incremento en la ubiquitinación de los canales Cav2.2 en presencia de MG132 podría estar relaciono con la inhibición de su degradación, y no necesariamente con la inhibición de la ubiquitinación. Para poner a prueba esta hipótesis, resultaría necesario sobre-expresar una enzima DUB o una construcción dominante negativa de Parkina, así como medir la ubiquitinación de canal nativo en la presencia o ausencia de la enzima. Alternativamente, la Parkina podría estar afectando directamente la funcionalidad del canal disminuyendo su probabilidad de apertura. Aunque el análisis de las corrientes en presencia o ausencia de Parkina presentados en este trabajo

muestra que las cinéticas son similares, estudios funcionales de canal unitario o análisis de ruido podrían proveer de información relevante sobre este tema. Así, los intrincados mecanismos por los cuales la Parkina está disminuyendo la expresión funcional de los canales Cav2.2 requieren una mayor investigación y será el tema de futuros estudios.

*Entendiendo la regulación de los canales Cav por el UPS usando ubiquitina ligasas genéticamente diseñadas*

En un trabajo reciente de Kanner y sus colaboradores (2017) se muestra que la sobreexpresión del dominio catalítico de la enzima E3 ubiquitina ligasa CHIP modificado mediante ingeniería genética, aumentó la ubiquitinación de los canales de K<sup>+</sup> de tipo Kv7.1 (también conocido como KCNQ1) y disminuyó su expresión membranar. La vida media de la proteína en la membrana celular disminuyó en ~3 h (Kanner *et al.*, 2017). Este trabajo resulta de gran relevancia en virtud de que plantea el uso de un novedoso enfoque experimental en que se utilizan enzimas E3 del UPS para afectar selectivamente las proteínas de los canales iónicos y dirigir su degradación por el proteasoma. El principio general implica reemplazar el módulo de selección del sustrato de una enzima ubiquitina ligasa E3 con un dominio que lo dirige a una proteína diana deseada. Así, los autores diseñaron enzimas para ubiquitinar selectivamente a los canales Kv7.1 y encontraron, como ya mencionó, una disminución en la expresión membranar de los canales sin afectar la expresión de otras proteínas,



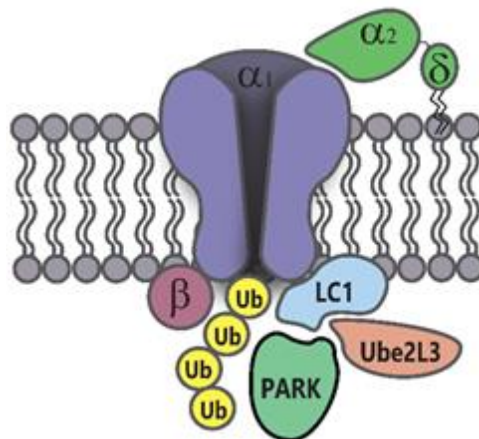
al limitar selectivamente su envío a la superficie celular y no afectar su tasa de endocitosis. Para demostrar la generalidad del enfoque experimental, los autores también tuvieron éxito al disminuir selectivamente la expresión membranal y las corrientes a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L ( $\text{Cav}1.2$ ).

Este enfoque experimental proporciona una herramienta potente para manipular postraduccionalmente la expresión de complejos macromoleculares, como los canales iónicos, de manera específica y controlable. Asimismo, el enfoque proporciona un método para facilitar la comprensión mecánica de cómo la ubiquitinación puede regular diversos aspectos del destino de las proteínas de la membrana, incluido el tráfico, la estabilidad y la función.

Más aún, el estudio muestra cómo podría utilizarse a las ubiquitina ligasas E3 modificadas genéticamente para investigar de forma sistemática y selectiva el impacto de enzimas particulares del UPS sobre las proteínas diana en entornos celulares complejos como, por ejemplo, el desarrollo neuronal o algunas canalopatías (Felix & Weiss, 2017). Sin duda, la ubiquitinación dirigida a canales hiperactivos podría proporcionar una estrategia terapéutica viable para algunas canalopatías que se asocian con expresión exacerbada de canales, o con canales mutantes que presentan ganancia de función, como en el caso de algunos tipos de migraña, de epilepsia y de dolor neuropático (Felix, 2006; Zamponi et al., 2010; Pinggera & Striessnig, 2016).

### *Conclusiones y perspectivas*

En conclusión, con base en los datos del presente trabajo, resulta razonable proponer que la enzima E3 ubiquitina ligasa Parkina podría promover la ubiquitinación de los canales  $Ca_v2.2$  mediante una acción coordinada con la enzima E2 ubiquitina conjugasa UBE2L3 y la proteína MAP1B-LC1 (Fig. 22). Por otro lado, cabe mencionar que es enteramente posible que esta regulación por el complejo LC1/UBE2L3/Parkina se extienda a otros tipos de canales  $Ca_v$  en particular, y a otros tipos de canales iónicos y receptores en general.



**Figura 22. Modelo hipotético de la regulación de los canales  $Ca_v2.2$  por Parkina.** La proteína LC1 forma un complejo molecular con la conjugasa UBE2L3 y la enzima E3 de ligación Parkina a través del cual favorece la ubiquitinación de los canales y su subsecuente degradación por el proteasoma.

Las perspectivas del presente trabajo están orientadas a investigar los mecanismos de ubiquitinación y regulación por el UPS de los canales neuronales en el

contexto fisiológico. Cabe recordar en este contexto que los canales  $Ca_v2.2$  de tipo N son esenciales para controlar la liberación de neurotransmisores presinápticos en el cerebro y el sistema nervioso periférico. La evidencia emergente sugiere que la regulación mediada por la ubiquitinación de las proteínas es clave tanto en las terminales presinápticas como en los compartimentos postsinápticos (Marangoudakis *et al.*, 2012; Gandini *et al.*, 2014a, 2014b; Lai *et al.*, 2016; Fu *et al.*, 2017). Queda por determinar si el complejo MAP1B-LC1/UBE2L3/Parkina regula la degradación de los canales de calcio  $Ca_v2.2$  en las terminales presinápticas, contribuyendo a controlar de alguna forma la liberación de neurotransmisores. Asimismo, el uso de construcciones de Parkina diseñadas mediante ingeniería genética podría ser de gran utilidad para estudiar con mayor detalle los mecanismos moleculares por los cuales esta enzima E3 ubiquitina ligasa regula la expresión membranal de los canales neuronales  $Ca_v2.2$ .

## Bibliografía

1. Ackermann F, Waites CL, Garner CC. (2015) Presynaptic active zones in invertebrates and vertebrates. *EMBO Rep* 16, 923-938.
2. Altier C, Garcia-Caballero A, Simms B, You H, Chen L, Walcher J, Tedford HW, Hermosilla T, Zamponi GW. (2011) The Cav $\beta$  subunit prevents RFP2-mediated ubiquitination and proteasomal degradation of L-type channels. *Nat Neurosci* 14, 173-80.
3. Ardley HC, Robinson PA. (2005) E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem* 41, 15-30.
4. Arikath J, Campbell KP. (2003) Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Curr Opin Neurobiol* 3, 298-307.
5. Atlas D. (2013) The voltage-gated calcium channel functions as the molecular switch of synaptic transmission. *Annu Rev Biochem* 82, 607-635.
6. Avila G, Sandoval A, Felix R. (2004) Intramembrane charge movement associated with endogenous K<sup>+</sup> channel activity in HEK-293 cells. *Cell Mol Neurobiol* 24, 317-330.
7. Bezanilla F. (2002) Voltage sensor movements. *J Gen Physiol* 120, 465-473.
8. Brosenitsch TA, Katz DM. (2001) Physiological patterns of electrical stimulation can induce neuronal gene expression by activating N-type calcium channels. *J Neurosci* 21, 2571-2579.

9. Buraei Z, Yang J. (2013) Structure and function of the  $\beta$  subunit of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Biochim Biophys Acta* 7, 1530-1540.
10. Byrd RA, Weissman AM. (2013) Compact Parkin only: insights into the structure of an autoinhibited ubiquitin ligase. *EMBO J* 32, 2087-2089.
11. 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  $\text{Ca}^{2+}$  channel  $\alpha_2\delta$ -1 auxiliary subunit. *Cell Calcium* 51, 22-30.
12. 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.
13. Catterall WA. (1998) Structure and function of neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  channels and their role in neurotransmitter release. *Cell Calcium* 24, 307-323.
14. Catterall WA. (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a003947.
15. Chaugule VK, Burchell L, Barber KR, Sidhu A, Leslie SJ, Shaw GS, Walden H. (2011) Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *EMBO J* 30, 2853-2867.
16. Chitra S, Nalini G, Rajasekhar G. (2012) The ubiquitin proteasome system and efficacy of proteasome inhibitors in diseases. *Int J Rheum Dis* 15, 249-260.
17. Christel C, Lee A. (2012)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent modulation of voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Biochim Biophys Acta* 1820, 1243-1252.

18. 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.
19. Dikic I. (2017) Proteasomal and autophagic degradation systems. *Annu Rev Biochem* 86, 193-224.
20. Dolphin AC. (2003) Beta subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* 35, 599-620.
21. Dolphin AC. (2009) Calcium channel diversity: multiple roles of calcium channel subunits. *Curr Opin Neurobiol* 3, 237-244.
22. Dolphin AC. (2012) Calcium channel auxiliary  $\alpha_2\delta$  and  $\beta$  subunits: trafficking and one-step beyond. *Nat Rev Neurosci* 13, 542-555.
23. Dolphin AC. (2016) Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *J Physiol* 594, 5369-5390.
24. Eroglu C, Allen NJ, Susman MW, O'Rourke NA, Park CY, Ozkan E, Chakraborty C, Mulinyawe SB, Annis DS, Huberman AD, Green EM, Lawler J, Dolmetsch R, Garcia KC, Smith SJ, Luo ZD, Rosenthal A, Mosher DF, Barres BA. (2009) Gabapentin receptor  $\alpha_2\delta$ -1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis. *Cell* 139, 380-392.
25. Felix R. (2006) Calcium channelopathies. *Neuromolecular Med* 8, 307-318.

26. Felix R, Calderón-Rivera A, Andrade A. (2013) Regulation of high-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channel function, trafficking, and membrane stability by auxiliary subunits. *WIREs Membr Transp Signal* 2, 207-220.
27. Felix R, Weiss N. (2017) Ubiquitination and proteasome-mediated degradation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and potential pathophysiological implications. *Gen Physiol Biophys* 36, 1-5.
28. Ferron L, Nieto-Rostro M, Cassidy JS, Dolphin AC. (2014) Fragile X mental retardation protein controls synaptic vesicle exocytosis by modulating N-type calcium channel density. *Nat Commun* 5, 3628.
29. Fu SJ, Jeng CJ, Ma CH, Peng YJ, Lee CM, Fang YC, Lee YC, Tang SC, Hu MC, Tang CY. (2017) Ubiquitin ligase RNF138 promotes episodic ataxia type 2-associated aberrant degradation of human Cav2.1 (P/Q-Type) calcium channels. *J Neurosci* 37, 2485-2503.
30. Gandini MA, Felix R. (2012) Functional interactions between voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and Rab3-interacting molecules (RIMs): new insights into stimulus-secretion coupling. *Biochim Biophys Acta* 1818, 551-558.
31. Gandini MA, Henríquez DR, Grimaldo L, Sandoval A, Altier C, Zamponi GW, Felix R, González-Billault C. (2014a) Cav2.2 channel cell surface expression is regulated by the light chain 1 (LC1) of the microtubule-associated protein B (MAP1B) via UBE2L3-mediated ubiquitination and degradation. *Pflugers Arch* 466, 2113-2126.

32. Gandini MA, Sandoval A, Zamponi GW, Felix R. (2014b) The MAP1B-LC1/UBE2L3 complex catalyzes degradation of cell surface Cav2.2 channels. *Channels (Austin)* 8, 452-457.
33. Gandini MA, Sandoval A, Felix R. (2014c) Patch-clamp recording of voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. *Cold Spring Harb Protoc* 2014, 329-325.
34. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. (1997) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
35. Gregory FD, Bryan KE, Pangršič T, Calin-Jageman IE, Moser T, Lee A. (2011) Harmonin inhibits presynaptic Cav1.3 Ca<sup>2+</sup> channels in mouse inner hair cells. *Nat Neurosci* 14, 1109–1111.
36. Groen JL, Andrade A, Ritz K, Jalalzadeh H, Haagmans M, Bradley TE, Jongejan A, Verbeek DS, Nürnberg P, Denome S, Hennekam RC, Lipscombe D, Baas F, Tijssen MA. (2015) *CACNA1B* mutation is linked to unique myoclonus-dystonia syndrome. *Hum Mol Genet* 24, 987-93.
37. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391, 85-100.
38. Hegde AN. (2004) Ubiquitin-proteasome-mediated local protein degradation and synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 73, 311-357.
39. Hidalgo P, Neely A. (2007) Multiplicity of protein interactions and functions of the voltage-gated calcium channel beta-subunit. *Cell Calcium* 42, 389-396.



40. Husnjak K, Dikic I. (2012) Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions. *Annu Rev Biochem* 81, 291-322.
41. Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, Doerks T, Julien P, Roth A, Simonovic M, Bork P, von Mering C. (2009) STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res* 37 (Database issue), D412-D416.
42. Jones OT, Bernstein GM, Jones EJ, Jugloff DG, Law M, Wong W, Mills LR. (1997) N-Type calcium channels in the developing rat hippocampus: subunit, complex, and regional expression. *J Neurosci* 17, 6152-64.
43. Jung T, Grune T. (2012) Structure of the proteasome. *Prog Mol Biol Transl Sci* 109, 1-39.
44. 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.
45. Kanner SA, Morgenstern T, Colecraft HM. (2017) Sculpting ion channel functional expression with engineered ubiquitin ligases. *Elife* 6, e29744.
46. Kantamneni S, Wilkinson KA, Henley JM. (2011) Ubiquitin regulation of neuronal excitability. *Nat Neurosci* 14, 126-128.
47. Kawaguchi M, Minami K, Nagashima K, Seino S. (2006) Essential role of ubiquitin-proteasome system in normal regulation of insulin secretion. *J Biol Chem* 281, 13015-13020.

48. Komander D, Rape M. (2012) The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* 81, 203-229.
49. Lacinová L. (2005) Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 24 (Suppl. 1), 1-78.
50. Lai CY, Ho YC, Hsieh MC, Wang HH, Cheng JK, Chau YP, Peng HY. (2016) Spinal Fbxo3-Dependent Fbxl2 Ubiquitination of Active Zone Protein RIM1 $\alpha$  Mediates Neuropathic Allodynia through CaV2.2 Activation. *J Neurosci* 36, 9722-9738.
51. Lipscombe D, Andrade A, Allen SE. (2013) Alternative splicing: Functional diversity among voltage-gated calcium channels and behavioral consequences. *Biochim Biophys Acta* 7, 1522-1529.
52. Marangoudakis S, Andrade A, Helton TD, Denome S, Castiglioni AJ, Lipscombe D. (2012) Differential ubiquitination and proteasome regulation of Ca<sub>v</sub>2.2 N-type channel splice isoforms. *J Neurosci* 32, 10365-10369.
53. Mabb AM, Ehlers MD. (2010) Ubiquitination in postsynaptic function and plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, 179-210.
54. Mochida S. (2018) Presynaptic calcium channels. *Neurosci Res* (en prensa).
55. Müller CS, Haupt A, Bildl W, Schindler J, Knaus HG, Meissner M, Rammner B, Striessnig J, Flockerzi V, Fakler B, Schulte U. (2010) Quantitative proteomics of the Ca<sub>v</sub>2 channel nano-environments in the mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 14950-14957.
56. Ndubaku C, Tsui V. (2015) Inhibiting the deubiquitinating enzymes (DUBs). *J Med Chem* 58, 1581-1595.

57. Nijman SM, Luna-Vargas MP, Velds A, Brummelkamp TR, Dirac AM, Sixma TK, Bernards R. (2005) A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* 123, 773-786.
58. Patel R, Bauer CS, Nieto-Rostro M, Margas W, Ferron L, Chaggar K, Crews K, Ramirez JD, Bennett DL, Schwartz A, Dickenson AH, Dolphin AC.  $\alpha 2\delta$ -1 gene deletion affects somatosensory neuron function and delays mechanical hypersensitivity in response to peripheral nerve damage. *J Neurosci* 33, 16412-16426.
59. Pinggera A, Striessnig J. (2016) Cav 1.3 (CACNA1D) L-type Ca<sup>2+</sup> channel dysfunction in CNS disorders. *J Physiol* 594, 5839-5849.
60. Ristic G, Tsou WL, Todi SV. (2014) An optimal ubiquitin-proteasome pathway in the nervous system: the role of deubiquitinating enzymes. *Front Mol Neurosci* 7, 72.
61. Robinson PS, Goochee CF. (1991) Kidney-specific enzyme expression by human kidney cell lines generated through oncogene transfection. *J Cell Physiol* 148, 54-59.
62. Ronchi VP, Klein JM, Haas AL. (2013) E6AP/UBE3A ubiquitin ligase harbors two E2 ubiquitin binding sites. *J Biol Chem* 288, 10349-10360.
63. Rougier J. S., Albesa M., Abriel H., Viard P. (2011) Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4-1(NEDD4-1) controls the sorting of newly synthesized Cav1.2 calcium channels. *J Biol Chem* 286, 8829-8838.

64. Sadowski M, Suryadinata R, Tan AR, Roesley SN, Sarcevic B. (2012) Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life* 64, 136-142
65. Sheng Y, Hong JH, Doherty R, Srikumar T, Shloush J, Avvakumov GV, Walker JR, Xue S, Neculai D, Wan JW, Kim SK, Arrowsmith CH, Raught B, Dhe-Paganon S. (2012) A human ubiquitin conjugating enzyme (E2)-HECT E3 ligase structure-function screen. *Mol Cell Proteomics* 11, 329-341.
66. Smit JJ, Sixma TK. (2014) RBR E3-ligases at work. *EMBO Rep* 15, 142-154.
67. Simms BA, Zamponi GW. (2014) Neuronal voltage-gated calcium channels: structure, function, and dysfunction. *Neuron* 82, 24-45.
68. Schneggenburger R, Han Y, Kochubey O. (2012) Ca<sup>2+</sup> channels and transmitter release at the active zone. *Cell Calcium* 52, 199-207.
69. Striessnig J. (2016) Voltage-gated calcium channels – from basic mechanisms to disease. *J Physiol* 594, 5817–5821.
70. Waithe D, Ferron L, Page KM, Chaggar K, Dolphin AC. (2011) Beta-subunits promote the expression of Ca<sub>v</sub>2.2 channels by reducing their proteasomal degradation. *J Biol Chem* 286, 9598-9611.
71. Wang HG, George MS, Kim J, Wang C, Pitt GS. (2007) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin regulates trafficking of Ca<sub>v</sub>1.2 Ca<sup>2+</sup> channels in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 27, 9086-9093.

72. Weiss N. (2015) The first disease connection for Cav2.2 channels. *Gen Physiol Biophys* 34, 217-219
73. Weiss N, Zamponi GW. (2017) Trafficking of neuronal calcium channels. *Neuronal Signaling* 1, NS20160003.
74. Wenzel DM, Lissounov A, Brzovic PS, Klevit RE. (2011) UBC7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids. *Nature* 474, 105-108.
75. 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.
76. 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.
77. Zamponi GW, Currie KP. (2013) Regulation of Cav2 calcium channels by G protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* 1828, 1629–1643.
78. Zamponi GW, Lory P, Perez-Reyes E. (2010) Role of voltage-gated calcium channels in epilepsy. *Pflugers Arch* 460, 395-403.
79. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. (2015) The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 67, 821-870.
80. Zhang J, Zhang X, Xie F, Zhang Z, van Dam H, Zhang L, Zhou F. (2014) The regulation of TGF-β/SMAD signaling by protein deubiquitination. *Protein Cell* 5, 503-517.