



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACANTENCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

**Caracterización del ciclo de transporte nuclear de la subunidad auxiliar β_3 de
los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje**

Tesis

Que presenta

M. en C. María Alejandra Corzo López

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGIA CELULAR

Directores de Tesis

Dr. Diego Ricardo Félix Grijalva

Dr. Ricardo González Ramírez

Ciudad de México

Junio, 2023

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por la beca otorgada para el desarrollo de mi Doctorado en Ciencias.

Al Doctor Ricardo Félix por permitirme realizar el proyecto en su laboratorio, por los consejos, enseñanzas y tips que han permitido mi crecimiento profesional. Al Doctor Ricardo González Ramírez por todas sus enseñanzas y consejos, así mismo por su dedicación en mi proceso de aprendizaje en el laboratorio.

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

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

A Mis compañeros de generación en especial a Landy, Kerlys, Sheila y David por sus risas y ser mi apoyo en todo momento. Así mismo, a mis compañeras de laboratorio Susana y Natalie, su amistad y risas hicieron fácil este camino.

A mi familia que en la distancia siempre estuvo conmigo, en especial a mi Madre Dora López por ser el motor de mi vida y a mi padre Luis Jose Corzo[†]. A la familia Torres-Cruz que me abrió las puertas de su hogar y me apoyo incondicionalmente.

A Francisco Torres por su paciencia durante todo mi proceso formativo, por ser mi lugar seguro en donde siempre encontré una voz de aliento para seguir adelante pese a las mil dificultades presentadas, y sobre todo gracias por tu amor.

Contenido

Prefacio	5
Resumen	6
Abstract	7
1. Introducción	8
1.1 Estructura y clasificación de los canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje	8
1.2 Fisiología molecular de la subunidad auxiliar Cav β	14
1.3 Localización nuclear de Cav β	19
1.4 Ciclo de transporte nuclear	22
1.5 La subunidad Cav β_3 y su transporte hacia el núcleo celular	27
2. Planteamiento del problema	32
3. Hipótesis de trabajo	32
4. Objetivos	33
4.1 Objetivo General	33
4.2 Objetivos Específicos	33
5. Materiales y Métodos	34
5.1 Clonas de ADNc	34
5.2 Mutagénesis sitio dirigida	37
5.3 Cultivo celular y transfección	38
5.4 Silenciamiento de B56 δ	40
5.5 Inmunofluorescencia	41
5.6 Inhibición del importe nuclear	42
5.7 Determinación de la vida media de Cav β_3	43
5.8 Inmunoelctrotransferencia (<i>Western blot</i>)	43
5.9 Ensayos de inmunoprecipitación por GFP Trap	45

5.10	Espectrometría de masas	45
5.11	Ensayo de proximidad de ligando (PLA; <i>Proximity Ligation Assay</i>)	46
6.	Resultados	48
6.1	Caracterización de las señales de localización nuclear en Cav β ₃	48
6.2	B56 δ como posible mediador del mecanismo <i>piggyback</i> utilizado por Cav β ₃	49
6.3	Efecto del silenciamiento de B56 δ	53
6.4	Posibles chaperonas de Cav β ₃	56
6.5	Interacción de Cav β ₃ con proteínas identificadas por espectrometría	60
6.6	Determinación de la vida media de Cav β ₃	68
6.7	Temporalidad del ciclo de transporte nuclear de Cav β ₃	72
6.8	Identificación y caracterización de la señal de exporte nuclear en Cav β ₃	73
7.	Discusión	78
7.1	Transporte nuclear de Cav β ₃ : mecanismo tradicional <i>versus piggyback</i>	78
7.2	Interacciones de Cav β ₃ con proteínas que favorecen su localización nuclear	80
7.3	Factores que favorecen la localización nuclear de Cav β ₃	82
7.4	Conclusiones y Perspectivas	83
8.	Referencias	85

Prefacio

El presente trabajo de tesis tuvo como finalidad estudiar el ciclo de transporte nuclear de la subunidad Cav β ₃ de los canales de Ca²⁺. La estrategia experimental empleada combino técnicas de biología molecular y microscopia confocal. El trabajo se realizó en el Laboratorio 55 del Departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN). La tesis fue dirigida por el Dr. Diego Ricardo Félix Grijalva, investigador titular del Departamento de Biología Celular del Cinvestav-IPN, y por el Dr. Ricardo Gonzalez Ramirez, investigador en Ciencias Médicas en el Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad del Hospital General “Dr. Manuel Gea Gonzalez”. El desarrollo experimental de esta tesis contó con la asesoría de los Dres. Oscar Hernández-Hernández, investigador titular del Laboratorio de Genética y Genómica del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”; Bulmaro Cisneros Vega, investigador titular del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav; Antony Boucard Jr. y Fernando Navarro García ambos investigadores titulares del Departamento de Biología Celular del Cinvestav. Durante el desarrollo de esta tesis de Doctorado fui beneficiada con una beca académica otorgada por del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Resumen

Los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav) son los principales reguladores del ingreso de calcio en las células excitables. Los canales Cav se clasifican en dos grupos conocidos como canales de alto y de bajo umbral de activación (HVA y LVA). Los canales HVA están constituidos por una subunidad principal conductora de los iones (Cav α_1) y por subunidades auxiliares que regulan su actividad llamadas Cav $\alpha_2\delta$ y Cav β . Estudios previos han mostrado que además de su papel dentro del complejo del canal en la membrana plasmática, la subunidad Cav β posee la capacidad de trasladarse al núcleo celular. Sin embargo, poco se sabe del papel que esta proteína pudiera estar jugando dentro del núcleo, ni sobre el mecanismo molecular que emplea para llegar a ese compartimento celular. Aquí se muestra evidencia de que la subunidad Cav β_3 posee señales de localización nuclear (NLS) que no son funcionales, sugiriendo que la proteína no emplea una vía de importe nuclear clásico, sino que su ingreso al núcleo podría estar asociada a otra proteína que funcionaría como acarreadora empleando un mecanismo conocido como *piggyback*. Los ensayos de espectrometría de masas y el análisis bioinformático permitieron identificar proteínas que podrían estar participando en el ingreso de Cav β_3 al núcleo, y mediante ensayos de ligación por proximidad (PLA) se encontró que hnRNPs y B56 δ podrían participar en el mecanismo de *piggyback* de Cav β_3 . Por otro lado, los ensayos de bioinformática y de mutagénesis dirigida permitieron identificar una señal de exporte nuclear (NES) funcional que controla la salida de Cav β_3 del núcleo, y que permitiría completar el ciclo de transporte nuclear de la proteína. Estos datos muestran un novedoso mecanismo molecular para el ciclo de transporte nuclear de Cav β_3 .

Abstract

Voltage-gated calcium (Cav) channels are primary regulators of calcium influx into excitable cells. Cav channels are classified into two groups known as high- and low-threshold activated channels (HVA and LVA, respectively). HVA channels are composed of a main ion-conducting subunit (Cav α_1) and auxiliary subunits that regulate Cav α_1 activity, called Cav $\alpha_2\delta$ and Cav β . Interestingly, previous studies have shown that in addition to its role within the channel complex in the plasma membrane, the Cav β subunit can translocate to the cell nucleus. However, little is known regarding the role played by this protein in the nucleus, nor the molecular mechanism used by Cav β to enter this cell compartment. The present work shows evidence that Cav β_3 has non-functional nuclear localization signals (NLS), suggesting that the protein does not use a classical nuclear import pathway. Instead, its entry into the nucleus could be facilitated by another protein acting as a carrier, using a mechanism known as piggyback. Likewise, mass spectrometry assays and bioinformatic analysis allowed the identification of proteins that could be involved in the entry of Cav β_3 into the nucleus, and using proximity ligation assays (PLA), we found that hnRNPs and B56 δ form complexes with Cav β_3 which pins them as likely candidates to participate in the piggyback mechanism of Cav β_3 entry into the nucleus. On the other hand, bioinformatics analyses and site-directed mutagenesis assays allowed the identification of a functional nuclear export signal (NES) that controls the exit of Cav β_3 from the nucleus, which would allow the completion of the protein's nuclear transport cycle. These results reveal a novel mechanism for the nuclear transport cycle of the Cav β_3 subunit.

1. Introducción

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

El calcio (Ca^{2+}) es un segundo mensajero que regula diversos procesos fisiológicos en células excitables, dentro de los cuales se encuentran la contracción muscular, la neurotransmisión, la secreción de hormonas y la expresión genética. El ingreso de este ion se encuentra finamente regulado por diversos mecanismos moleculares entre los que destacan los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Cav). La apertura de estos canales ocurre en respuesta a cambios en el potencial de la membrana, permitiendo el influjo de iones Ca^{2+} .

Los canales Cav son complejos heteromultiméricos que se encuentran localizados en la membrana plasmática, y su caracterización y consecuente clasificación se basa fundamentalmente en sus propiedades biofísicas y farmacológicas. De acuerdo con esta caracterización, existen las subfamilias de canales, unos llamados de alto umbral de activación, también conocidos como canales de tipo HVA (por sus siglas en inglés), que presentan una conductancia grande, una inactivación dependiente de voltaje lenta, y cuya actividad puede ser inhibida de manera específica con determinados fármacos o toxinas. Estos canales poseen un umbral de activación cercano a los -20 mV, y dentro de este grupo se encuentran los llamados canales de tipo L, N, P/Q y R. Por otro lado, existen los canales de bajo umbral de activación también conocidos como canales LVA, cuyo umbral de activación es mucho menor, cercano a voltajes de la membrana en el reposo (Lacinova, 2005; Catterall, 2011).

Desde el punto de vista molecular, los canales Cav se encuentran constituidos por una subunidad formadora del poro del canal que permite el paso de iones, conocida como subunidad $Cav\alpha_1$ (190-250 kDa). Esta proteína está compuesta por 24 segmentos transmembranales organizados en cuatro repetidos homólogos, cada uno con seis segmentos transmembranales (S1-S6) y un *loop* asociado a membrana entre los segmentos S5 y S6 de cada repetido que contribuye a la formación del poro, además de permitir la selectividad de iones Ca^{2+} (Fig. 1). El segmento S4 está cargado positivamente, y en conjunto con los segmentos S1-S3 de los cuatro repetidos, constituyen el dominio sensor de voltaje (Catterall, 2011; Simms & Zamponi, 2014; Wu *et al.*, 2015; Zamponi *et al.*, 2015; Catterall *et al.*, 2020).

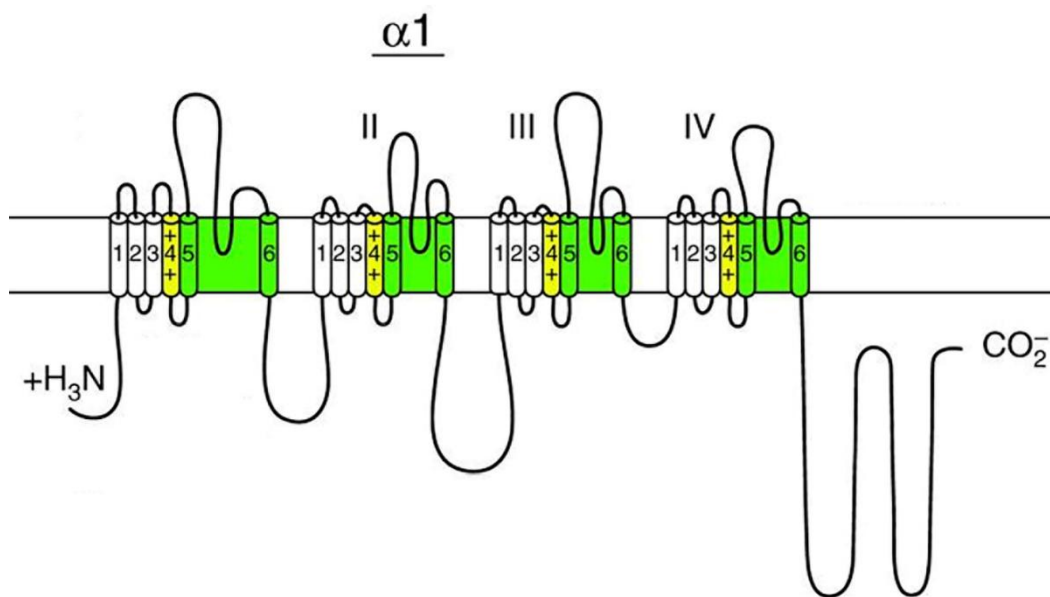


Figura 1. Estructura de la subunidad $Cav\alpha_1$. Representación esquemática de la subunidad formadora del poro ($Cav\alpha_1$) con los 4 repetidos homólogos característicos I, II, III, IV unidos por asas intracelulares y que contienen seis segmentos transmembranales. Tanto el amino como el carboxilo terminal son de localización intracelular (Modificada de Catterall, 2011).

La subunidad Cav α ₁ esta codificada por 10 genes distintos que a su vez permiten clasificar a los canales en tres grupos funcional y estructuralmente relacionados, llamados Cav1, Cav2 y Cav3 (Fig. 2). En el grupo de canales Cav1 se encuentran los canales Cav1.1-Cav1.4 también denominados canales tipo L. El grupo de los canales Cav2, por su parte, se encuentra constituido por los canales Cav2.1-Cav2.3 también nombrados P/Q, N y R, respectivamente. Los canales Cav1 y Cav2 se encuentran incluidos dentro de la subfamilia de canales HVA. Finalmente, los canales Cav3 están constituidos por los canales Cav3.1-Cav3.3 también conocidos como canales tipo T. Estos canales pertenecen a la subfamilia de canales de tipo LVA.

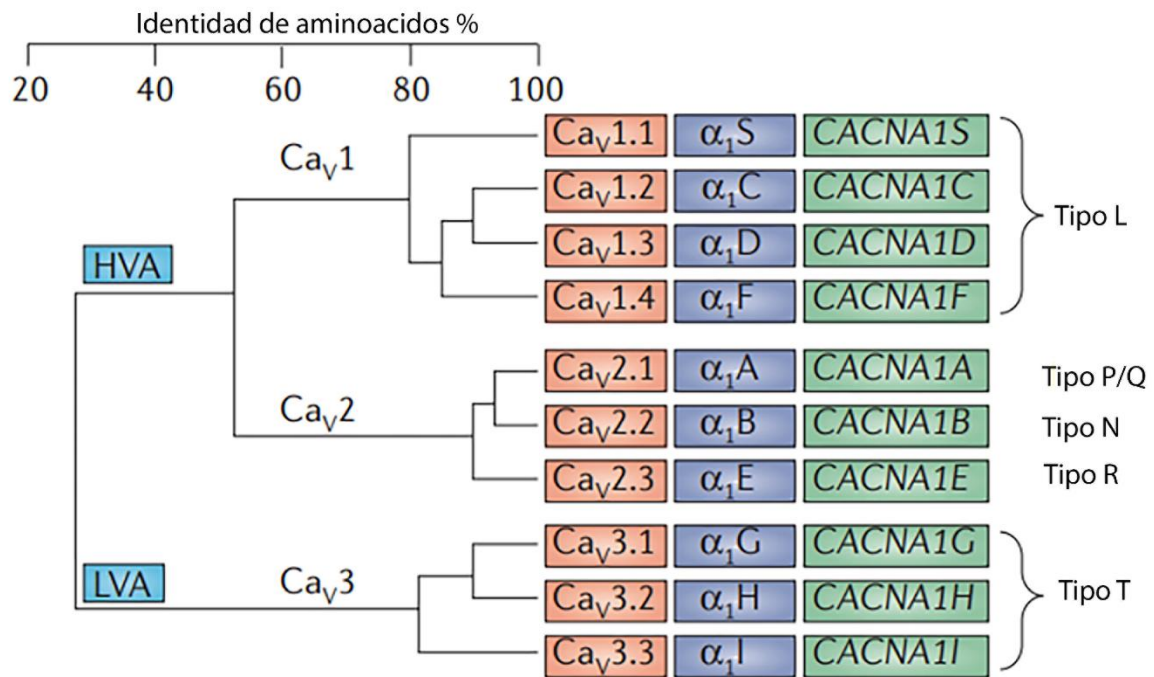


Figura 2. Clasificación de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. La subunidad Cavα1 se divide en tres grupos con base en el alineamiento de sus secuencias de aminoácidos en Cav1, Cav2 y Cav3. Los canales Cav1 y Cav2 son canales de tipo HVA, e incluyen a los tipos L, P/Q, N y R. Los canales Cav3 son de tipo LVA e incluyen a los canales tipo T. En azul se muestra la nomenclatura original de los canales, y en verde se muestra el nombre del gen de cada una de las subunidades (Modificado de Dolphin, 2012).

Los canales Cav1 y Cav2 (HVA), son considerados complejos heteromultiméricos por estar asociados a subunidades auxiliares denominadas Cavα2δ, Cavβ y Cavγ, que modulan las propiedades biofísicas de los canales, además de favorecer su traslado y mantenimiento en la membrana plasmática (Fig. 3).

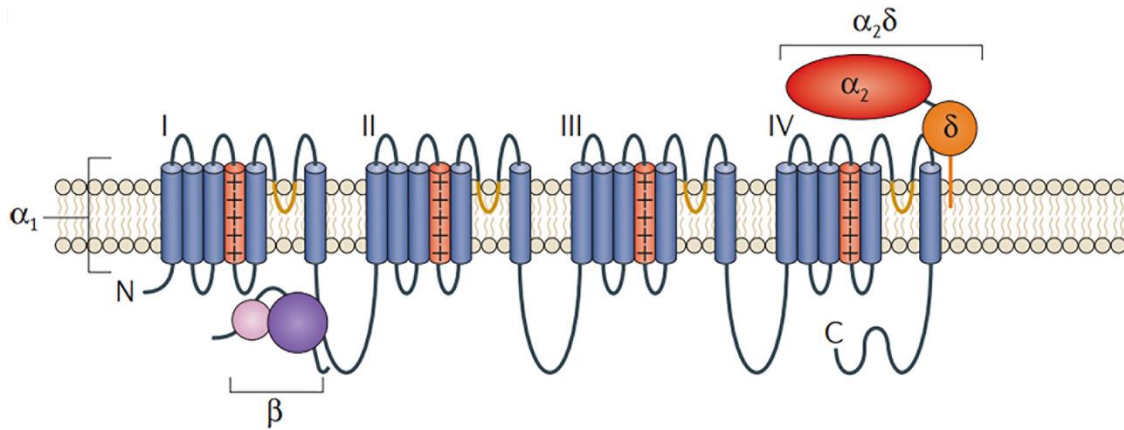


Figura 3. Estructura de los canales de tipo HVA. Los canales de tipo HVA se asocian a subunidades auxiliares. La Figura muestra la organización estructural de la subunidad formadora del poro Cav α_1 y las subunidades auxiliares Cav $\alpha_2\delta$ y Cav β (Dolphin, 2012).

La subunidad Cav $\alpha_2\delta$ (~170 kDa) posee cuatro isoformas cada una producto de un gen diferente, a su vez cada isoforma posee diversas variantes de *splicing* alternativo. Como se describió anteriormente, la subunidad Cav $\alpha_2\delta$ es traducida como una pre-proteína que luego es procesada proteolíticamente generando los péptidos α_2 (~150 kDa) y δ (~17-25 kDa). Ambos péptidos están N-glicosilados y se mantienen unidos por un puente disulfuro. En el extremo amino de α_2 se encuentra un péptido señal que indica una localización extracelular, mientras que el péptido δ se mantiene anclado a la membrana por medio de un enlace glicofosfatidilinositol (GPI). Desde el punto de vista estructural, el péptido α_2 contiene dos dominios cache, un dominio similar al Factor A de von Willebrand A (WVA) y una región llamada *metal ion-dependent adhesion site* (MIDAS; Davies *et al.*, 2010; Dolphin, 2012; Felix *et al.*, 2013).

La localización de la subunidad Cav $\alpha_2\delta$ en la membrana está dada principalmente en balsas lipídicas para favorecer su asociación con la subunidad

$Cav\alpha_1$. Estudio de la estructura del complejo del canal $Cav1.1$ han mostrado que la interacción de $Cav\alpha_2\delta$ con el canal, está mediada por los dominios VWA y el dominio Cache1, que se asocian con los repetidos I-III del canal (Wu *et al.*, 2015). Por otro lado, dentro de las principales funciones que realiza $Cav\alpha_2\delta$ en el complejo del canal, está la de promover la localización membranal del complejo de los canales, así como la de modificar sus propiedades biofísicas al modificar sus propiedades cinéticas. Se sabe también que las modificaciones postraduccionales y la integridad de $Cav\alpha_2\delta$ son esenciales para su correcto funcionamiento, y que las alteraciones en el corte proteolítico o en la formación de los enlaces disulfuro entre los péptidos α_2 y δ evitan la localización membranal del complejo de canales y el consecuente aumento en la densidad de la corriente (Dolphin, 2012; Calderon-Rivera *et al.*, 2012).

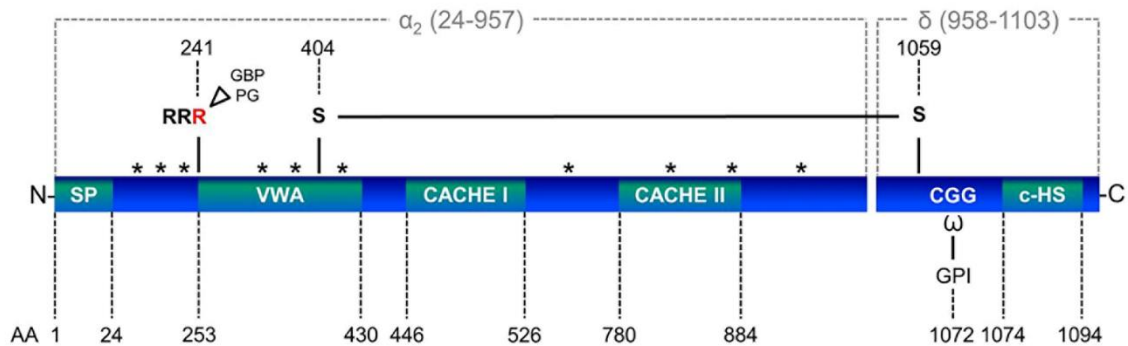


Figura 4. Estructura y dominios de la subunidad $Cav\alpha_2\delta$. El esquema muestra la conformación estructural de la subunidad $Cav\alpha_2\delta$ y sus dominios. SP: región del péptido señal; los asteriscos indican los potenciales sitios de glicosilación. En la parte superior de la Figura se resalta las regiones α_2 y δ unidas por un enlace disulfuro (Modificada de Geisler *et al.*, 2014).

Por otra parte, la subunidad $Cav\beta$ (~55 KDa) es una proteína citosólica, que interactúa con los canales $Cav1$ y $Cav2$ a través de su *loop* intracelular que une los

dominios I y II en una región conocida como dominio de interacción α (AID). La asociación de Cav β con la subunidad formadora del poro del canal modifica las propiedades biofísicas de este, provoca un aumento en la densidad de la corriente y modifica la dependencia al voltaje de la activación (Opatowsky *et al.*, 2003). Se sabe también que Cav β cumple un papel como proteína chaperona, al promover la localización membranal de los canales y evitando su degradación. (Karunasekara *et al.*, 2009) Además, por la localización citoplasmática de Cav β , es blanco de diversas cinasas y fosfatasas que a su vez modulan la actividad de los canales (Felix, 2005; Felix *et al.*, 2013).

La subunidad Cav γ (~32 kDa) es una glicoproteína que posee cuatro dominios transmembranales, y de la cual se conocen 8 isoformas (Cav γ ₁-Cav γ ₈). En el caso particular de Cav γ ₁ sólo se expresa en el musculo esquelético, y se ha reportado puede alterar las propiedades funcionales de los canales Cav al poseer un efecto inhibitorio en su actividad. Por su parte, la subunidad Cav γ ₂ es de localización neuronal y se sabe que disminuye la densidad de la corriente a través de los canales Cav2.2 (Sandoval *et al.*, 2007a; 2007b). Sin embargo, además de su papel como subunidad auxiliar de los canales Cav neuronales, también algunas de las subunidades γ son reconocidas como proteínas reguladoras del receptor AMPA (Tomita *et al.*, 2007).

1.2 Fisiología molecular de la subunidad auxiliar Cav β

La subunidad Cav β es una proteína citosólica con cuatro isoformas (Cav β ₁-Cav β ₄), cada una codificada por un gen diferente y a su vez con múltiples variantes por *splicing* alternativo. Esta subunidad modula las características biofísicas de los canales

HVA (Cav1 y Cav2), y promueve su localización membranal al fomentar su tránsito hacia la superficie celular y evitar su degradación. Como se mencionó anteriormente (Fig. 3), la subunidad Cav β interactúa con la subunidad formadora del poro (Cav α_1) mediante el AID que se encuentra en el *loop* intracelular que conecta los repetidos I y II (Pragnell *et al.*, 1994; Dolphin, 2003; Opatowsky *et al.*, 2003).

La subunidad Cav β posee una estructura modular que consiste en cinco dominios denominados NH₂, *Src homology 3* (SH3), HOOK, *guanylate kinase* (GK) y COOH (Fig. 5). Los dominios SH3 y GK están altamente conservados en todas las isoformas. Los dominios SH3 son comúnmente conocidos por ser los que median las interacciones proteína-proteína, poseen una superficie hidrofóbica y se acoplan a sitios de unión a prolina (PxxP). La organización modular de los dominios SH3-HOOK-GK de Cav β ubica a esta subunidad dentro de las proteínas denominadas “*membrane-associated guanylate kinases*” (MAGUKs), cuya característica principal es actuar como molécula de andamiaje, permitiendo la formación de complejos multiprotéicos. Sin embargo, la clasificación como proteína MAGUK es parcial, debido a que solo está basada en una característica de su conformación estructural, por lo que sus funciones no están completamente asociadas a las de una proteína MAGUKs (Buraei & Yang, 2010).



Figura 5. Organización estructural de la subunidad Cav β . La proteína se encuentra organizada en cinco dominios según se indica (Buraei & Yang, 2010).

Las proteínas con dominios GK pertenecen a la familia de monofosfato cinasas, que catalizan la transferencia reversible del grupo fosfato del ATP y del GMP para producir ADP y GDP. De manera general, Cav β posee algunas características de estas proteínas, sin embargo, carece de sitio catalítico; esto convierte a los dominios GK que carecen de actividad cinasa, en dominios de interacción. En este dominio se encuentra una región denominada *AID-binding pocket* (ABP), que participa en la interacción con el AID de la subunidad Cav α_1 . Sin embargo, estudios de cristalografía muestran que otros dominios de Cav β también pueden participar en la interacción con la región de la subunidad Cav α_1 (Buraei & Yang, 2010; 2013). Durante mucho tiempo se consideró el sitio de interacción β -*interaction domain* (BID) como la región de Cav β que se unía con la AID (De Waard *et al.*, 1994); sin embargo, actualmente se acepta que el BID no está involucrado en la unión directa con AID, aunque si tiene un papel estructural necesario para llevar a cabo la interacción (Chen *et al.*, 2004).

La subunidad Cav β_1 se expresa principalmente en el cerebro, el corazón y el músculo esquelético. Por su parte, la variante Cav β_{1a} se expresa exclusivamente en el músculo esquelético, y los estudios en animales nocaout para Cav β_{1a} mueren por asfixia inmediatamente después del nacimiento, debido a alteraciones en el acople

excitación-contracción (Gregg *et al.*, 1996). La subunidad Cav β ₂ se expresa principalmente en el corazón, especialmente la variante Cav β _{2b}, y el nocaout de esta subunidad genera la muerte de los organismos en el periodo embrionario debido a la ausencia de contracciones cardiacas. Dos mutaciones puntuales en esta subunidad están relacionadas a enfermedades cardiovasculares y mutaciones asociadas al síndrome de Brugada (Antzelevitch *et al.*, 2007; Cordeiro *et al.*, 2009).

Por su parte, la subunidad Cav β ₃ se expresa en la mayoría de los tejidos, y aunque los ratones nocaout para esta subunidad sobreviven, si presentan alteraciones a la percepción del dolor, debido probablemente a la reducción de canales tipo N en la membrana (Murakami *et al.*, 2002). En estos mismos animales, aunque la producción de insulina se ve incrementada, no se observa una diferencia en la morfología de los islotes pancreáticos con respecto a los ratones silvestres (Berggren *et al.*, 2004).

Finalmente, la subunidad Cav β ₄ se expresa en el cerebelo y su relevancia se ha puesto de manifiesto debido a los estudios en el modelo del ratón aletargado que no expresa la proteína. La mutación de Cav β ₄ en este modelo animal se produce por la inserción que genera un codón de paro prematuro. Los ratones aletargados presentan ataxia, convulsiones y epilepsia con crisis de ausencia. De manera interesante, una mutación puntual en Cav β ₄ (R482X) que carece de 38 aminoácidos (aa) en el extremo carboxilo terminal de la proteína se encuentra en pacientes con epilepsia mioclónica juvenil (Escayg *et al.*, 2000).

Dada su localización citoplasmática, Cav β interactúa con diversas proteínas que a su vez permiten la regulación de la actividad del canal, como es el caso de las RGK

GTPasas (Rad, Rem, Rem 2 Gem/Kir), miembros de la súper familia de proteínas G monoméricas. Inicialmente se pensó que la inhibición de la actividad del canal estaba dada por una competencia entre RGK y las subunidades Cav β , y que la asociación entre RGK y Cav β evitaba el efecto regulatorio que tiene Cav β sobre el canal (Beguin *et al.*, 2001). Sin embargo, posteriormente se mostró que la interacción de RGK involucraba el complejo Cav α_1 -Cav β en el que, posiblemente, Cav β permite un cambio conformacional en Cav α_1 que favorece la interacción de Cav α_1 y las RGK (Fan *et al.*, 2010). Esto generaría un efecto inhibitorio sobre la actividad del canal debido a una disminución de canales en la membrana, o a modificaciones en sus propiedades biofísicas, como ocurre con la proteína Rem que inhibe la actividad de los canales Cav1.2 al disminuir su probabilidad de apertura (Yang & Colecraft, 2013).

Otra de las proteínas que interactúan con Cav β es Bestrofina 1, un canal de cloruro expresado, entre otros sitios, en el epitelio pigmentario de retina. En este caso, se ha reportado que Bestrofina 1 tiene un efecto inhibitorio en la actividad de los canales de calcio. Aunque el mecanismo de esta regulación aún no se encuentra descrito, algunos estudios sugieren que la regulación está mediada por la interacción del dominio SH3 de Cav β con un motivo rico en prolinas de Bestrofina 1 (Reichhart *et al.*, 2010).

Por otro lado, Ahnak es una proteína de señalización y andamiaje que ha sido reportada como proteína de interacción de Cav β . Diversos estudios muestran que esta interacción proporciona un vínculo directo para la regulación en la actividad de los canales, y en concreto una disminución de su actividad, posiblemente debido a las fosforilaciones de la Cav β o incluso del canal mismo (Buraei & Yang, 2010; 2013;

Davies *et al.*, 2014). De esta manera, Cav β es blanco de diversas fosforilaciones que regulan la actividad del canal. Por ejemplo, Cav β_{2a} es fosforilada en el residuo Ser574 por PKB, en respuesta al aumento de fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), lo cual resulta en un aumento de las corrientes debido al incremento en la expresión de canales en la membrana plasmática (Viard *et al.*, 2004). Estudios de fosforilación *in vitro* muestran que esta isoforma de Cav β también es blanco de la cinasa dependiente de AMPc (PKA), en los residuos de serina 459, 478 y 479 (Gerhardstein *et al.*, 1999). Asimismo, la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG) fosforila a Cav β_{2a} en el residuo Ser496 resultado en una inhibición de la actividad de los canales Cav1.2 (Yang *et al.*, 2007).

Estos datos destacan la importancia de la subunidad Cav β como elemento regulador de los canales al estar involucrada en distintos eventos de señalización y de interacción con otras proteínas, y finalmente muestran los diversos papeles de desempeña Cav β fuera del complejo del canal.

1.3 Localización nuclear de Cav β

Como se mencionó con anterioridad, la función principal de la subunidad Cav β es regular la actividad de los canales de Ca²⁺, sin embargo, diversos estudios muestran que su función puede estar incluso en otros compartimentos celulares fuera del complejo de canal, como es el caso del núcleo. Un ejemplo de ello es la subunidad Cav β_1 , cuya función principal es favorecer el acople excitación-contracción (E-C). Sin embargo, Taylor y sus colaboradores (2014) reportaron que esta subunidad además podía inhibir la expresión de la miogenina en las células progenitoras de músculo al

unirse al promotor *Myog*. También se reportó que Cav β_{1a} a través de su extremo NH₂ terminal, podría interactuar con el dominio COOH de la troponina T (TnT), una proteína involucrada en formación del complejo E-C que además cuenta con dominios de unión al DNA. Además, otras investigaciones han sugerido que la interacción de Cav β_{1a} con TnT3 favorece su localización nuclear, y tomando en cuenta los dominios de unión al DNA de TnT3, este complejo podría estar participando en la regulación de la transcripción de diversos genes (Zhang *et al.*, 2015).

Por otro lado, Zhang y sus colaboradores (2010) reportaron que la subunidad Cav β_3 podría estar interactuando con una isoforma de Pax6, llamada Pax6(S), y que dicha interacción podría estar mediada por los dominios SH3-HOOK-GK que se encuentran en Cav β_3 , y el dominio S de Pax6(S). También se ha reportado que la actividad transcripcional de Pax6(S) disminuye al sobreexpresar Cav β_3 , y en este escenario, se ha propuesto que un papel para la subunidad fuera del complejo del canal como un posible elemento regulador de la transcripción.

Asimismo, se sabe que Cav β_{4c} tiene una expresión preferencial en las neuronas vestibulares y cerebelosas profundas, pero además se ha reportado que podría interactuar con un *chromo shadow domain* (CSD) presente en la proteína HP1Y, y que esta interacción podría estar mediada por una secuencia consenso PXVXL localizada en el carboxilo de Cav β_{4c} . Dicha secuencia está presente en las cuatro isoformas de Cav β , sin embargo, Cav β_{4c} al poseer un dominio GK truncado, expone esta secuencia con mayor facilidad, permitiendo la interacción con HP1Y. Por otro lado, HP1Y es una proteína adaptadora con funciones sumamente importantes en el proceso de la formación de la heterocromatina. Aunque la función de esta interacción molecular se

desconoce, si abre la posibilidad para un papel funcional de Cav β_{4c} en la regulación genética (Xu *et al.*, 2011).

Otra isoforma de Cav β que ha sido reportada por poseer una localización nuclear en miocitos y neuronas es la subunidad Cav β_{4b} . Aunque el mecanismo de localización nuclear no es claro, se ha reportado que el extremo NH₂ de Cav β_{4b} es determinante para su localización en este compartimento celular. Asimismo, se ha planteado que la localización nuclear está regulada por la actividad de los canales tipo L, puesto que al sobreexpresar estos canales, la localización nuclear de Cav β_{4b} se ve alterada, lo cual resulta razonable considerando la función de las subunidades Cav β en la regulación y mantenimiento de los canales Cav1-Cav2 en la membrana plasmática (Subramanyam *et al.*, 2009).

Por otro lado, Tadmouri y sus colaboradores (2012) describieron la ruta celular que emplea la subunidad Cav β_4 en su tránsito hacia al núcleo, y que está regulada por la actividad eléctrica en la membrana. Así, una vez que ocurre la despolarización membranal, se promueve la interacción de Cav β_4 con la subunidad reguladora de la proteína fosfatasa 2A llamada B56 δ , en el citoplasma. Posteriormente, este complejo ingresa al núcleo, y se une al receptor α de la hormona tiroidea (TR α) lo cual permite su interacción con el promotor del gen de tirosina hidroxilasa (TH). Finalmente, HP1 γ se asocia con este complejo y se reprime la transcripción.

De igual forma se ha reportado que Cav β_4 regula la proliferación celular y que su interacción con B56 δ podría estar participando en la regulación de este proceso (Rima *et al.*, 2017a). Además, la subunidad Cav β_4 inhibe la expresión ciclina D1, proteína que

participa en la progresión del ciclo celular y de *Axin2* un miembro de la familia de genes que responden a la activación de la vía de Wnt. Esta inhibición esta mediada por la interacción de $Cav\beta_4$ con TCF4. $Cav\beta_4$ evita la liberación del represor del gen, de tal manera que TCF4 no puede unirse a elementos de respuesta Wnt (WRE) localizados en la región promotora de genes activados por la vía Wtn y promover su expresión (Rima *et al.*, 2017b).

1.4 Ciclo de transporte nuclear

El complejo del poro nuclear (NPC), localizado en la envoltura nuclear, regula el intercambio de macromoléculas entre el núcleo y el citoplasma. Este complejo se forma por la fusión de la membrana nuclear interna y externa formando un canal constituido por diversas proteínas llamadas nucleoporinas. Además de permitir el transporte de macromoléculas, el NPC también participa en la regulación de la transcripción, organización de la cromatina, entre otros eventos celulares (Beck & Hurt, 2017).

Las macromoléculas que poseen un peso molecular >40 kDa requieren un transporte activo a través del NPC mediado por factores de transporte solubles que permiten el ciclo de transporte entre el núcleo y el citoplasma. Estos factores pertenecen a una familia de moléculas denominadas carioferinas, entre las que se encuentran las importinas, involucradas en el transporte de proteínas hacia el núcleo, y otro grupo denominado exportinas cuya función es mediar el tránsito de proteínas que se encuentran en el núcleo hacia el citoplasma (Stewart, 2007).

Existen diversas vías de ingreso al núcleo, incluso a la fecha se han reportado más de 20 distintos tipos de carioferinas. El transporte nuclear mejor caracterizado se da por la vía del importe clásico, en el que las carioferinas α -importina y β -importina participan al reconocer señales de localización nuclear (NLS) en las proteínas susceptibles de ser translocadas al núcleo. Las NLS son regiones de aa básicos que se localizan en las proteínas que son dirigidas al núcleo. Estas señales pueden ser monopartitas, como las NLS del virus SV-40 (¹²⁶PKKKRRV¹³²), o de tipo bipartita que involucra los mismos aa básicos, pero separados por 15-20 aa de cualquier tipo, como ejemplo la NLS que se encuentra en la nucleoplasmina (¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKKK¹⁷⁰) (Lange *et al.*, 2007).

En la vía del importe clásico, las NLS son reconocidas por las α -importinas en el citoplasma. Este tipo de proteínas están constituidas por varios dominios armadillo (ARM) que conforman una proteína con forma de banana. El sitio de unión con la NLS está constituido por un arreglo de triptófano, asparagina y residuos acídicos. Los sitios de unión para las NLS de tipo monopartita se encuentran en los repetidos ARM 1-4 y 6-8, mientras que en el caso de las NLS bipartitas, se emplean los mismos sitios de unión, siendo los repetidos 1-4 ocupados por grupos de aa básicos largos, y los repetidos 6-8 por grupos de aa básicos cortos. El dominio amino de la α -importina se ensambla con la β -importina a través de un dominio de unión a la β -importina conocido como IBB (Fig. 6; Stewart, 2007).

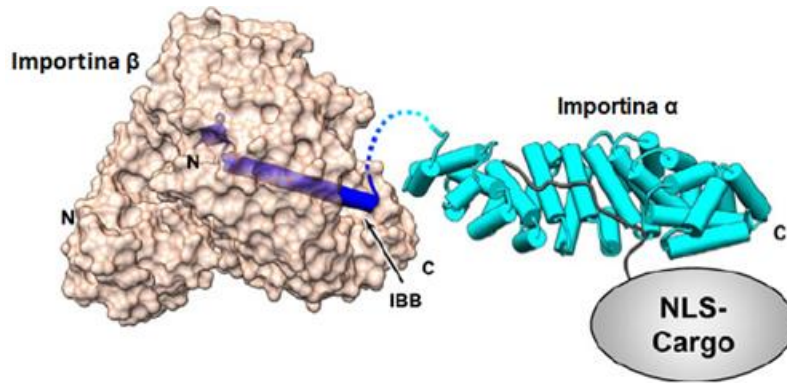


Figura 6. Complejo de importe nuclear clásico. Esquema de la formación del complejo de importe α/β importinas y su unión con la proteína cargo (Modificado de Pumroy & Cingolani, 2015).

Una vez que este complejo ha ingresado al núcleo, la RanGTP se une a la β -importina, generando un cambio conformacional que permite la liberación de la proteína cargo de la α -importina. Así, las importinas quedan disponibles y regresan al citoplasma para un nuevo ciclo de transporte.

La energía para el transporte nuclear es proporcionada por las RanGTPasas, dado por ciclos de conversión de RanGTP a RanGDP que están modulados por las proteínas RanGEF (factor intercambiador de nucleótidos) localizadas en el núcleo, mientras que las proteínas RanGAP (Proteína activadora de GTPasas) se localiza en el citoplasma (Fig. 7). Al estar en distintos compartimentos, se genera una direccionalidad por un gradiente asimétrico de proteínas Ran distribuidas entre el núcleo y el citoplasma, con RanGTP enriquecida en el núcleo y RanGDP en el citoplasma actuando como un *switch* molecular (Wagstaff & Jans, 2009; Lange *et al.*, 2015).

El transporte nuclear sucede de una manera análoga, en donde las carioferinas involucradas son nombradas exportinas, estas proteínas reconocen señales de transporte nuclear (NES) caracterizadas por poseer motivos ricos en leucinas, en las proteínas que van a ser transferidas del núcleo al citoplasma. Las regiones consenso que definen a las NES están constituidas por 10-15 residuos de aa que poseen varios aa hidrofóbicos de forma separada (HX₂₋₃HX₂₋₃HXH), como isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina o valina. Cabe mencionar que la proteína CRM1, también conocida como XP1, es una de las principales exportinas encargada del transporte del núcleo al citoplasma de al menos 230 proteínas. Una vez CRM1 se une a la proteína cargo, se asocia con RanGTP formando un complejo heterotrimérico, que viaja al citoplasma a través del poro nuclear. Por último, la hidrólisis del GTP promueve la liberación de la proteína cargo en el citoplasma (Ishizawa *et al.*, 2015).

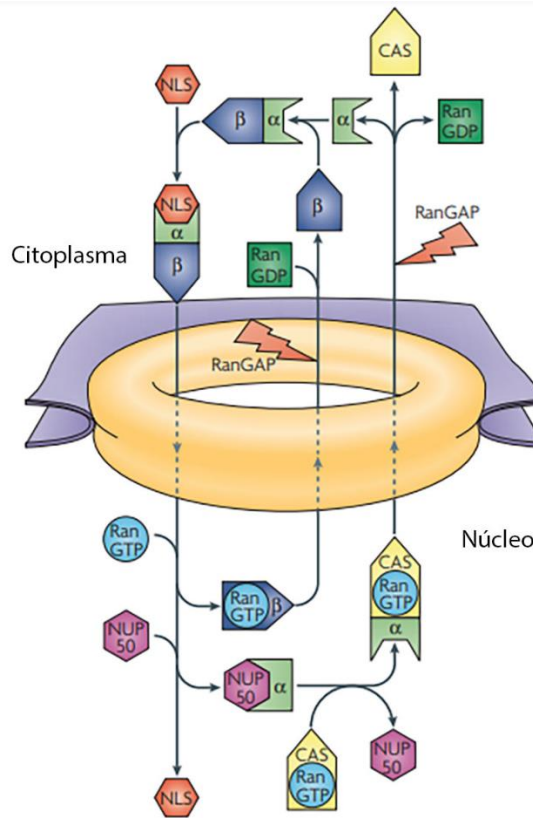


Figura 7. Vía de importe nuclear clásico. Representación de la vía de importe clásico mediada por α/β importinas. También es posible observar el factor de exporte nuclear (CAS) que permite el retorno de α importina al citoplasma (Modificada de Stewart, 2007).

Existen otras vías de ingreso al núcleo, conocidas como vías no clásicas o no convencionales, debido a que las proteínas no poseen NLS, como en el caso de β -catenina que no posee ninguna señal de localización nuclear, y que su transporte al núcleo ocurre por una interacción directa de β -catenina y los componentes del NPC. Sin embargo, otro grupo de proteínas que carecen de NLS también ingresan al núcleo empleando un mecanismo conocido como *piggyback*, que involucra a una proteína acarreadora que posee una NLS, mediando así el transporte al núcleo de proteínas que

carecen de una NLS (Wagstaff & Jans, 2009; Tadmouri *et al.*, 2012; Shengnan *et al.*, 2013; Rima *et al.*, 2016).

1.5 La subunidad Cav β ₃ y su transporte hacia el núcleo celular

Poco se conoce sobre el mecanismo molecular que emplea la isoforma Cav β ₃ para llegar al núcleo, o cuál es la función que pudiese estar desempeñando en este compartimento celular. Estudios realizados previamente en nuestro laboratorio, en el que se transfectaron células HeLa con un plásmido que codifica para la subunidad Cav β ₃-GFP y su posterior análisis por microscopia confocal, muestran la localización nuclear de Cav β ₃-GFP. También se analizó la localización subcelular del segmento amino de Cav β ₃ que contiene los dominios NH₂-SH3-HOOK y el segmento carboxilo que contiene los dominios SH3-GK-COOH. Esto se analizó a partir de la generación de dos clonas denominadas p4GFP-NSH y p4GFP-SGCB respectivamente. Brevemente, para el dominio amino se encontró una localización principalmente nuclear, mientras que en el extremo carboxilo la localización fue mayormente citoplasmática (Fig. 8).

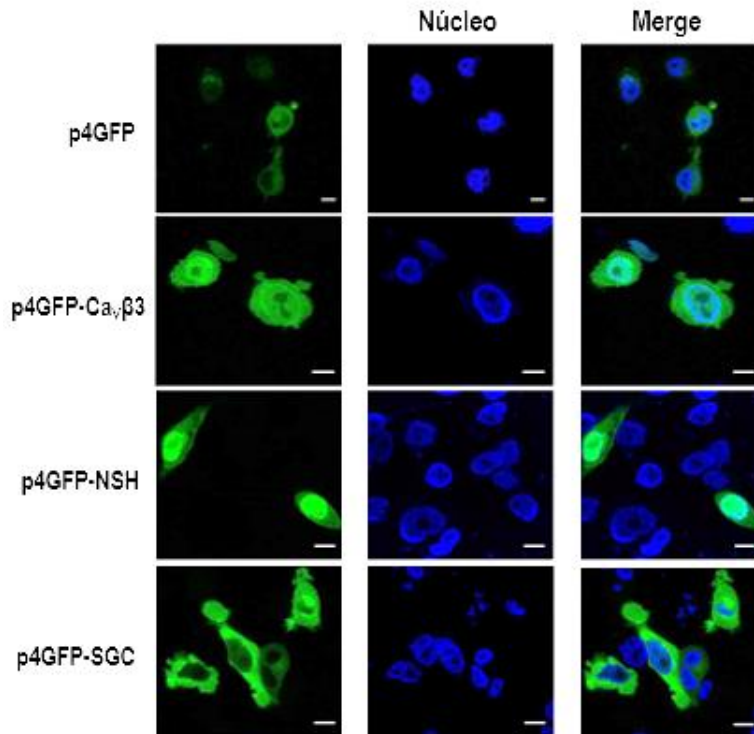


Figura 8. Localización subcelular de Cav β 3. Imágenes representativas de microscopía confocal de células HeLa transfectadas con las clonas p4GFP, p4GFP-Cav β 3, p4GFP-NSH, p4GFP-SGC. En el canal verde se observa la localización subcelular de la subunidad Cav β 3, así como las construcciones con los dominios amino y carboxilo. En el canal azul se muestran los núcleos teñidos con TO-PRO (Castillo, 2016).

Para empezar a caracterizar el transporte nuclear de Cav β 3, se realizaron experimentos tendientes a esclarecer si este evento está dado por un mecanismo de importe clásico, mediado por α y β importinas, usando ivermectina. Este último es un fármaco que se une a las α -importinas y evita que estas se unan a las proteínas cargo (que poseen NLS), evitando así la formación del complejo proteína/ α -importina-/ β -importina, y por lo tanto la inhibición del importe nuclear (Wagstaff *et al.*, 2012). El tratamiento se administró a células HeLa transfectadas de forma transitoria con la construcción Cav β 3-GFP. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se

trataron con 25 μM de ivermectina durante 4 h a 37°C en una atmosfera de 5% CO_2 . Posteriormente, las células se analizaron por microscopia confocal. En la condición control (DMSO) se observó la localización de Cav β_3 -GFP principalmente en el núcleo mientras que, en las células tratadas con ivermectina, se evidenció una distribución principalmente citoplasmática, lo cual sugirió que Cav β_3 -GFP estaba empleando una vía clásica de importe al núcleo mediada por α/β importinas (Fig. 9).

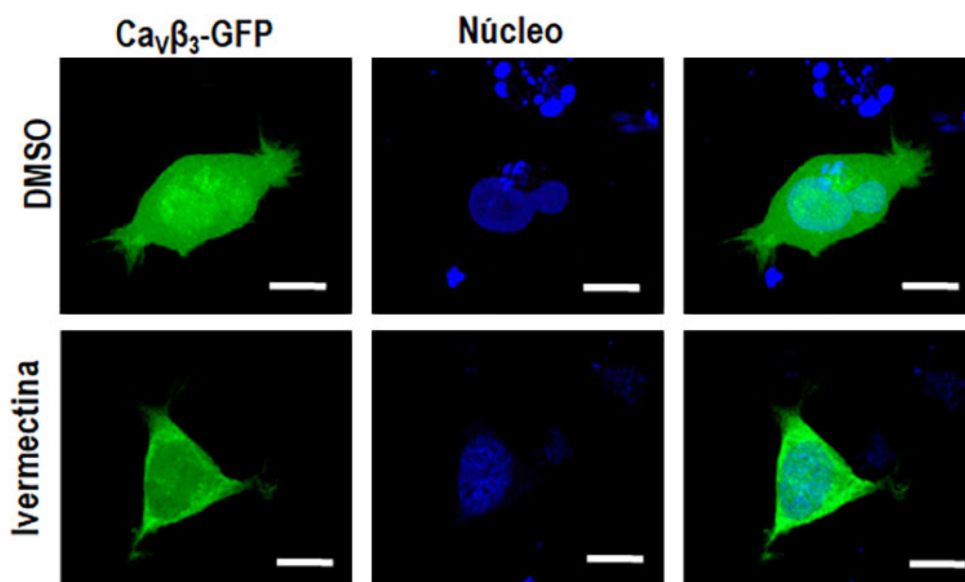


Figura 9. Inhibición del importe nuclear clásico. Imágenes representativas de microscopia confocal de células HeLa transfectadas con Cav β_3 -GFP. En el canal verde se observa la localización subcelular de Cav β_3 -GFP, en el canal azul se muestran los núcleos tenidos con Hoechst. En el panel superior se observa la condición control (células incubadas con el vehículo, DMSO). En el panel inferior se muestran las células incubadas con 25 μM de ivermectina por 4 h. La escala corresponde a 10 μm (Corzo-López, 2018).

Teniendo en consideración estos resultados, a continuación, se realizaron análisis bioinformáticos en búsqueda de las NLS que pudieran estar mediando este evento de transporte. Los resultados de este análisis sugirieron una NLS de tipo bipartita localizada en el dominio HOOK de Cav β ₃, consistente con los resultados mostrados en la Figura 8, donde se observa la localización nuclear del segmento amino. Para corroborar estos datos, a continuación, se determinó la funcionalidad de la NLS por medio de experimentos de biología molecular en los cuales se eliminaron las NLS identificadas, ya sea juntas o por separado. De manera inesperada e interesante, los resultados de estos estudios no mostraron una relocalización de las construcciones mutantes de Cav β ₃-GFP (Fig. 10).

Estos datos sugieren que el mecanismo molecular que emplea Cav β ₃ en su paso al núcleo, no se encuentra mediado por la NLS identificada por bioinformática. Sin embargo, abren la posibilidad de que el transporte nuclear de Cav β ₃ pudiera estar regulado por un importe no clásico de tipo *piggyback*. De esta forma, las NLS en Cav β ₃ no resultarían esenciales para su localización nuclear, puesto que la proteína acarreadora sería la que poseyera las NLS funcionales y permitiría el transporte al núcleo de Cav β ₃.

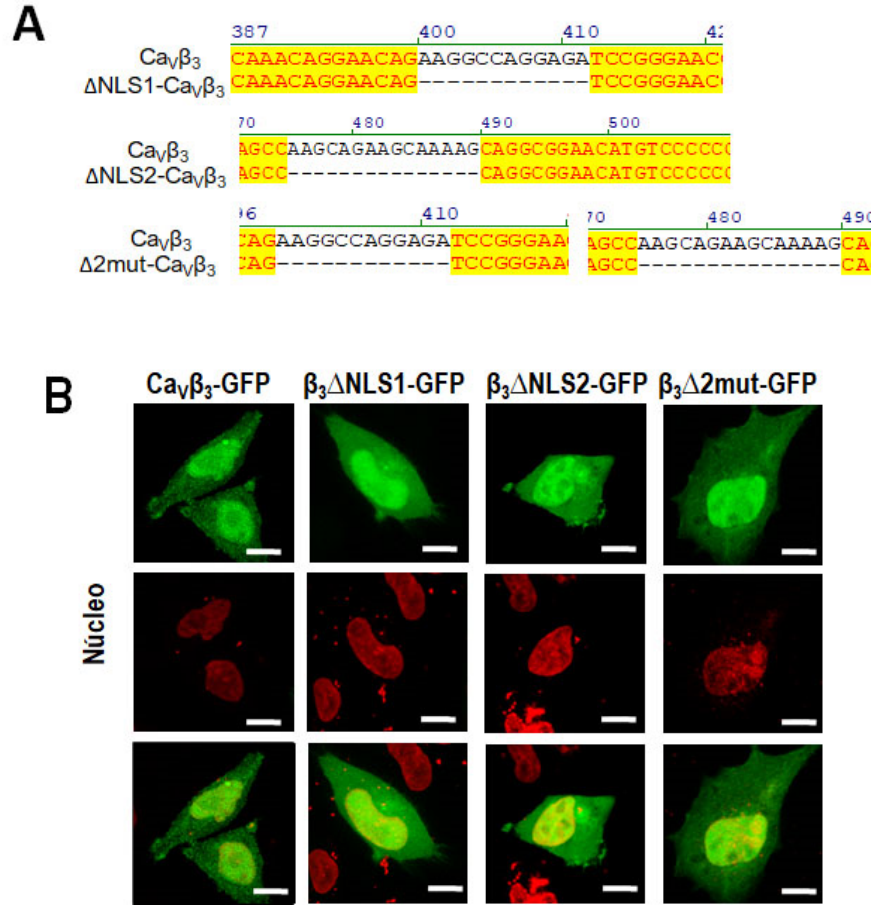


Figura 10. Identificación de las posibles NLS en $\text{Ca}_v\beta_3$. A) Alineamiento de las secuencias control y las diferentes eliminaciones de NLS: ΔNLS1 , ΔNLS2 y $\Delta 2\text{mut}$. En las dos primeras, las señales de localización nuclear se eliminaron por separado, mientras que la última construcción corresponde a la eliminación de ambas señales. B) Imágenes de microscopía confocal de células HeLa transfectadas con las construcciones, $\text{Ca}_v\beta_3\text{-GFP}$, $\beta_3\Delta\text{NLS1-GFP}$, $\beta_3\Delta\text{NLS2-GFP}$ y $\beta_3\Delta 2\text{mut-GFP}$ (Corzo-López, 2018).

2 Planteamiento del problema

Las subunidades auxiliares de los canales Cav han mostrado tener funciones relevantes fuera del complejo del canal. La subunidad Cav β en los últimos años ha despertado gran interés por su localización nuclear. A pesar de esto, en la actualidad no se conoce cuál es el mecanismo molecular que emplea la proteína para ingresar al núcleo celular. Reportes previos muestran que algunas isoformas de la subunidad Cav β , en particular Cav β_4 , podrían estar desempeñando una función en la regulación de la transcripción. Estudios realizados en nuestro laboratorio sugirieron inicialmente que la subunidad Cav β empleaba un mecanismo clásico de importe nuclear. Sin embargo, las NLS que posee la proteína, después de un análisis más detallado, resultaron no ser funcionales, por lo que ha resultado razonable plantear que el mecanismo de transporte nuclear que emplea Cav β no sea clásico. Este trabajo de tesis se enfocó justamente en identificar el mecanismo molecular del ciclo de transporte nuclear de Cav β_3 .

3 Hipótesis de trabajo

La subunidad Cav β_3 de los canales de Ca²⁺ posee una NLS bipartita en su estructura primaria que no es necesaria para su ingreso al núcleo. Alternativamente, la proteína Cav β_3 podría valerse de un mecanismo no clásico de transporte de tipo *piggyback* para llegar al núcleo celular. Asimismo, la subunidad Cav β_3 de los canales de Ca²⁺ posee una señal NES que determina su salida del núcleo.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General.

Caracterizar el o los mecanismos moleculares del transporte nuclear de la subunidad auxiliar Cav β ₃.

4.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar la funcionalidad de las señales de localización nuclear (NLS) identificados en la subunidad Cav β ₃ de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje.
2. Describir el ciclo de transporte de la subunidad en su paso al núcleo celular.
3. Identificar las proteínas con las que Cav β ₃ pudiera estar interactuando para su transporte al núcleo.
4. Demostrar la funcionalidad de la señal de exporte nuclear que posee Cav β ₃.

5 Materiales y Métodos

5.1 Clonas de ADNc

Para estudiar la funcionalidad de la NLS encontrada en Cav β ₃, su secuencia se clonó en un vector tetra GFP, cuyo sitio múltiple de clonaje se encuentre entre la bandera 1 y 2. (generosamente donado por Dr. B. Cisneros, Depto. de Genética y Biología Molecular, Cinvestav). El fragmento correspondiente a la NLS se amplificó por PCR bajo las siguientes condiciones. Cinco μ L de *Buffer* de reacción-Mg (10X), 1.5 μ L de MgCl₂ (50 mM), 1 μ L de dNTP mix (10 mM), 150 ng de ADN molde, 10 μ M de primer sentido, 10 μ M de primer antisentido, 0.5 μ L de Taq polimerasa (5 U/ μ L) y 37 μ L de agua inyectable para un volumen final de 50 μ L. La amplificación se llevó a cabo empleando un termociclador (*Thermo Scientific*) con un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 min; el alineamiento de los nucleótidos se realizó en 30 ciclos con variaciones de temperatura de la siguiente manera, 94°C durante 45 s, 59°C por 30s, 72°C por 1 min, y un ciclo de 72°C durante 10 min. La secuencia de los *primers* empleados se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la amplificación y mutación sitio dirigida de Cav β ₃.

Clona		
NLS	Sentido	5' GAGCTAATCAGGAACAGAAGGCCAGGAG 3'
	Antisentido	5' GTCGACATGTTCCGCCTGCTTTTGCT 3'
pMedium	Sentido	5' AACAAGCTTCCATGTATGACGACTCCTACGTGC 3'
	Antisentido	5' ACAAGGATCCGCGTAGCTGTCCTTAGGCCAAG 3'
NES mut	Sentido	5' CCAAATCCCTGCAGCAAGTGGTGGTGGATGC 3'
	Antisentido	5' GCATCCAACACCACTTGCTGCAGGGATTTGG3'
Δ NES	Sentido	5' CGAGCTGGCCAAATCCGATGCTGACACCATCA3'
	Antisentido	5' TGATGGTGTGACATCGGATTTGGCCAGCTCG3'

Por otro lado, para la determinación del ciclo de transporte nuclear de Cav β ₃ se empleó la construcción comercial conocida como *Fluorescent timer* (Addgene), cuya característica principal es el cambio de longitud de onda de excitación y emisión en función del tiempo que se encuentren las proteínas en la célula, funcionando como un reportero del tráfico celular en el tiempo (Subach *et al.*, 2009). Para realizar la clonación de Cav β ₃ en FT se usó el protocolo de amplificación por PCR mencionado anteriormente.

A continuación, se realizó la clonación del fragmento correspondiente a la NLS en el vector TOPO utilizando el kit *TOPO TA Cloning* (Invitrogen, Cat. #450641). Para la reacción de ligación se tomaron 4 μ L de la reacción de amplificación, 1 μ L de solución salina (NaCl 1.2 M, MgCl₂ 0.06 M) y 1 μ L del vector. La reacción se mezcló ligeramente por pipeteo y se dejó incubando 15 min a temperatura ambiente. Se transformaron bacterias competentes DH5 α con el total de la reacción de ligación y se incubaron por 30 min en hielo. Luego se incubaron a 42°C por 2 min y después en hielo. Posteriormente se agregaron 800 μ L de medio Luria Bertani (LB) y se incubaron en baño maría con agitación constante a 37°C durante 1 h. Finalmente, se sembraron 200 μ L de las bacterias en cajas con agar LB suplementadas con 100 μ g/mL de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C.

La extracción del plásmido se realizó por lisis alcalina y se analizó mediante restricción por endonucleasa empleando la enzima *BamHI* (New England, R0136S). El producto de la reacción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se observó una banda de \sim 100 pb, que corresponde al tamaño del producto de interés.

Para continuar con la clonación del fragmento de 100 pb que corresponde a la NLS de Cav β_3 , se realizó la extracción del fragmento del gel de agarosa usando el kit *QIAquick* (QIAGEN, 28706). De igual forma el vector p4GFP se restringió con la enzima *BamHI*, y luego el producto de la reacción se incubó con la enzima *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP; New England, M0290S) a 37°C por 1 h. Esto con el objetivo de defosforilar los extremos y evitar la recircularización del plásmido. Finalmente se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se realizó la purificación del vector linearizado.

A continuación, se procedió con la reacción de ligación en una relación 1:3 usando la enzima *T4 DNA Ligase* (Invitrogen, Cat. #10799009001). La reacción se incubó a 16°C por 15 h. El volumen total de la reacción se usó para transformar bacterias competentes DH5 α como se mencionó previamente. Después el cultivo se centrifugó y la pastilla se resuspendió en 200 μ L de medio para su posterior siembra en cajas de medio LB agar, que se incubaron a 37°C toda la noche. Finalmente, las colonias obtenidas se amplificaron en medio LB para posteriormente realizar la lisis alcalina y obtener el ADN. Para identificar las clonas con el inserto deseado, se realizaron ensayos de restricción con la enzima *BamHI* y se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. Las clonas que liberaron el fragmento de 100 pb se seleccionaron y purificaron. Las clonas, se secuenciaron de manera automática para verificar su identidad y la dirección de la clonación. La secuenciación tipo Sanger se realizó en el laboratorio de ácidos nucleicos del Departamento de Genética y Biología Molecular del Cinvestav.

Para la clonación de Cav β ₃ en el vector FT, el protocolo se realizó siguiendo las mismas especificaciones mencionadas; utilizando las enzimas *BamHI* y *HindIII* para la restricción. El vector FT se obtuvo de Addgene (Cat. #31911).

5.2 Mutagénesis sitio dirigida

Las mutaciones de la señal de exporte nuclear (NES) encontrada en Cav β ₃ se realizaron empleando el *kit* comercial *QuikChange II XL Site- Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies, 200522-5) siguiendo las indicaciones del proveedor. Este proceso se lleva a cabo en dos pasos, i) síntesis de las hebras con las mutaciones, y ii) digestión del ADN molde. Los *primers* empleados para realizar las mutantes se diseñaron con el programa *QuikChange Primer Design* (Tabla 1).

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

Posteriormente, se realizó la transformación de las bacterias competentes DH5 α usando el protocolo mencionado en la sección anterior. La extracción del plásmido se realizó por lisis alcalina y la secuenciación automática de las clonas de ADNc con la

eliminación de la señal de exporte nuclear, para lo cual se usó el paquete comercial *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems, 4336917). La mezcla de reacción para la secuenciación fue la siguiente: 8 μ L del *buffer* de reacción *Terminator Ready Reaction Mix*, 3.2 pmol de oligonucleótido, 150 ng de la clona como muestra y se completó con agua estéril hasta un volumen final de 20 μ L. Una vez purificado el ADN se procedió a realizar secuenciación en el departamento de Genética y Biología molecular, en el laboratorio de ácidos nucleicos. Las clonas obtenidas se denominaron NESmut-GFP y Δ NES-GFP.

5.3 Cultivo celular y transfección

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

La línea celular N1E-115 se desarrolló a partir de un neuroblastoma murino, y para fines de esta tesis se utilizó debido a que, al ser una línea neuronal, expresa de forma endógena Cav β ₃ permitiendo así evaluar su vida media. Las células se mantuvieron en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco suplementado con 25 mM de glucosa (DMEM-HG), 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/L de penicilina y 100 μ g/L de estreptomina. Para el caso de la línea celular HeLa, se usó el medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco con 25 mM de glucosa

(DMEM-HG suplementado con 5% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/L de penicilina y 100 µg/L de estreptomicina, y 1 mM de piruvato de sodio. Las células se mantuvieron en cajas de cultivo de 60 mm de diámetro a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂ y 80% de humedad relativa. El subcultivo celular se realizó una vez por semana para ambas líneas celulares, empleando Tripsina-EDTA (GIBCO, Cat. #27250-018) para la dispersión celular.

La transfección transitoria se realizó empleando el reactivo *Lipofectamine* (Invitrogen,52887). Las células se llevaron a una confluencia del 70% y en un tubo Eppendorf se colocaron 100 µL de medio DMEM sin suplementos, 2 µg de la construcción de ADNc y 2 µL de reactivo plus. La mezcla se agitó y se dejó durante 15 min a temperatura ambiente (~25°C). Durante este tiempo, en otro tubo se colocaron 100 µL de medio DMEM sin suplementos y 6 µL de lipofectamina. Después de 15 min, el contenido de ambos tubos se mezcló y se dejó durante 15 min adicionales a temperatura ambiente, tiempo suficiente para que se lleve a cabo la formación de los complejos ADN-lipofectamina. En este tiempo además se preparó la caja con las células, para lo cual se retiró el medio y se lavó con 1 mL de PBS 1X. A continuación, se añadieron 800 µL de medio DMEM sin suplementos y se colocaron 200 µL de los complejos ADNc-Lipofectamina en la caja con las células y se incubó durante 5 h. Finalmente, se retiró el medio de cultivo y se agregaron 2 ml de medio fresco DMEM suplementado. Las clonas transfectadas fueron Cavβ₃-GFP, NLS-4GFP, Cavβ₃-pMedium, Cavβ₃NESmut-GFP y Cavβ₃ΔNES-GFP.

5.4 Silenciamiento de B56δ

El silenciamiento (*knockdown*) de B56δ se realizó usando el método de interferencia del ARN, que consiste en disminuir la cantidad de ARN mensajero a partir de su degradación por medio de diversas moléculas. En el caso de este trabajo las moléculas empleadas fueron ARNs pequeños de interferencia (siRNAs), ya que se ha reportado que su uso puede disminuir la expresión de un gen hasta en un 85%.

Con este fin, las células HeLa se contranfectaron con siRNAs dirigidos contra B56δ (Sigma) y siRNAs inespecíficos marcados con Cy3 (*scramble*; Sc-37007, SantaCruz Biotechnology) como control negativo. El marcaje de los siRNAs se realizó con el objetivo de evaluar la eficiencia de transfección e identificar las células transfectadas para la captura de imágenes por microscopia confocal. El marcaje se realizó usando el paquete comercial *Silencer siRNA Labeling Kit* (AM1632, Life Technologies)

Tabla 2. Secuencia de los siRNAs empleados para el silenciamiento de B56δ.

SECUENCIA	
siRNA 1	5'CAAUCCAUGGACUGAUCUA'3 5'UAGAUCAGUCCAUGGAUUG'3
siRNA 2	5'GUUUGUACUUGCUCUCCUA'3 5'UAGGAGAGCAAGUACAAAC'3

Para los ensayos de microscopia confocal, las células HeLa se sembraron en portaobjetos pretratados con poli-L-lisina, y los siRNAs se transfectaron usando el reactivo Lipofectamina siguiendo las indicaciones mencionadas en el apartado

anterior, con 75 pmol de siRNAs marcados y 1 μ g del plásmido que contenía la construcción Cav β ₃-GFP.

5.5 Inmunofluorescencia

Para estudiar la distribución subcelular de Cav β ₃, las células HeLa se transfectaron como se indicó en la sección anterior. Cuarenta y ocho horas después, las células se lavaron con PBS 1X, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min, se lavaron nuevamente y se permeabilizaron con PBS-Tritón al 0.2% durante 5 min. Para visualizar los núcleos, las células se incubaron con Hoescht 33258 (Invitrogen, Cat. #H1398) por 5 min a una dilución 1:2000. Finalmente, las muestras se lavaron con PBS 1X y se montaron empleando VECTASHIELD (Vector Laboratories; Cat. #H-1000-10) y se observaron mediante un microscopio confocal (Leica TCS SP8).

Para el análisis de la distribución subcelular de las proteínas que podrían participar en el transporte nuclear de Cav β ₃, las células HeLa se sembraron en portaobjetos pretratados con poli-L-Lisina (Sigma, Cat. #P1524), y 24 h después se transfectaron con el ADNc que codifica para Cav β ₃-GFP. Cuarenta y ocho h después, las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min, luego se realizaron 3 lavados con PBS por 5 min y se permeabilizaron con PBS-Tritón al 0.2% durante 5 min. Para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos, las células se incubaron 30 min a temperatura ambiente con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con 2% de suero fetal bovino (SFB), 1% de albumina de suero bovino (BSA), 0.1% de gelatina de piel de pescado y Tritón X-100 al 0.1%. Luego de la incubación se realizaron 2 lavados con PBS. Posteriormente, las muestras se

incubaron con los anticuerpos primarios anti-NPM1 (1:100; 32-5200 Invitrogen); anti-ZFY (1:100; AB221906 Abcam); anti-hnRNPQ (1:100; AB221906 Abcam); anti-hnRNPL (1:100; AB32680 Abcam); anti-H2B (1:100; AB1790 Abcam); y anti-B56δ (1:100; AB188323 Abcam) durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Al término del tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con PBS, para luego incubar con el anticuerpo secundario anti-conejo (1:100 Dylight 649 *Vector Laboratories* Cat. #DI-1649) durante 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min. Para visualizar los núcleos, las células se incubaron con Hoescht 33258 (Invitrogen) por 5 min en una dilución 1:2000, y las muestras se lavaron con PBS antes de proceder a su montaje empleando VECTASHIELD para su análisis mediante microscopía confocal.

5.6 Inhibición del importe nuclear

La ivermectina es un medicamento que además de sus propiedades antiparasitarias, ha mostrado ser un inhibidor específico del transporte nuclear dependiente de α/β importinas. Su mecanismo de acción se basa en interferir con la interacción que se forma entre la α -importina y la proteína cargo que posee una NLS (Wagstaff *et al.*, 2012). Para evaluar si el transporte nuclear se encuentra mediado por importinas, las células se sembraron en cubreobjetos pretratados con poli-L-Lisina y 24 h después se transfectaron con Cav β ₃-GFP como se indicó en secciones precedentes. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se incubaron con medio suplementado en presencia de ivermectina (25 μ M) por 4 h a 37°C en una atmósfera de 5% CO₂.

Posteriormente, se realizó el montaje de las muestras con VECTASHIELD y se observaron por microscopia confocal.

5.7 Determinación de la vida media de Cav β ₃

Como ya se mencionó, la línea celular N1E-115 se empleó para determinar la vida media de Cav β ₃ endógena. Con este fin, las células se sembraron en cajas Petri de 35 mm de diámetro a una confluencia del 70%, y 24 h después se incubaron en presencia de cicloheximida (300 μ g/mL) en medio DMEM suplementado. Las células se lisaron a distintos tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h) para analizar la expresión de la proteína mediante *Western blot*. Las células se lavaron con PBS y posteriormente se trataron con 250 μ L de *buffer* de lisis SDLB (250 mM Tris-HCl [pH 8], 750 mM NaCl, 5% Triton x-100, 1 mM fluoruro de fenil-metil-sulfonil [PMSF] y *Protease inhibitor cocktail* (Complete 1X [Roche] 11697498001), y se incubaron en hielo por 30 min. El lisado celular se recuperó después de centrifugar la muestra por 20 min a 12000 rpm y recolectar el sobrenadante. Para analizar y medir la expresión de las proteínas se realizaron ensayos de inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) como se describe a continuación.

5.8 Inmunoelectrotransferencia (*Western blot*)

El análisis de las proteínas se realizó bajo condiciones reductoras y desnaturalizantes. Para ello se utilizaron 50 μ g de proteínas en el *buffer* Laemmli 1X (1.6% SDS, 0.1 M 2- 5% glicerol, 0.083 M 4X Tris-HCl/SDS pH 6.8 y 0.002% azul de bromofenol). Las muestras se calentaron a 95°C por 5 min y las proteínas se separaron electroforéticamente (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 10%, empleando una

cámara de electroforesis (Biorad) conteniendo un *buffer* de electroforesis con SDS (0.025 M Tris-base, 0.192 M glicina, 0.1% SDS). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron (usando un *buffer* de transferencia, 48 mM Tris-base, 39 mM glicina, 20% metanol) a membranas de nitrocelulosa de 0.45 μm (Biorad) por 2 h a ~ 20 V.

Para confirmar la correcta transferencia de las proteínas, las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau. Posteriormente se lavaron con *buffer* TBS-T (10 mM Tris base [pH 7.6], 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20) y se bloquearon con leche sin grasa al 5% en *buffer* TBST por 2 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron a 4°C toda la noche con los anticuerpos primarios, anti-Cav β_3 (1:1000; Santa Cruz Sc-130560); anti-GFP (1:5000; Novus NB300-608); anti-B56 δ (1:5000 Abcam); anti-B23 (1:1000 Invitrogen 32-5200); anti-hnRNP Q (1:1000 Abcam); anti-hnRNP L (1:1000 Abcam); anti-H2B (1:1000 Abcam); y anti-actina (1:10000; Genetex 629630), todos diluidos en TBS-T. Al día siguiente, se realizaron lavados secuenciales de 15, 10 y 5 min con TBS-T y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) anti-ratón 1:5000 en TBS-T (*Jackson immunoResearch*, 115-035-003), o anti-conejo 1:5000 en TBS-T con leche al 5% (*Jackson immunoResearch*, 111-035-003). Finalizado el tiempo de incubación, las membranas se lavaron nuevamente con TBS-T y se procedió al revelado de las proteínas de interés empleando el reactivo *Immobilon Western* (Millipore, WBKLS0500) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las señales de quimioluminiscencia se detectaron con el equipo Odyssey (LI-COR).

5.9 Ensayos de inmunoprecipitación por GFP-Trap

La técnica de GFP-Trap es una variante de la coimmunoprecipitación, solo que en este caso las perlas de agarosa se encuentran acopladas a la región V_{HH} del anticuerpo anti GFP, permitiendo una mayor afinidad en la interacción proteica. Para el ensayo de GFP-Trap se emplearon células HeLa transfectadas con la clona de Cav β ₃-GFP. Brevemente, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se agregaron 10 μ L de perlas de GFP-Trap para cada condición, luego se centrifugó a 2700 $\times g$ por 2 min y se desechó el sobrenadante. A continuación, se agregaron 500 μ L de *buffer* equilibrio/dilución (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA pH 8.0, 1 mM PMSF, cOmplete 1X), y se incubó en agitación constante a 4°C por 2 h. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 2700 $\times g$ por 2 min a 4°C. Finalmente se realizaron dos lavados cada uno de 5 min con 500 μ L de *buffer* equilibrio/dilución, se agregaron 500 μ g de extractos proteicos y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación constante.

Al término del periodo de incubación, las muestras se centrifugaron a 2700 $\times g$ y se realizaron tres lavados con *buffer* equilibrio/dilución. Luego se realizó un lavado con 500 μ L PBS por 5 min a 4°C. Finalmente se retiró el sobrenadante dejando \sim 20 μ L y se agregaron 10 μ L de *buffer* de carga 2X; luego las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min, antes de proceder al análisis por *Western blot*.

5.10 Espectrometría de masas

Los extractos obtenidos de los ensayos de GFP-Trap se analizaron en un gel de poliacrilamida al 8%, y una vez que el frente migró \sim 1 cm se detuvo la electroforesis. Enseguida el gel se sometió a una solución fijadora (25% alcohol isopropílico, 10%

ácido acético) por 30 min, y posteriormente se colocó en una solución de tinción (10% ácido acético, Coomassie Blue R-250 60 mg/L) durante 30 min en agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación, se destiñó el gel usando una solución de ácido acético al 10% durante toda la noche. Finalmente, las muestras se procesaron en la unidad de Genómica, Proteómica y Metabolómica del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LanSe, Cinvestav).

5.11 Ensayo de proximidad de ligando (PLA; *Proximity Ligation Assay*)

Para el ensayo de PLA se emplearon el kit *Duolink In Situ Detection Reagents* (Sigma, Cat. # DUO92008). Las células HeLa fueron sembradas y transfectadas con Cav β ₃-GFP en cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS y posteriormente se fijaron con PFA 4% durante 15 min. A continuación, las muestras se lavaron con SDS al 1% durante 5 min, y 3 veces con PBS durante 5 min. Luego las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% en PBS durante 10 min, y se realizaron lavados con PBS 3 veces por 5 min. A continuación, se realizó el bloqueo de los sitios de unión inespecífica de los anticuerpos, utilizando una solución de bloqueo 1X durante 30 min a 37°C; posteriormente se agregaron los anticuerpos primarios anti-B56 δ , anti-hnRNP Q, anti-hnRNP L, anti-B23, y anti-ZFY a una dilución 1:100 para cada uno, en cada una de las laminillas correspondientes y se dejaron incubando toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Las laminillas se lavaron 3 veces con *buffer* de lavado A por 5 min y se agregaron las sondas PLA 24 μ L de solución diluyente de anticuerpos, 8 μ L sonda PLA MINUS (Sigma, Cat. # DUO92004), 8 μ L sonda PLA PLUS (Sigma, Cat. # DUO92002) y se dejaron incubar a 37°C durante 1 h. Posteriormente las muestras se lavaron 3 veces con *buffer* A durante 5 min y se agregó la solución ligación-ligasa (31 μ L de H₂O

inyectable, 8 µl buffer de ligación 5X, 1 µL de ligasa) y se incubó a 37°C por 30 min, para después lavar 3 veces con el *buffer* de lavado A por 5 min, y agregar la solución de amplificación-polimerasa (31.5 µL H₂O, 8 µL de *buffer* de amplificación 5X y 0.5 µL de polimerasa), y se incubó a 37°C por 1.5 h. A continuación, se retiró la solución y las laminillas se lavaron dos veces con *buffer* de lavado B durante 10 min. Luego se realizaron lavados con *buffer* de lavado B (0.01X) por 1 min, y se dejó secar la laminilla en cuarto oscuro a temperatura ambiente. Finalmente se montaron los cubreobjetos y se agregó una gota de VECTASHIELD con DAPI (*Vector Laboratories*, Cat. #H1200) y las muestras se sellaron con barniz.

6 Resultados

6.1 Caracterización de las señales de localización nuclear en Cav β ₃

Estudios previos en el laboratorio mostraron la localización nuclear de la subunidad Cav β ₃, y además se identificó una señal de localización nuclear (NLS) bipartita. Teniendo en cuenta estos antecedentes, inicialmente se procedió a evaluar con detalle el posible papel funcional de la NLS presente en Cav β ₃, clonando dicha señal en un vector reportero p4GFP. El uso de esta herramienta molecular permitió estudiar la participación de la NLS en el transporte nuclear de la proteína. En la figura 11 se muestran imágenes de microscopía confocal, en un experimento en el que se usó como control positivo la NLS del virus SV40, una de las primeras NLS descritas y caracterizadas. En el panel superior de dicha figura se observa que, al ser una NLS funcional, la NLS del virus SV40, presenta una localización principalmente nuclear. En contraste, la NLS de Cav β ₃ se distribuye homogéneamente en el citoplasma, lo que pone en duda la funcionalidad de dicha señal y sugiere que pudiera no participar en la localización nuclear de Cav β ₃ (Fig. 11).

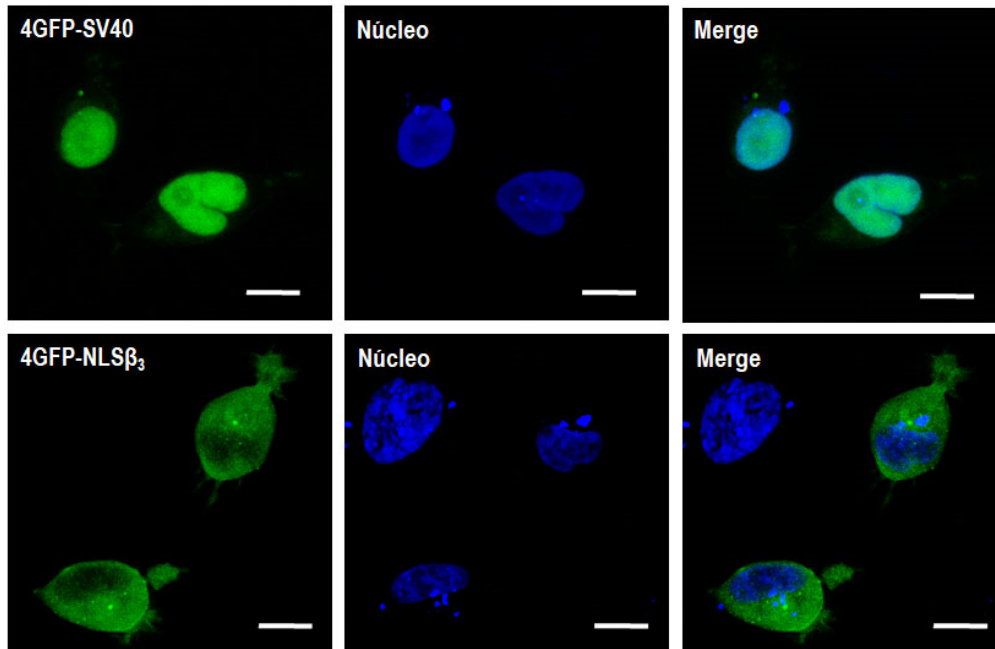


Figura 11. La NLS en Cavβ3 no es funcional. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa transfectadas con la clona 4GFP-SV40 (control positivo) y 4GFP-NLSβ₃ en el canal verde; en el canal azul se observan los núcleos teñidos con Hoechst. En el panel superior se observan las células control, en el panel inferior se observan las células transfectadas con la NLS de Cavβ₃. La escala corresponde a 10 μm.

6.2 B56δ como posible mediador en el mecanismo *piggyback* utilizado por Cavβ₃

Tomando en consideración los datos anteriores, una posible vía de ingreso al núcleo no clásica lo constituye el mecanismo de *piggyback*. Como se indicó en secciones anteriores, este tipo particular de transporte consiste en que una proteína actúa como chaperona y media el ingreso al núcleo de otra proteína que requiera entrar a ese compartimento celular pero que carece de NLS o cuyas señales de localización nuclear no sean funcionales, como es el caso de Cavβ₃. En trabajos previos, Tadmouri y sus colaboradores (2012) se reportaron que B56δ, una subunidad reguladora de la fosfatasa PP2A posee una NLS, e interactúa con Cavβ₃. Teniendo en

consideración este hallazgo, resultó razonable proponer a B56 δ como un candidato que podría estar participando en el ingreso de Cav β_3 al núcleo.

Por ello, inicialmente se procedió a evaluar la distribución subcelular de Cav β_3 y de B56 δ , y en la Figura 12 se muestran los resultados de esta serie de experimentos. En el canal verde se muestra la señal de Cav β_3 -GFP cuya expresión se encuentra distribuida principalmente en núcleo, mientras que en el canal rojo se observa a B56 δ cuya localización parece también principalmente nuclear, aunque se observa una fracción de ésta en el citoplasma. Estos datos muestran la localización de ambas proteínas en el núcleo celular.

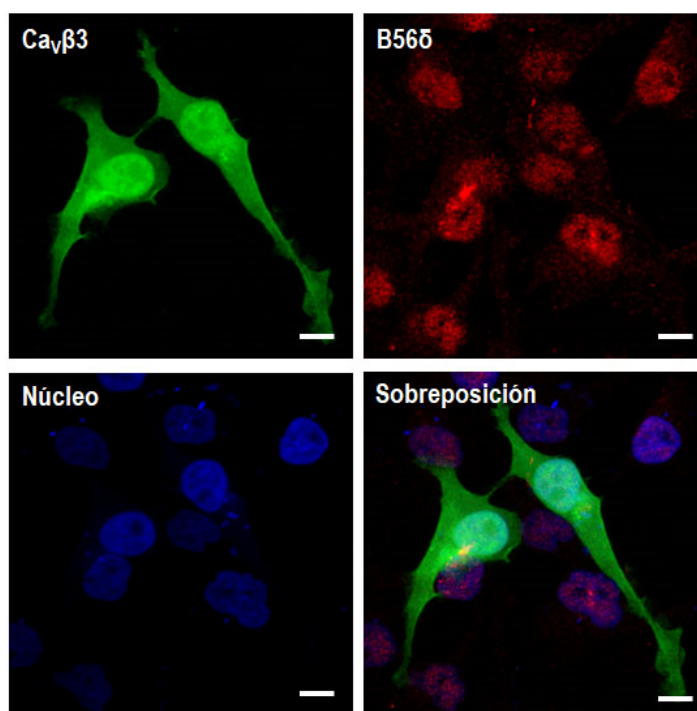


Figura 12. Distribución subcelular de Cav β_3 y B56 δ . Imágenes de microscopia confocal de células HeLa transfectadas con Cav β_3 -GFP. En el canal verde se observa a Cav β_3 -GFP, en el canal rojo se observa B56 δ endógena, y en el canal azul se observan los núcleos teñidos con Hoechst. La escala corresponde a 10 μ m.

A fin de estudiar la posible interacción entre ambas proteínas, a continuación, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación mediante la técnica GFP-Trap. Para ello, las células se transfectaron con la clona de ADNc que codifica para la proteína Cav β ₃-GFP. La figura 13 muestra los resultados de estos ensayos, en donde se observó que el complejo de proteínas en el GFP-Trap contenía a B56 δ , lo cual sugiere una posible interacción con Cav β ₃-GFP. Por otro lado, los datos también muestran que en el carril donde se cargaron los extractos proteicos de células transfectadas con la clona de ADNc que codifica para GFP, usados como control, no se observa ningún tipo de interacción al ser comparada con el carril de GFP-Trap.

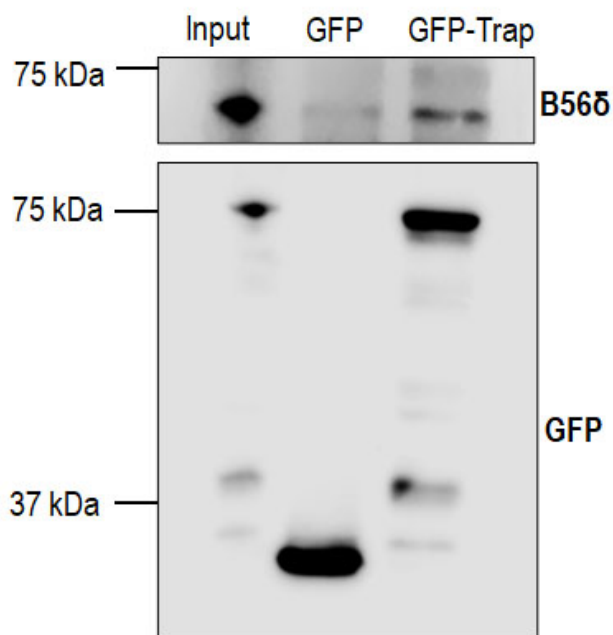


Figura 13. Interacción entre Cav β ₃-GFP y B56 δ . Los extractos proteicos obtenidos de células HeLa transfectadas con las construcciones Cav β ₃-GFP y GFP se inmunoprecipitaron empleando la técnica de GFP-Trap. Los datos fueron analizados por *Western blot* usando anticuerpos anti-B56 δ y anti-GFP. La imagen mostrada es representativa de tres experimentos independientes.

Una vez obtenidos estos resultados, a continuación, se estudió cuál dominio en la subunidad de los canales podría estar participando en la interacción de B56 δ y Cav β ₃-GFP. Para esto se emplearon las clonas que contienen el fragmento amino (NSH-4GFP) y el fragmento carboxilo (SGC-4GFP). Los extractos proteicos de las células HeLa transfectadas con cada una de las clonas se usaron para realizar ensayos de GFP-Trap. De manera inesperada, los resultados en la figura 14 muestran que en ninguna de las condiciones experimentales estudiada se logró inmunoprecipitar a B56 δ . Este resultado sugiere que la integridad molecular de Cav β ₃ es indispensable para que se lleve a cabo la interacción con B56 δ .

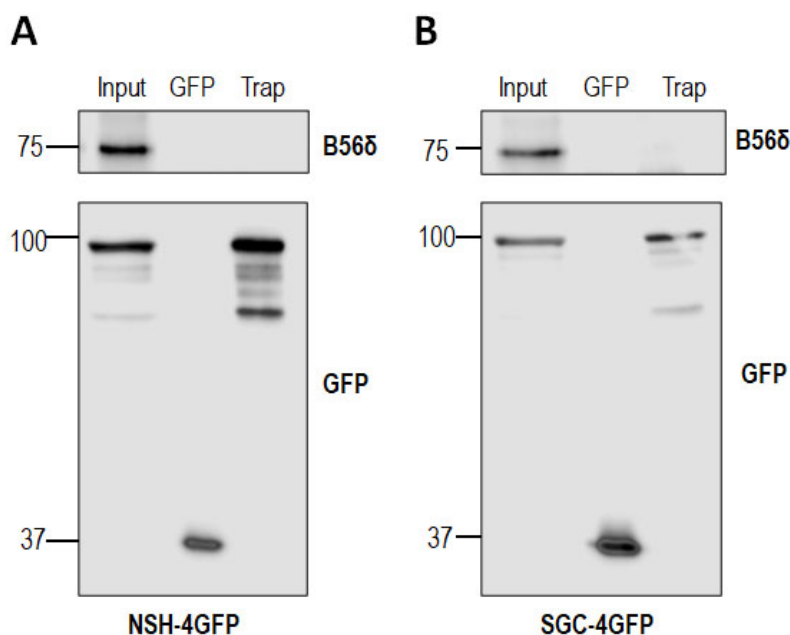


Figura 14. Los fragmentos amino o carboxilo de Cav β ₃ no interactúan con B56 δ . Los extractos proteicos obtenidos de células HeLa transfectadas con las construcciones NSH-4GFP y SHC-4GFP se inmunoprecipitaron empleando GFP-Trap y luego analizados por *Western blot* usando anticuerpos anti-B56 δ y anti-GFP. A) Lisados proteicos de células HeLa transfectadas con la clona que NHS-4GFP se inmunoprecipitaron empleando GFP-Trap. B) Lisados proteicos de células HeLa transfectadas con la clona SGC-4GFP se inmunoprecipitaron empleando GFP-Trap como en A. La imagen es representativa de tres experimentos independientes.

6.3 Efecto del silenciamiento de B56δ

Dado el posible papel que pudiera estar desempeñando B56δ en la localización nuclear de Cavβ₃, a continuación, se realizaron ensayos de silenciamiento utilizando ARNs pequeños de interferencia (siRNAs, por sus siglas en inglés) dirigidos contra B56δ, como se muestra en la Figura 15. Las imágenes en la parte superior de la Figura 15A muestran la condición control, en el que las células se cotransfectaron con el siRNA control (*scramble*), mientras que las imágenes en la parte inferior muestran los resultados obtenidos en las células cotransfectadas con una mezcla de los dos siRNAs dirigidos contra B56δ. En el canal verde se observa la distribución subcelular de Cavβ₃-GFP con ligera relocalización de Cavβ₃ hacia el citoplasma. En la Figura 15B se muestra la comparación de la relación nuclear/citoplásmica de Cavβ₃ después del silenciamiento de B56δ. A pesar de que existe una tendencia a la baja en la expresión de la proteína en el núcleo después del tratamiento con los siRNAs, la diferencia no resultó estadísticamente significativa. Finalmente, en la Figura 15C se muestra el resultado de un ensayo de *Western blot* representativo de la expresión de B56δ, donde se observa una disminución en el nivel de expresión después de realizar el silenciamiento.

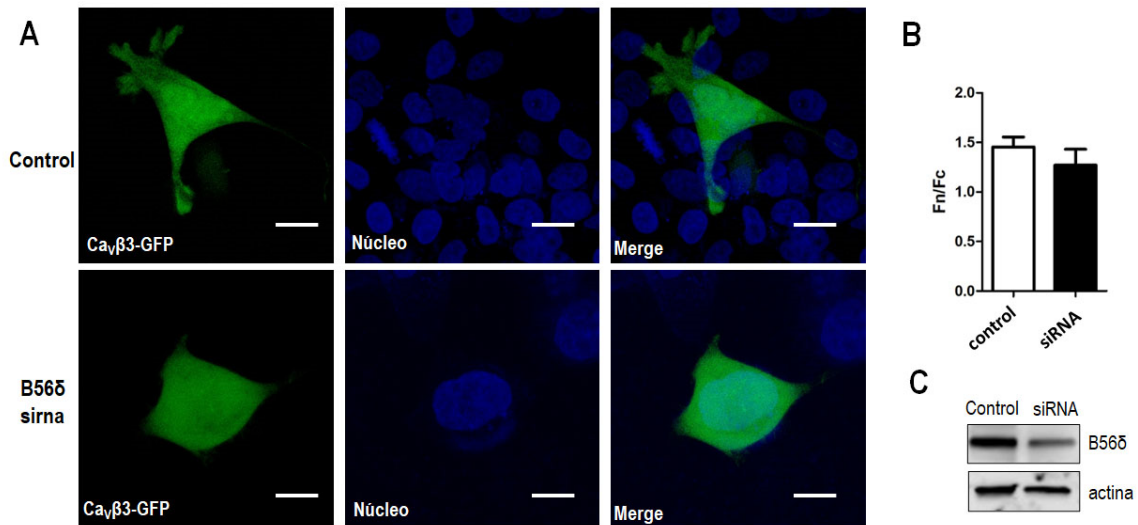


Figura 15. El silenciamiento de B56 δ no modifica de manera aparente la distribución nuclear de Cav $\beta 3$. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa cotransfectadas con siRNAs dirigidos contra B56 δ . A) Imágenes obtenidas en las células control cotransfectadas con Cav $\beta 3$ -GFP y siRNA control o *scramble* (paneles superiores). Los paneles inferiores muestran imágenes de las células cotransfectadas con Cav $\beta 3$ -GFP y una mezcla de siRNAs dirigidos contra B56 δ . B) Cuantificación de la relación de fluorescencia Núcleo/Citoplasma en las dos condiciones experimentales como en A. C) Imágenes de un experimento de *Western blot* representativo en el que se muestra el silenciamiento de B56 δ , después del uso de los siRNAs como en A.

Una posible explicación para esta discrepancia es que el silenciamiento de B56 δ no es homogéneo en la población celular, siendo efectivo sólo en las células que incorporaron los siRNAs, y por supuesto, nulo en las que no se transfectaron. Por esta razón, a continuación, se decidió utilizar una estrategia que permitiera la identificación de las células transfectadas con los siRNAs, y para ello se procedió a realizar el marcaje de los siRNAs y así, una vez transfectados, poder identificar las células que los habían incorporado.

En la Figura 16 se muestran imágenes representativas de microscopía confocal de células cotransfectadas con Cav β ₃-GFP y los siRNAs diseñados contra B56 δ marcados. En el canal rojo se muestran justamente los siRNAs marcados con Cy3 y se corrobora que las células evaluadas en esta serie de experimentos habían sido transfectadas exitosamente. En los tres escenarios evaluados, se muestra un efecto menor en la distribución núcleo/citoplasma, con una localización principalmente nuclear, aún después del silenciamiento de B56 δ . Estos datos sugieren que el *knockdown* de B56 δ no tiene un impacto significativo en la distribución subcelular de Cav β ₃. En el panel B de la Figura 16 se muestra la imagen de un experimento representativo de *Western blot* de la expresión de B56 δ después de transfectar los siRNAs de forma individual o combinada.

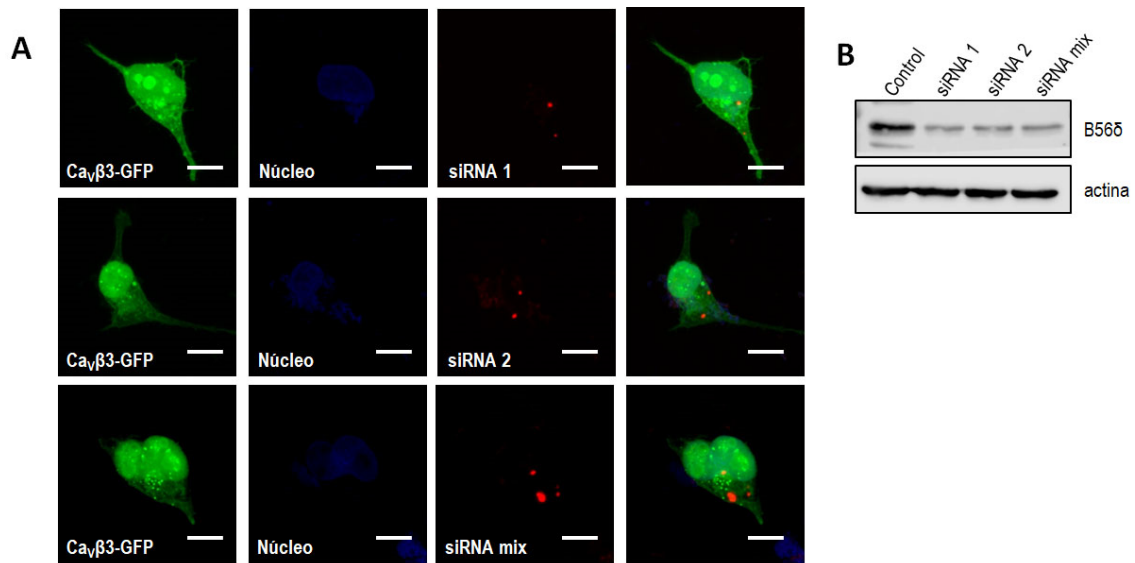


Figura 16. El uso de siRNAs contra B56δ de forma individual o combinada no modifican significativamente la distribución subcelular de Cavβ3-GFP. A) Imágenes representativas de microscopía confocal obtenidas en células HeLa cotransfectadas con Cavβ3-GFP y los siRNAs contra B56δ según se indica. En el canal verde se observa la distribución subcelular de Cavβ3-GFP, en el canal azul se muestran los núcleos teñidos con Hoechst, y en el canal rojo se muestran los siRNAs marcados con Cy3. Los paneles superiores muestran imágenes de las células transfectadas con el siRNA 1, en los del medio se muestran las células transfectadas con el siRNA 2 y en los paneles inferiores se muestran las células transfectadas con una combinación de ambos siRNAs. B) Imágenes representativas de un experimento de *Western blot* de la expresión de B56δ antes y después de la transfección con los siRNAs individuales o en combinación (siRNA mix). Actina se usó como control de carga.

6.4 Posibles chaperonas de Cavβ3

Los datos hasta aquí mostrados sugieren que B56δ pudiera participar, pero no ser el principal regulador en la localización nuclear de Cavβ3. Por esta razón a continuación se procedió a investigar si otras proteínas pudieran estar involucradas en la localización nuclear de la subunidad de los canales. Para esto, se realizaron ensayos de GFP-Trap y el inmunoprecipitado resultante se analizó en geles de poliacrilamida. Luego de migrar ~1 cm, la muestra en el gel se extrajo y se mandó a

analizar en el Laboratorio Nacional de servicios experimentales (LaNSE), en un espectrómetro de masas acoplado a HPLC. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 3. Las proteínas que presentaron mayor puntaje (*score*) y que estuvieron presentes en al menos tres repeticiones, fueron las seleccionadas para ser evaluadas como proteínas candidatas involucradas en el transporte nuclear de Cav β 3.

Tabla 3. Proteínas que interactúa con Cav β ₃-GFP identificadas por espectrometría de masas.

# ACCESO	PROTEÍNA	COVER (%)	SCORE
P06748-2	Nucleofosmina	30.19	10524.27
O60506	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea Q	26.16	3361.272
P62826	Proteína nuclear de union a GTP Ran	18.52	2871.065
P628220	Proteína relacionada con Ras Rab1A	36.1	2107.046
P54652	Proteína 2 Heat shock-related 70 kDa 2	29.73	5286.969
Q93079	Histona H2B tipo 1-H	26.98	443.3557
P35637	Proteína FUS de unión a RNA	6.65	344.7875
P52292	Importina subunidad α -1	17.2	313.5771
P50402	Emerina	25.98	246.1694
P19338	Nucleolina	16.2	232.3479
P46940	proteína Ras tipoGTPasa-activación	10.08	190.519
Q14974	Importina subunidad β -1	7.19	168.8513
Q5S007	Proteína serina/treonina de repetidos de cinasa 2	2.41	36.7472

Por otro lado, a partir de la base de datos BioGRID se determinó otra red de posibles interacciones de Cav β 3. En la Figura 17 se muestra la red de interacciones de Cav β 3; en azul se indica los genes que codifica para las distintas proteínas de la red, y la línea amarilla indica una interacción probada experimentalmente entre estas proteínas y Cav β 3.

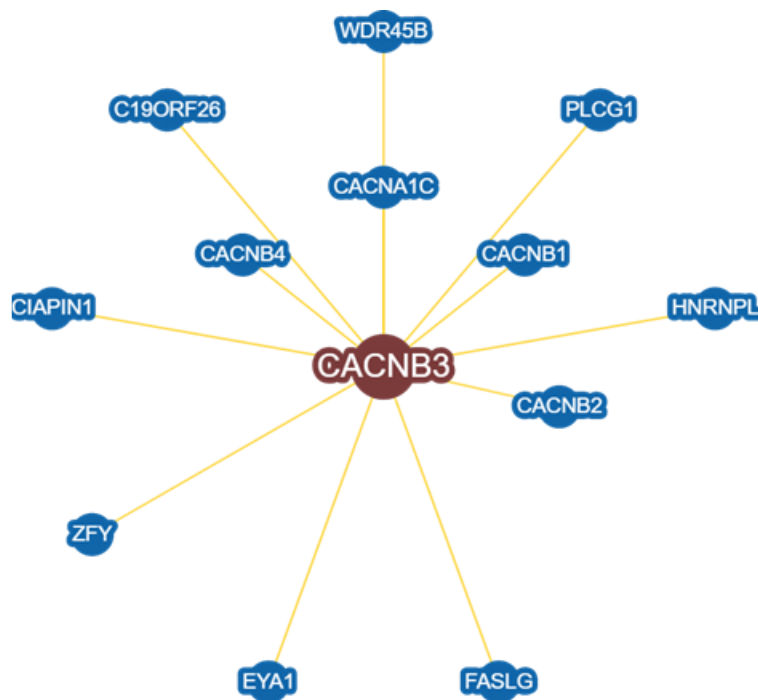


Figura 17. Esquema de posibles interacciones de Cav β 3. Red de interacciones de Cav β 3 generada por la base de datos BioGRID. En azul se muestra el nombre de los genes que codifican para las proteínas que interactúan con Cav β 3.

6.5 Interacción de Cav β 3 con proteínas identificadas por espectrometría

De las proteínas identificadas por espectrometría de masas se eligieron tres para evaluar si participan en el mecanismo molecular en la localización nuclear de Cav β 3: B23, hnRNP Q, H2B. Asimismo, se eligieron dos proteínas identificadas por el análisis bioinformático: hnRNP L y ZFY. Una vez determinadas las proteínas a evaluar, a continuación, se procedió a su localización subcelular por microscopía confocal. En la Figura 18 se muestran las imágenes de microscopía confocal relativas a este análisis. En el canal verde se localizó a Cav β 3-GFP mientras que en el canal rojo las proteínas a evaluar B23 (en A), hnRNP L (B), hnRNP Q (C), ZFY (D). Para las proteínas evaluadas, de la A-C se encontró señal localizada en el núcleo celular, e interesantemente se observó una colocalización con Cav β 3 en el canal de sobreposición. Para la imagen D se observó una distribución homogénea entre núcleo y citoplasma.

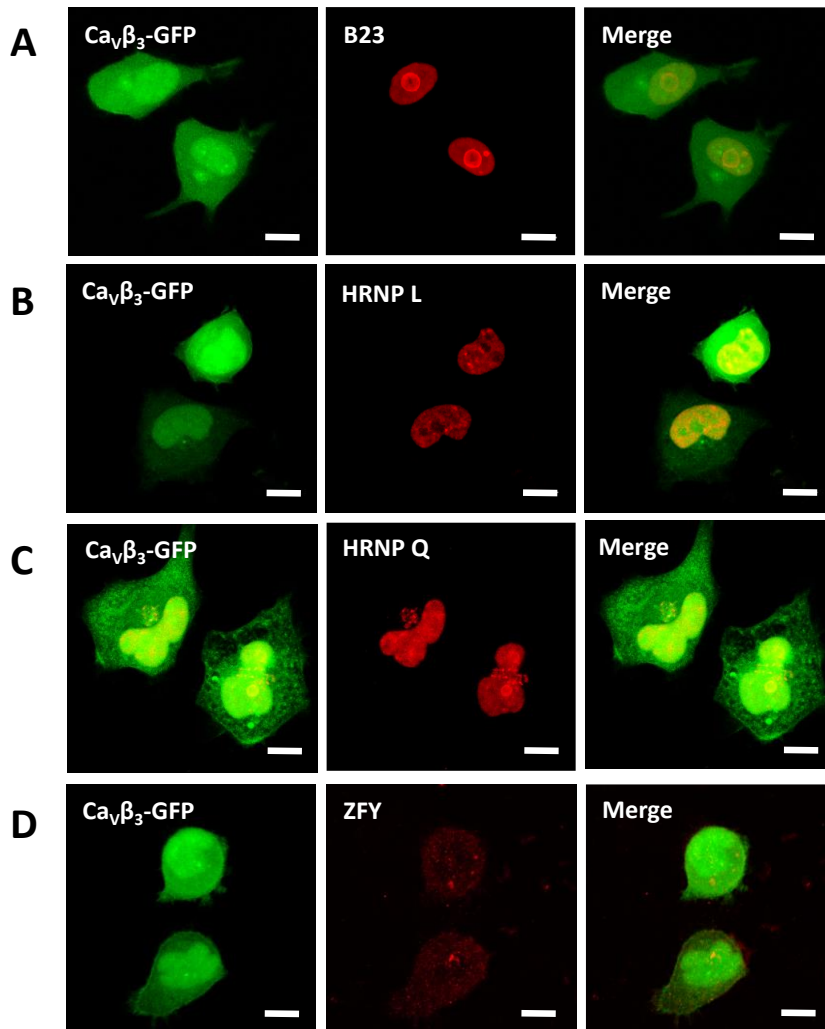


Figura 18. Localización subcelular de proteínas de interacción con Cav β ₃. Imágenes de microscopía confocal obtenidas en células HeLa transfectadas con Cav β ₃-GFP en verde. En el canal rojo se observan las proteína endógenas B23 (A), hnRNP L (B), hnRNP Q (C), y ZFY (D). Las imágenes son representativas para tres experimentos independientes. La escala corresponde a 10 μ m.

Dado que las proteínas mencionadas anteriormente mostraron una ubicación nuclear y una posible colocalización con Cav β ₃, a continuación, se buscó evidencia adicional de su cercanía física empleando ensayos de ligación por proximidad (PLA, por sus siglas en inglés). El ensayo de PLA permite identificar la proximidad entre

proteínas que se encuentren a una distancia < 40 nm, generando una señal puntual al ser analizada por microscopia confocal. En la Figura 19 se muestran las imágenes representativas de microscopia confocal de los ensayos de PLA.

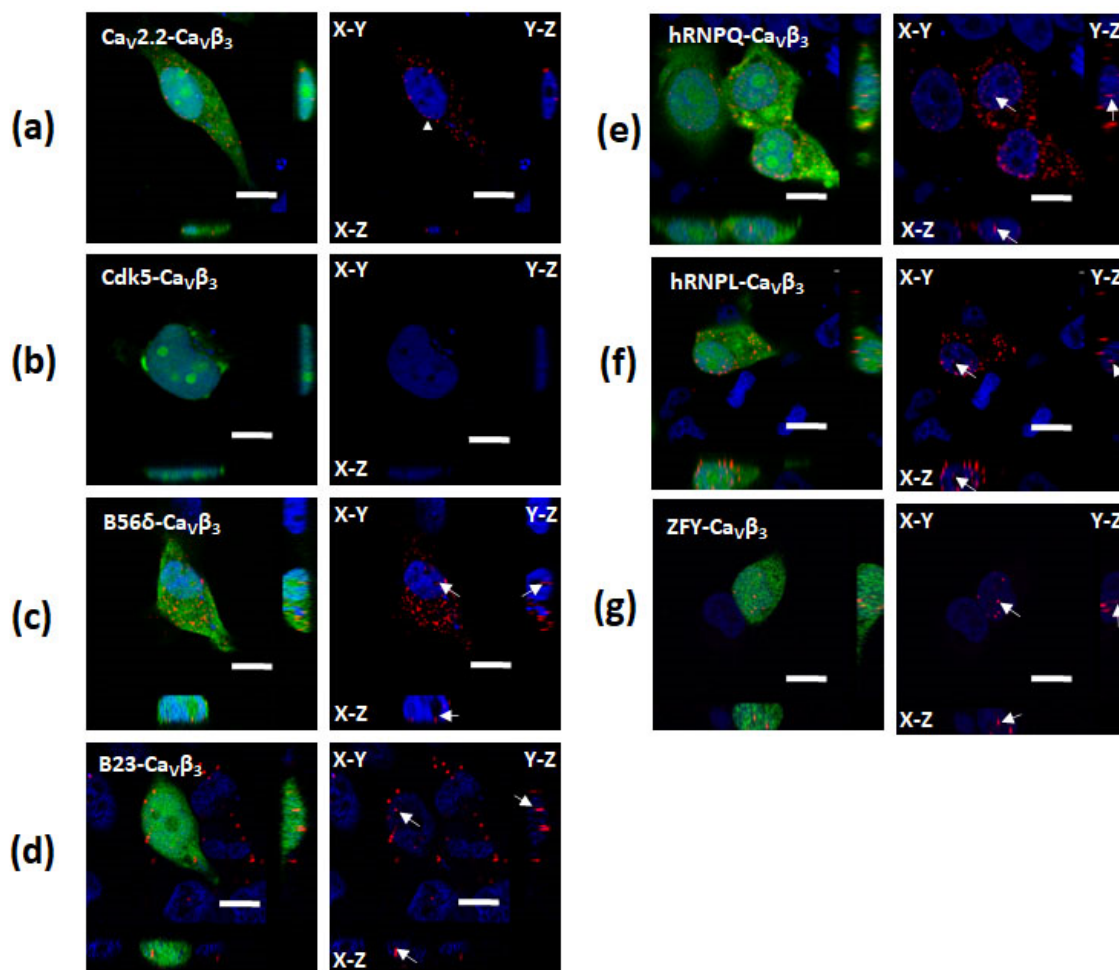


Figura 19. Imágenes de microscopia confocal empleando la técnica de PLA. Imágenes de microscopia confocal obtenidas en células HeLa transfectadas con $\text{Cav}\beta_3$ -GFP usando la técnica de PLA, con las proteínas $\text{Cav}2.2$ (A, como control positivo), Cdk5 (B, control negativo), B56 δ (C), B23 (D), hnRNP Q (E), hnRNP L (F), y ZFY (G). Las flechas indican el punto de colocalización evaluado en la imagen que corresponde al corte ortogonal en Z. En el canal verde se observa $\text{Cav}\beta_3$ -GFP y en rojo se observa la señal PLA. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. La escala corresponde a $10 \mu\text{m}$.

En el panel A (Fig. 19) se muestra el control positivo de la señal PLA originado por la interacción entre Cav β_3 y Cav2.2, una interacción plenamente corroborada en estudios previos, observándose la señal esperada en forma de puntos. En el panel B se muestra el resultado del control negativo, que este caso fue la cotransfección de Cav β_3 con Cdk5, una cinasa que se sabe no interactúa con la subunidad del canal. En el inciso C se muestra el complejo Cav β_3 -B56 δ donde si se observa señal, lo que sugiere que estas proteínas forman parte de un complejo. La señal se encuentra en la región citoplasmática principalmente, aunque algunos puntos se localizan en el núcleo celular. Para corroborar que efectivamente esta señal se encuentra dentro de este compartimento celular se realizaron cortes ortogonales, y las flechas en la imagen ubican a los puntos en los cortes en Y-Z y X-Z evidenciando que, efectivamente, algunos puntos se encuentran dentro del núcleo.

En el panel D de la Figura 19 se muestra la señal para el complejo Cav β_3 -B23. Aquí la señal se localiza principalmente en el núcleo celular, y al realizar la evaluación de la señal en los planos Y-Z y X-Z se observa que la señal se encuentra, efectivamente, al interior del núcleo. En el panel E se muestra la formación de complejos entre Cav β_3 y la proteína hnRNP Q. En este caso, la señal se observa en el citoplasma, y algunos puntos de formación de complejos se distribuyen de forma perinuclear, sin embargo, también se observan algunos puntos de interacción al interior del núcleo, al analizar los cortes Y-Z y X-Z se logra identificar que la señal se está generando dentro del núcleo. En el panel F se muestra el complejo entre Cav β_3 y hnRNP L que, al igual que hnRNP Q, muestra una distribución principalmente citoplasmática y perinuclear, y al analizar la localización nuclear mediante las proyecciones Y-Z y X-Z, se observa que la

señal se localiza dentro del núcleo. Por último, en el panel G se muestra el complejo formado entre Cav β ₃ y ZFY, y las imágenes muestran que la señal es únicamente nuclear. Esto se corroboró al analizar los datos obtenidos en los cortes en Y-Z y X-Z, donde se muestra la señal dentro del núcleo.

Estos resultados indica que Cav β ₃ puede interactuar con las proteínas identificadas por espectrometría de masas. Para el caso de hnRNP Q, hnRNP L, y B56 δ , la interacción se pudiera estar dando tanto en el núcleo como en citoplasma, sugiriendo que estas proteínas posiblemente sean las encargadas de llevar a Cav β ₃ al núcleo celular. Por otro lado, el complejo de Cav β ₃ con ZFY y B23 se localiza exclusivamente en el núcleo celular, lo que sugiere que estas proteínas podrían estar ligadas con la función que posiblemente Cav β ₃ desempeñaría en el núcleo celular.

Teniendo en consideración la posible participación de hnRNP L, hnRNP Q y B56 δ en el transporte nuclear de Cav β ₃, a continuación, se analizó si la localización nuclear de la señal de PLA se modifica después de la inhibición del importe nuclear de proteínas. Con este fin, las células HeLa transfectadas con el ADNc que codifica para Cav β ₃-GFP se incubaron con Ivermectina (25 μ M; 4 h) antes de realizar el ensayo de PLA. En la Figura 20 se muestran los resultados del análisis por microscopia confocal.

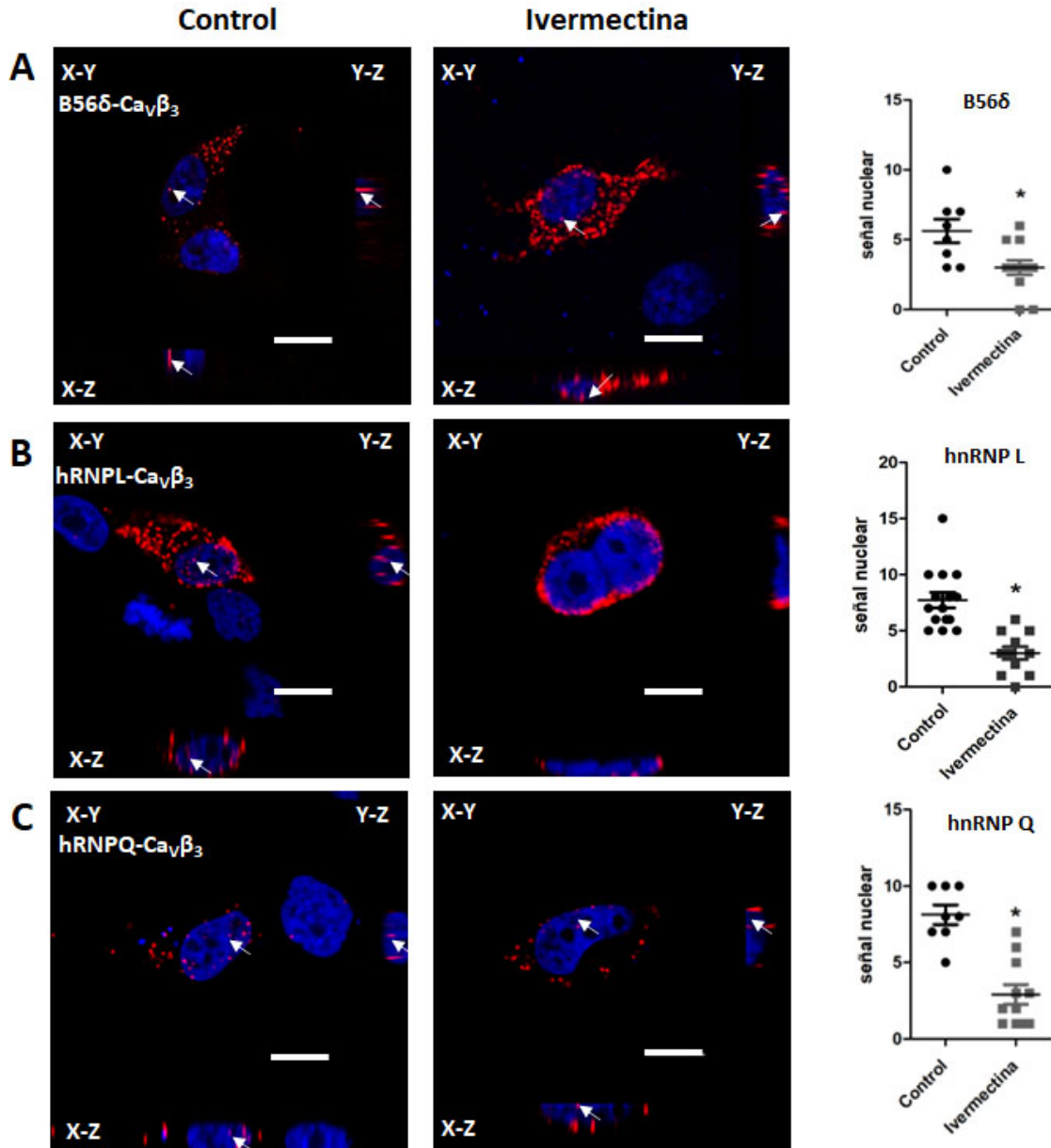


Figura 20. Ivermectina modifica la localización nuclear de los complejos formados entre Cav β 3 y hnRNP L, hnRNP Q. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa transfectadas con Cav β 3-GFP tratadas con 25 μ M de ivermectina, usando la técnica de PLA. A) Señal PLA del complejo Cav β 3 GFP-B56d. B) Cav β 3 GFP-hnRNP L. C) Cav β 3-hnRNP Q. En rojo se muestra la señal de interacción PLA. La grafica de la derecha muestra la cuantificación de la señal de interacción PLA en el núcleo. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. (n=10 células; T-test *p<0.05). La escala corresponde a 10 μ m.

En el panel A (Fig. 20) se muestra el complejo Cav β ₃-B56 δ , en el cual se logra observar la señal PLA principalmente en el citoplasma. Al analizar las imágenes de las proyecciones Y-Z y X-Z es posible identificar señal PLA de forma perinuclear, y al realizar la cuantificación de señal PLA en el núcleo se observa que hay una disminución significativa con respecto al control. En el panel B se muestra el complejo Cav β ₃-hnRNP L, en donde se observa que, al inhibir el importe nuclear la distribución de señal PLA es perinuclear, y que en este caso, la señal PLA en el núcleo sí disminuye significativamente. En el panel C se muestra el complejo Cav β ₃-hnRNP Q, donde al inhibir el importe nuclear la señal PLA se encuentra en citoplasma, y la localización de señal en el núcleo también disminuye significativamente. Estos resultados sugieren que hnRNP Q y hnRNP L podrían mediar el transporte nuclear de Cav β ₃.

Por otro lado, para evaluar la localización subcelular de los complejos B23-Cav β ₃ y ZFY-Cav β ₃ se realizaron ensayos de inhibición del importe nuclear y la interacción entre estos complejos se evaluó también por ensayos PLA. En la Figura 21 se muestran imágenes de microscopía confocal obtenidas en células HeLa transfectadas con el ADNc que codifica para Cav β ₃-GFP tratadas con Ivermectina (25 μ M; 4 h) antes de realizar el ensayo de PLA. En la figura 21A se observa una relocalización de la señal de interacción hacia el citoplasma, entre B23-Cav β ₃. Por otro lado, en la Figura 21B se muestra una pérdida de la señal nuclear del complejo ZFY-Cav β ₃. En el escenario de B23-Cav β ₃ la relocalización de la señal hacia el citoplasma probablemente ocurra debido a una acumulación de B23 en este compartimento, permitiendo una mayor interacción con Cav β ₃. Para el caso del complejo ZFY-Cav β ₃, la ausencia de señal

nuclear probablemente este dada por la acumulación de $\text{Ca}_v\beta_3$ en el citoplasma, impidiendo una interacción entre ambas proteínas.

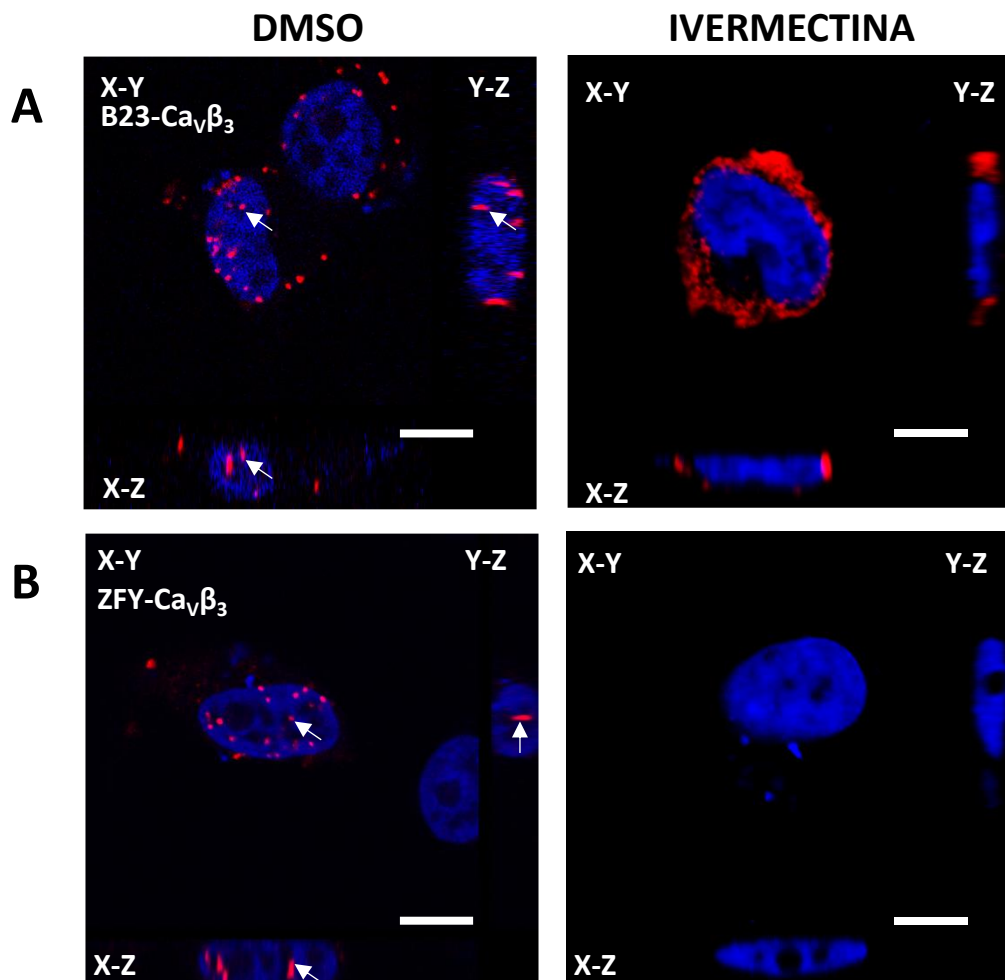


Figura 21. La ivermectina modifica la localización subcelular de la interacción de $\text{Ca}_v\beta_3$ con B23 y ZFY. Imágenes representativas de microscopía confocal obtenidas en células HeLa transfectadas con $\text{Ca}_v\beta_3$ -GFP tratadas con 25 μM de ivermectina, usando la técnica de PLA. A) Señal PLA del complejo $\text{Ca}_v\beta_3$ GFP-B23. B) $\text{Ca}_v\beta_3$ GFP-ZFY. En rojo se muestra la señal de interacción PLA. La escala corresponde a 10 μm .

6.6 Determinación de la vida media de Cav β ₃

Posteriormente se quiso determinar la posible presencia de dos subpoblaciones de Cav β ₃, una asociada al complejo del canal y otra que viaje al núcleo, o si la subunidad que se asocia con el canal pudiera ser la misma que viaja al núcleo celular. Para discernir entre estas posibilidades, Cav β ₃ se clonó en un vector fluorescente que permite reportar la presencia de la proteína por su propiedad de cambiar la fluorescencia en función del tiempo de haber sido sintetizada.

Para la clonación en el vector adecuado primero resulta necesario determinar la vida media de la proteínas (Cav β ₃ endógena) y para ello, se usaron las células N1E-115 como modelo. Así, las células se incubaron con 300 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cicloheximida y posteriormente se obtuvieron lisados celulares a distintos tiempos. Como es sabido, la cicloheximida es un inhibidor de la síntesis de proteínas en organismos eucariontes que es producida por la bacteria *Streptomyces griseus*, y actúa interfiriendo la actividad peptidil transferasa del ribosoma 60S, bloqueando la elongación traduccional (Schneider-Poetsch *et al.*, 2010; Kao *et al.*, 2015). En la Figura 22 se muestran los resultados de un experimento de *Western blot* donde se observa que a partir de las 6 h la expresión de la proteína disminuye.

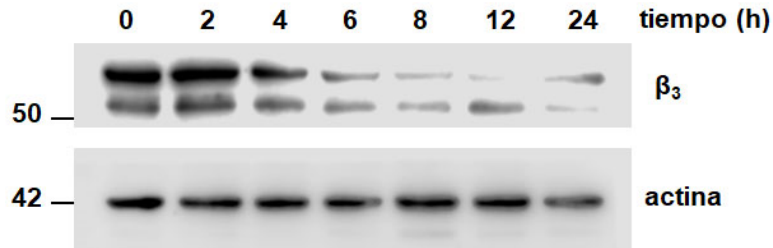


Figura 22. Determinación de la vida media de Cavβ₃. Análisis por *Western blot* de la expresión endógena de Cavβ₃ en células N1E-115 tratadas con 300 μg/μL de cicloheximida, a distintos tiempos. Actina se usó como control de carga. Imagen representativa de 3 experimentos independientes.

Esta serie de experimentos mostró un recambio rápido de Cavβ₃ al tener una vida media de 4-6 h. Este fue el punto de partida para realizar la clonación de la secuencia de la subunidad de los canales en el vector FT-medium tal y como se describe a continuación. Aquí vale la pena mencionar que el vector FT-medium codifica para una clase especial de proteínas fluorescente llamadas temporizadoras, y que constituyen una herramienta nueva para el monitoreo de la localización subcelular de proteínas. Con las proteínas temporizadoras es posible observar una sola imagen de una célula y comprender cómo cambia la localización de proteínas en el tiempo. Así, cuando las proteínas temporizadoras se expresan por primera vez, emiten fluorescencia predominantemente en un color, pero conforme maduran emiten fluorescencia predominantemente en un segundo color. Por lo general, se supone que este cambio es el resultado de la oxidación del cromóforo. Las proteínas temporizadoras más populares originalmente emiten fluorescencia verde o azul y, cuando maduran, emiten fluorescencia roja. La relación entre el color maduro (rojo) y el color inmaduro (verde o azul) dentro de una población de temporizadores indica la edad de la proteína, cuanto mayor sea la relación, más antigua será la misma (Subach et al.,

2009). Además, existen 3 variantes de este sistema de temporizadores para monitorear la localización de proteínas de vida media corta, media y lenta, y de acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos con cicloheximida, se decidió utilizar el de vida media.

La idea detrás de estos experimentos era estudiar si la proteína Cav β_3 recién sintetizada se distribuía de manera diferencial entre el núcleo celular y la membrana plasmática (es decir se asociaba preferencialmente con el canal), o si, por el contrario, no existe una preferencia de la proteína recién sintetizada por ninguno de los compartimentos celulares. La secuencia de Cav β_3 se clonó en el sitio múltiple de clonación del vector pMedium-FT-N1 (Addgene; Fig. 23). La idoneidad de la clonación se verificó por secuenciación automática, y el resultado fue Cav β_3 que tenía fusionada la proteína fluorescente mCherry en su carboxilo terminal.

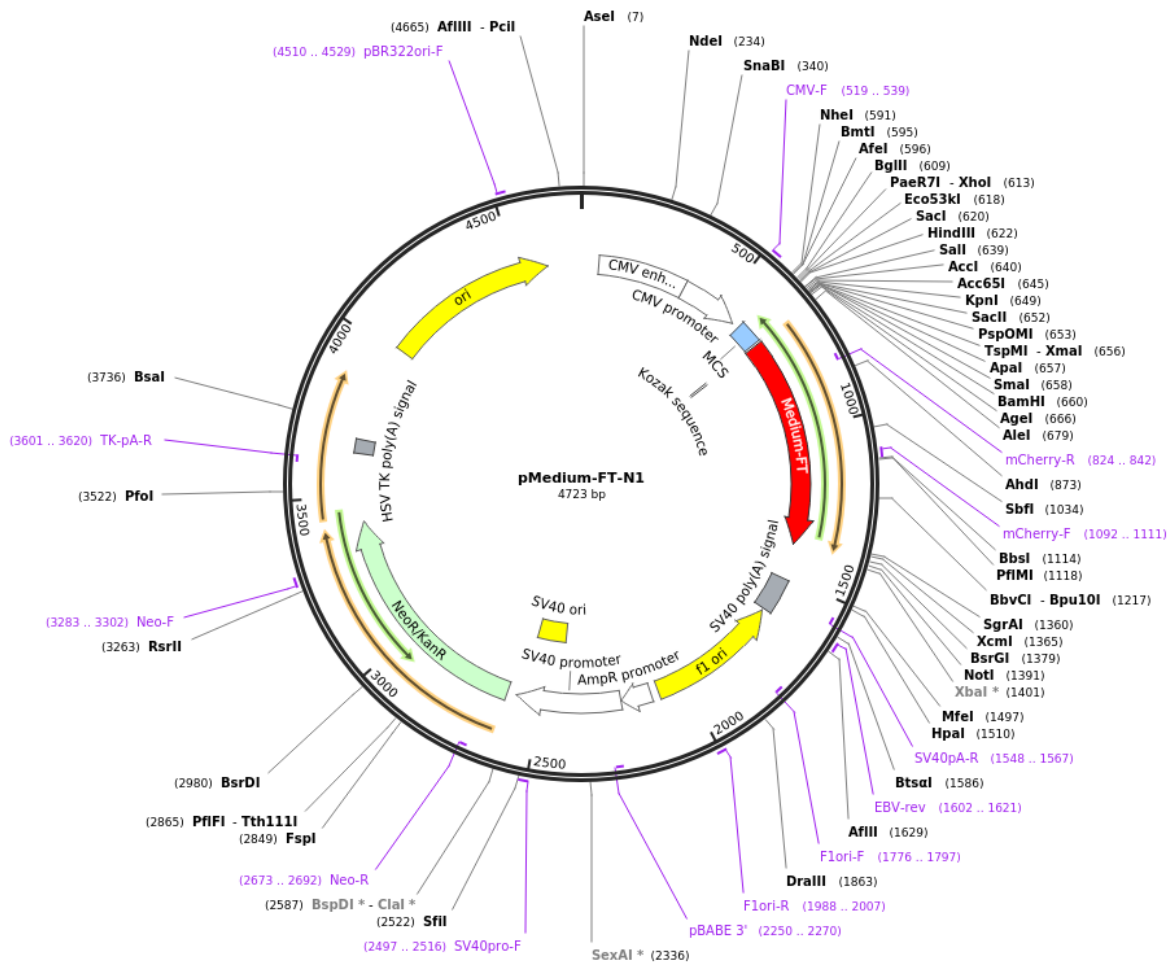


Figura 23. Clonación de Cav β 3 un vector que origina una proteína de fusión temporizadora fluorescente de vida media media. Mapa del vector pMedium-FT-N1 se muestra el sitio múltiple de clonación y la mCherry en color rojo. Tomada de la URL <https://www.addgene.org/31911/>.

6.7 Temporalidad del ciclo de transporte nuclear de Cav β ₃

Una vez obtenida la clona se realizó la transfección en células HeLa, y 24 h después de la transfección las células se fijaron para ser analizadas por microscopia confocal. La Figura 24 muestra los resultados de este análisis. En el panel A, la señal en color azul indica la Cav β ₃ que lleva poco tiempo de ser sintetizada en las células HeLa transfectadas con la clona β ₃-pMedium. De manera interesante, se aprecia que una gran cantidad de proteína se encuentra alojada en el núcleo celular. Por otro lado, en el canal rojo se observa a la Cav β ₃ que lleva más tiempo en la célula, y su distribución es más homogénea y se localiza tanto en núcleo como en el citoplasma. En el panel B de la Figura 24 se muestran las imágenes obtenidas en células HeLa cotransfectadas con ADNc que codifica para la subunidad Cav2.1 α ₁, es decir, la subunidad formadora del poro y la subunidad auxiliar Cav α ₂ δ -1. Además, en estas células se cotransfectó la construcción β ₃-pMedium con la finalidad de reconstituir por completo el complejo de los canales de calcio y determinar si la distribución de Cav β ₃ cambiaba en presencia del canal. En las imágenes se muestra que la distribución de la señal azul y en rojo es similar, mostrando una distribución punteada tanto en el núcleo como en la membrana celular. Esto sugiere que la distribución subcelular de Cav β ₃ está ligada a la presencia de la subunidad formadora del poro del canal.

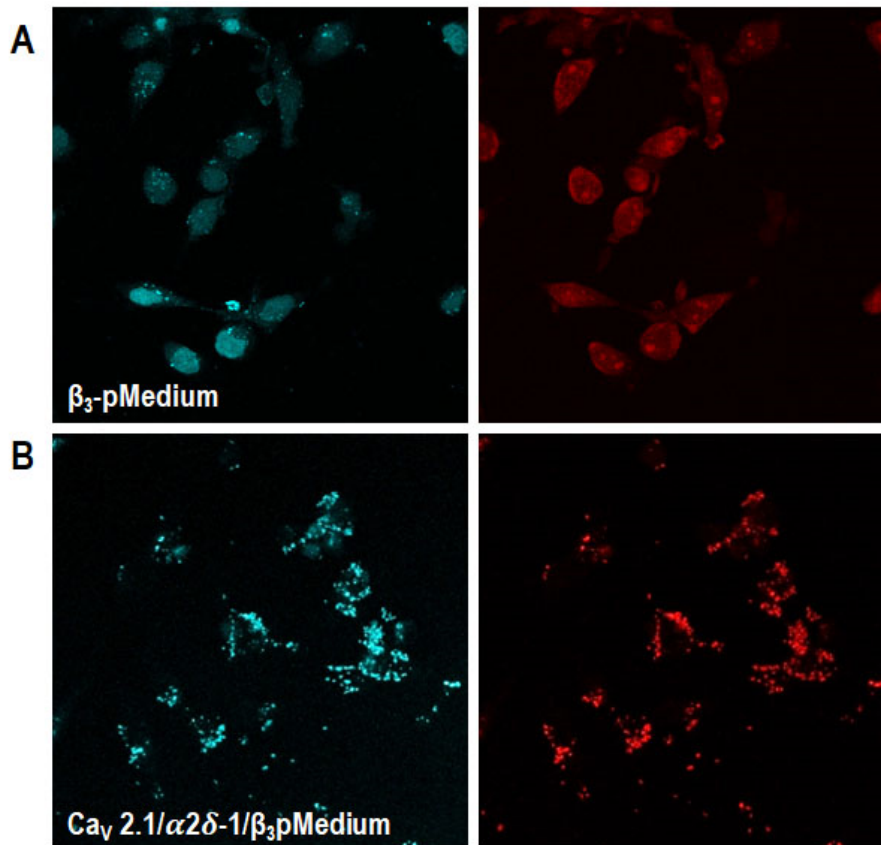


Figura 24. La distribución subcelular de Cav β 3 se modifica al coexpresarse con la subunidad formadora del canal Cav2.1. A) Imágenes de microscopía confocal obtenidas en células HeLa transfectadas con β_3 -pMedium. B) Imágenes de microscopía confocal obtenidas en células HeLa transfectadas con Cav2.1, Cav α 2 δ -1 y β_3 -pMedium. Las imágenes de las señales en el canal azul se capturaron con un pico de excitación de 401 nm y un pico de emisión de 464 nm. En el canal rojo las imágenes se adquirieron con un pico de excitación de 579 nm y uno de emisión de 600 nm.

6.8 Identificación y caracterización de la señal de exporte nuclear en Cav β 3

Posteriormente, para dar continuidad al estudio del ciclo de transporte nuclear de Cav β 3 se examinó el exporte nuclear de la proteína. Estudios previos en el laboratorio identificaron por bioinformática una posible señal de exporte nuclear (NES) (LQLVVL) y para evaluar su funcionalidad, en este trabajo se realizaron ensayos basados en una estrategia de mutagénesis sitio dirigida. Las construcciones mutantes

de la NES se realizaron a partir de la construcción Cav β ₃-GFP. En una primera construcción el aminoácido de Leucina en la posición 266 se sustituyó por una glutamina (NESmut), mientras que en una segunda construcción se eliminaron 18 aminoácidos que flanquean a la leucina 266 (Δ NES). Una vez obtenidas las construcciones que contenían las mutaciones de interés, se verificaron mediante secuenciación automática. En la Figura 25 se muestra el resultado de la secuenciación para la construcción NESmut y Δ NES, respectivamente.

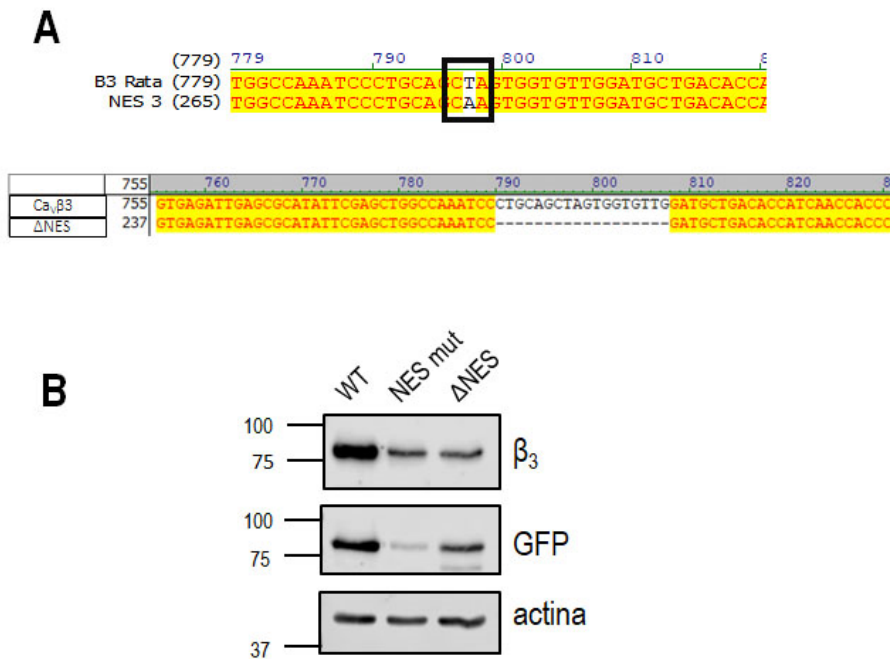


Figura 25. Análisis de las mutaciones de NESmut y Δ NES obtenidas a partir de Cav β ₃-GFP. A) Alineamiento de las mutaciones de la señal de exporte nuclear presente en Cav β ₃. En el recuadro negro se muestra el cambio de una timina por una alanina, modificando el codón que codifica para Leucina substituyéndolo por el que codifica para Glutamina. En la imagen inferior se muestra el alineamiento de la clona Δ NES mostrando la eliminación de 18 nucleótidos que flanquean la NES. B) *Western blot* representativo de la expresión de las clonas mutantes en las células HeLa.

Una vez obtenidas las construcciones de interés, a continuación, se procedió a evaluar su distribución subcelular por microscopia confocal. En la Figura 26 se muestra esta distribución, donde se observa que la transfección de la construcción NESmut genera un aumento en la señal nuclear. Por otro lado, y de manera interesante, la construcción Δ NES muestra una distribución atípica cercana al núcleo celular. Aunque aún no se sabe el origen de esta distribución, resulta razonable especular que esto probablemente esté relacionado con la pérdida de la integridad de la proteína, y que una eliminación de los 18 aa que flanquean la NES modifica su correcto plegamiento, aunque la proteína se siga expresando, al menos a juzgar por los resultados del análisis por *Western blot* donde se observó que el anticuerpo reconoce la proteína y origina una banda del tamaño esperado para la Cav β ₃ mutante.

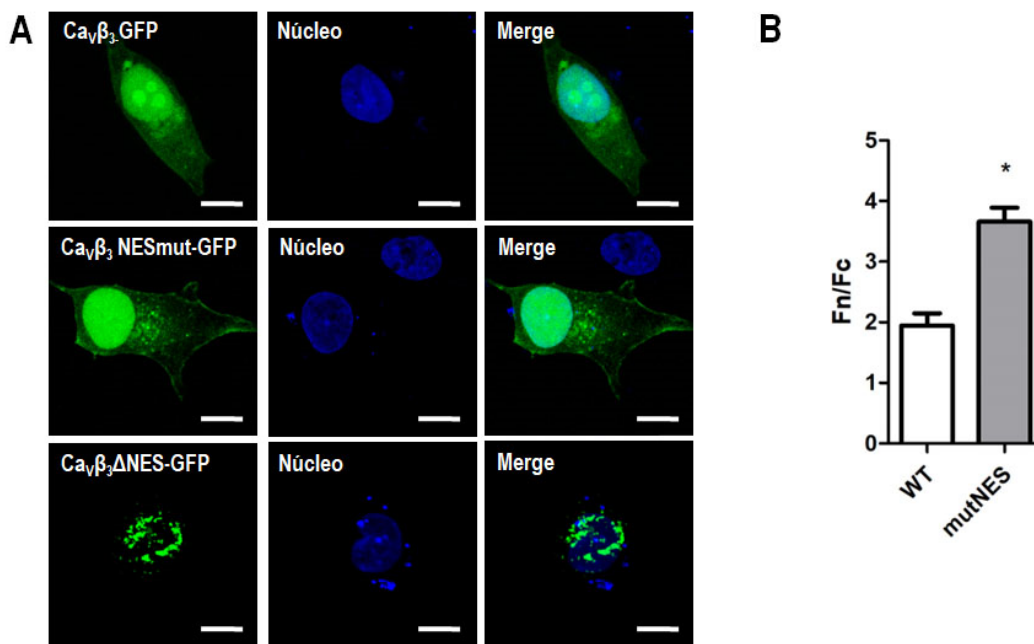


Figura 26. Distribución subcelular de las proteína Cav β ₃ que tienen una mutada la NES. Imágenes de microscopía confocal obtenidas en células HeLa transfectadas con las clonas Cav β ₃-GFP, β ₃mNES-GFP y β ₃ Δ NES-GFP. En el canal verde se muestra la señal correspondiente a la expresión de cada una de las subunidades mutantes. En el canal azul se muestran los núcleos teñidos con Hoechst. La escala corresponde a 10 μ m. B) La gráfica de barras muestra la comparación de la relación fluorescencia nuclear: fluorescencia citoplásmica (Fn/Fc) para las células HeLa que expresan la subunidad Cav β ₃ silvestre (WT) y la mutante Cav β ₃NESmut. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. (n=10 células; T-test *p<0.05).

Estos resultados sugieren la funcionalidad de la NES identificada en la secuencia de Cav β ₃. Para confirmar estos hallazgos se realizaron experimentos en lo que se incluyó el tratamiento con Leptomycin B (LMB) un inhibidor del exporte nuclear. Como podía anticiparse, en la Figura 27B se observa un aumento en la localización nuclear de Cav β ₃ después del tratamiento con LMB con respecto al control (Fig. 27A). En el panel C de la Figura 27 se observa que la relación entre la fluorescencia presente en el núcleo y en el citoplasma aumenta con el tratamiento con LMB. Estos resultados

sugieren fuertemente que la NES identificada por bioinformática es funcional, y que podría estar participando en el ciclo de transporte nuclear de $\text{Ca}_v\beta_3$ *in situ*.

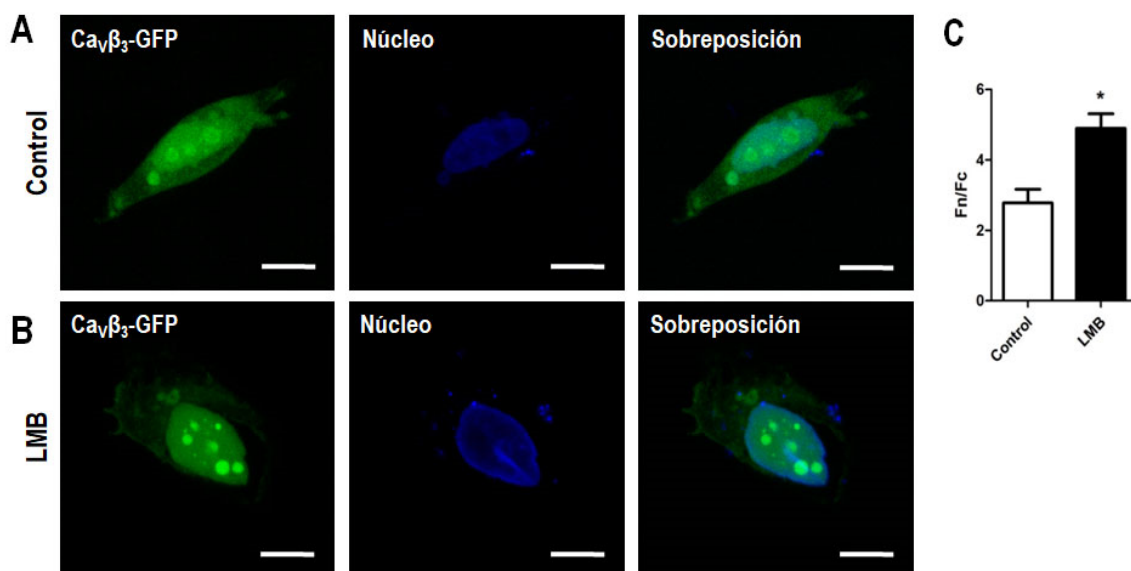


Figura 27. El tratamiento con LMB inhibe el exporte nuclear de $\text{Ca}_v\beta_3$. A) Imágenes de microscopía confocal obtenidas en células HeLa transfectadas con la clona $\text{Ca}_v\beta_3$ -GFP, tratadas con Leptomicina B (LMB) 10 nM. Los paneles superiores muestran las células HeLa en la condición control. B) Los paneles inferiores muestran las células HeLa tratadas con LMB. C) Comparación de la relación de la fluorescencia núcleo/citoplasma (Fn/Fc), Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. (n=10 células; *T*-test **p*<0.05).

7 Discusión

7.1 Transporte nuclear de Cav β ₃: mecanismo tradicional *versus piggyback*

Diversas isoformas de Cav β han mostrado una distribución subcelular entre núcleo y el citoplasma. Dentro de las más estudiadas se encuentra Cav β ₄ por la creciente evidencia de su posible papel en la regulación de la transcripción (Tadmouri *et al.*, 2012; Rima *et al.*, 2017). A pesar de ello, aún no se ha descrito cuál es el mecanismo molecular que lleva a la subunidad Cav β a ingresar al núcleo celular.

Estudios previos realizados en el nuestro laboratorio mostraron la localización nuclear de Cav β ₃, y sugirieron que el mecanismo de importe al núcleo podría estar mediado por señales de localización nuclear (NLS; Castillo, 2016; Corzo-López, 2018). Sin embargo, en el presente trabajo se corroboró que la subunidad Cav β ₃ si presenta una localización nuclear, sin embargo, que el mecanismo molecular que podría emplear Cav β ₃ en su paso al núcleo, va más allá de una vía de transporte clásico que emplea NLS. Como se muestra en la Figura 9 los tratamientos con ivermectina, un inhibidor del importe nuclear clásico, muestran una acumulación de Cav β ₃ en el citoplasma. En este contexto, al analizar por bioinformática y encontrar una posible NLS de tipo bipartita, resultó razonable sugerir que el transporte nuclear de Cav β ₃ estaba mediado por una vía de transporte clásico. Para profundizar en estos hallazgos, se decidió clonar la NLS en un vector tetra-GFP, conocido como el ensayo principal para describir la funcionalidad de las NLS puesto que se produce una proteína de un peso molecular >100 kDa, y su localización subcelular debería estar mediada por al menos una NLS funcional. Sin embargo, de manera inesperada, los datos mostraron que la proteína se acumuló en el citoplasma, lo que sugirió que la NLS de tipo bipartita

en Cav β ₃ podría no ser funcional. Esto a su vez generó diversos cuestionamientos: ¿por qué Cav β ₃ responde a los tratamientos de ivermectina si la NLS que posee no es funcional? ¿Qué mecanismo está involucrado en el transporte nuclear de Cav β ₃?

Eso llevó a pensar que Cav β ₃ podría estar empleando un mecanismo de importe nuclear no clásico o canónico. Un mecanismo alternativo que utilizan algunas proteínas para ingresar al núcleo es el llamado *piggyback*. Esta vía de transporte nuclear consiste en que una proteína actúa como chaperona o proteína de andamiaje, que favorece la interacción en este caso entre Cav β ₃ y el complejo de proteínas que media el importe nuclear (α/β importinas). De hecho, un cúmulo creciente de evidencia experimental muestra que una proteína puede poseer incluso múltiples vías de ingreso a núcleo, lo que asegura que las proteínas puedan cumplir las funciones que tienen asignadas una vez que han ingresado al núcleo. Un ejemplo de ello es la proteína DDX6, que a pesar de poseer dominios que podrían actuar como NLS, estos no son funcionales, y emplea a la proteína 4E-T como chaperona, cuya NLS si es funcional para llegar al núcleo. Este es un ejemplo del mecanismo de *piggyback* (Huang *et al.*, 2017).

En el presente trabajo de tesis se muestra que Cav β ₃ pudiese estar empleando este mecanismo, y que las proteínas que favorecen el *piggyback*, median el importe nuclear a través de una NLS funcional. De esta manera es que el transporte de Cav β ₃ es sensible al tratamiento con ivermectina, porque de forma indirecta está empleando una vía de importe nuclear clásico.

Asimismo, para completar de identificar el ciclo de transporte nuclear de la subunidad Cav β ₃, los datos aquí mostrados sugieren que la señal de exporte nuclear NES identificada en la proteína si es funcional, y que además responde al tratamiento con Leptomicina B, lo que indica que el exporte nuclear de Cav β ₃ se encuentra probablemente mediado por el sistema de la exportina-1/CRM-1 (Cerutti et al., 2011).

7.2 Interacciones de Cav β ₃ con proteínas que favorecen su localización nuclear

Los resultados de los ensayos de espectrometría de masas muestran diversas proteínas que se asocian a Cav β ₃, y por las funciones conocidas de algunas de ellas se pudo determinar su localización subcelular en el núcleo. Sin embargo, varias de ellas poseían NLS monopartitas o bipartitas y por lo tanto eran potencialmente acarreadoras de Cav β ₃ al núcleo celular. Dentro de este grupo, destacaron dos tipos de ribonucleoproteínas y una proteína de regulación nuclear. Pero además, por estudios previos ya se sabía que B56 δ también podría interactuar con Cav β ₃ y favorecer su transporte nuclear, y por un análisis bioinformático aquí se identificó además a una ribonucleoproteína y un factor de transcripción como posibles chaperonas de la subunidad Cav β ₃.

De esta manera se seleccionaron 5 proteínas que potencialmente favorecen la localización nuclear de Cav β ₃; hnRNP Q, hnRNP L, B23, B56 δ y ZFY. De manera interesante, al realizar los ensayos de PLA se encontró que Cav β ₃ interactúa con todas ellas, corroborando que éstas forman parte del interactoma de Cav β ₃. Además, resulta también interesante que varias de estas interacciones no habían sido descritas

previamente, y que el hecho de haberlas identificado abre una nueva perspectiva del estudio sobre las posibles funciones de Cav β ₃ fuera del complejo del canal.

Con respecto a cuál de estas proteínas está participando en la localización nuclear de Cav β ₃, las hnRNPs son fuertes candidatos para desempeñar este papel. El tratamiento con ivermectina por su parte, corroboran que, al inhibirse el importe nuclear, la interacción de Cav β ₃ con las hnRNPs queda restringida al citoplasma, apoyando la hipótesis de que las hnRNPs pueden mediar el ingreso al núcleo para Cav β ₃. Pero, además, estas interacciones revelan el potencial que pudiera tener Cav β ₃ para desarrollar otras funciones fuera del complejo del canal. Por ejemplo, debido a sus múltiples funciones al ser proteínas de unión a RNA, las hnRNPs podrían sugerir que Cav β ₃, pudiera estar involucradas en el mecanismo de *splicing* alternativo, en la regulación transcripcional y traduccional, y la regulación del ciclo celular, entre otros (Görlach *et al.*, 1993; Low *et al.*, 2020).

Otra proteína que mostró un posible papel en el transporte nuclear de Cav β ₃ fue B56 δ . Esta proteína ya fue reportada por Tadmouri y sus colegas (2012) como la proteína clave en el transporte nuclear de la subunidad Cav β ₄. En ese trabajo los autores mencionan que también interactúa con Cav β ₃. De hecho, los datos aquí mostrados sugieren que B56 δ muestra un comportamiento similar al de las hnRNPs al ser tratadas con ivermectina. Si bien es cierto que la cantidad de señal PLA en el núcleo es menor con B56 δ , esto no descarta el posible papel de esta proteína como mediadora en el transporte nuclear de Cav β ₃. Así, podría ser enteramente posible que la subunidad de los canales cuente con varias vías de ingreso al núcleo. Por otro lado, al ser una proteína que regula la desfosforilación, su interacción con Cav β ₃ sugiere que

podría estar modificando postraduccionalmente a la subunidad de los canales y de esta determinando de alguna manera su destino en los distintos compartimentos celulares.

7.3 Factores que favorecen la localización nuclear Cav β ₃

Otra de las interrogantes que surgieron en el transcurso de la tesis fue el identificar qué factores determinan la distribución subcelular de Cav β ₃. Debido a esto, surgió la hipótesis de la existencia de dos *pools* de Cav β ₃, uno que podría estar funcionando como subunidad reguladora del canal y otro que podría desempeñar funciones fuera del complejo del canal.

Los experimentos realizados en el presente trabajo muestran la gran afinidad de Cav β ₃ y la subunidad formadora del poro del canal. En la Figura 24 se muestra evidencia de que en ausencia del canal la distribución de la Cav β ₃ recién sintetizada es principalmente nuclear. En contraste, al coexpresarse con las demás subunidades que forman el complejo del canal calcio, se observa que Cav β ₃ se distribuye hacia la periferia de la célula, es decir el destino final de dichos canales. Los factores que determinan en qué momento Cav β ₃ se transloca al núcleo aún se desconocen, pero posiblemente la localización nuclear de Cav β ₃ esté relacionada con la diferenciación celular. Así, por ejemplo, su papel nuclear pudiera estar determinado y ser ejercido en células excitables no diferenciadas, donde la expresión de los canales es mínima. Por otro lado, una vez que las células se diferencian, tal como se observa en las células N1E-115, la expresión funcional de los canales aumenta significativamente. En este contexto, las funciones de Cav β ₃ estarían asociadas ya a la actividad funcional de los

canales. Finalmente, otro factor que pudiera determinar la localización nuclear de Cav β ₃ podría, como se mencionó anteriormente, estar asociado a las modificaciones postraduccionales de la proteína que a su vez pudieran estar ligados a la actividad eléctrica de la célula (Tadmouri *et al.*, 2012). Por ejemplo, la actividad eléctrica de las neuronas aumenta transitoriamente los niveles de calcio intracelular y esto a su vez puede incidir en la activación de una gran variedad de enzimas que podrían alterar postduccionalmente la proteína a través de la fosforilación, desfosforilación, proteólisis, o la unión de pequeños péptidos como en la ubiquitinación, la SUMOilación, etc.

7.4 Conclusiones y perspectivas

Los resultados del presente trabajo de tesis revelan un novedoso mecanismo molecular del ciclo de transporte nuclear de la subunidad Cav β ₃ en el que su ingreso al núcleo se encuentra mediado por un sistema *piggyback*, en el que principalmente las hnRNPs podrían regular el ingreso de Cav β ₃ al núcleo. Una vez en el núcleo celular Cav β ₃ posiblemente interactúa con proteínas que podrían estar participando en la regulación de la transcripción (B23 y ZFY). Una vez que cumple su posible función nuclear, Cav β ₃ es enviada de regreso al citoplasma a través de su NES por el sistema CRM-1.

Aunque se determinó con cierto nivel de detalle el ciclo de transporte nuclear de Cav β ₃, aún falta analizar su función en este compartimento celular. Los ensayos de espectrometría de masas mostraron a B23 como un buen candidato de interacción nuclear y que podría, por las acciones que desarrolla en el núcleo, podría ayudar

dilucidar también las posibles funciones de Cav β ₃ en ese compartimento celular. Cabe mencionar que B23 es una proteína que se localiza principalmente en el nucléolo y nucleoplasma (Lindström & Zhang, 2006). Por otro lado, aunque las hnRNPs juegan un papel clave en la localización nuclear de Cav β ₃, es posible que su interacción pueda estar ligada a la regulación de la transcripción, esto debido a que algunas hnRNPs pueden asociarse a proteínas con sitios de unión al ADN.

También resultaría de gran relevancia analizar si el posible papel de Cav β ₃ en la transcripción está vinculado a algún estadio del desarrollo celular que esté regulado la expresión funcional de los canales. Por otro lado, quizás la localización nuclear de Cav β ₃, sea el resultado de un proceso de reciclaje de proteína que ya ha estado asociada a los canales y que por procesamiento postraducciona se disocie del canal y permita su interacción con distintas proteínas fuera del complejo, que la lleven al núcleo celular a cumplir otras funciones.

8 Referencias

- Antzelevitch C, Pollevick G, Cordeiro J, Casis O, Sanguinetti M, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaron E, Burashnikov E, Wu Y, Sargent J, Schickel S, Oberheiden R, Bhatia A, Hsu L-F, Haissaguerre M, Schimpf R, Borggrefe M, Wolpert. (2007) Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals and sudden cardiac death. *Circulation*. 115:442-449.
- Beck M, Hurt E. (2017) The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 18:73-89.
- Beguín P, Nagashima K, Gonoï T, Shibasaki T, Takahashi K, Kashima Y, Ozaki N, Geering K, Iwanaga T, Seino S. (2001) Regulation of Ca²⁺ channel expression at the cell surface by the small G-protein kir/Gem. *Nature*. 411:701-6
- Berggren P-O, Yang S-N, Murakami M, Efanov A, Uhles S, Köhler M, Moede T, Fernström A, Appelskog I, Aspinwall C, Zaitsev S, Larsson O, Moitoso de Vargas L, Fecher-Trost C, Weissgerber P, Ludwing A, Leibiger B, Juntti-Berggren L, Barker C, Gromada J, Freichel M, Leibiger I, Flockerzi V. (2004) Removal of Ca²⁺ channel β_3 subunit enhances Ca²⁺ oscillation frequency and insulin exocytosis. *Cell*. 119:273:284.
- Buraei Z, Yang J. (2010) The β subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Physiol Rev* 90:1461-1506.
- Buraei Z, Yang J. (2013) Structure and function of the β subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Biochim Biophys Acta*. 7:1530-1540.

- Calderon-Rivera A, Andrade A, Hernandez-Hernandez O, Gonzalez-Ramirez R, Sandoval A, Rivera M, Gomora JC, Felix R. Identification of a disulfide bridge essential for structure and function of the voltage-gated Ca^{2+} channel $\alpha_2\delta$ -1 auxiliary subunit. *Cell Calcium*. 51:22-30
- Castillo V. (2016) Transporte nuclear de la subunidad $\text{Cav}\beta_3$ de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Tesis de Maestría. Departamento de Biología Celular. Cinvestav.
- Catterall W. (2011) Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 3:a003947.
- Catterall W, Lenaeus M, Gamal El-Din T. (2020) Structure and pharmacology of voltage-gated sodium and calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* .60:133-154.
- Cerutti A, Maillard P, Minisini R, Vidalain PO, Roohvand F, Pecheur EI, Pirisi M, Budkowska A. (2011) Identification of a functional, CRM-1-dependent nuclear export signal in hepatitis C virus core protein. *PLoS One* 6, e25854.
- Chen Y-H, Li M-H, Zhang Y, He L-l, Yamada Y, Fitzmaurice A, Shen Y, Zhang H, Tong L, Yang J. (2004) Structural basis of the α_1 - β subunit interaction of voltage gated Ca^{2+} channels. *Nature*. 429:675-680.
- Cordeiro J, Marieb M, Pfeiffer R, Calloe K, Burashnikov E, Antzelevitch C. (2009) Accelerated inactivation of the L-type calcium current due to a mutation in *CACNB2b* underlies brugada syndrome. *J Mol Cell Cardiol*. 46:695-703.

- Corzo-López A. (2018) Caracterización del ciclo de transporte nuclear de la subunidad auxiliar Cav β_3 de los canales de calcio. Tesis de Maestría. Departamento de Biología Celular. Cinvestav.
- Davies A, Kadurin I, Alvarez-Laviada A, Douglas L, Nieto-Rostro M, Bauer C, Pratt W, Dolphin A. (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.
- Davies T.A, Loos B, Engelbrecht A-M. (2014) AHNAK: The giant jack of all trades. *Cell Signal*. 26:2683-2693.
- De Waard, Pragnell M, Campbell K. (1994) Ca²⁺ channel regulation by a conserved β subunit domain. *Neuron*. 13:495-503.
- Dolphin A (2003) β subunits of voltage-gated calcium channels. *J Bioenerg Biomembr*. 35:599-620.
- Dolphin A. (2012) Calcium channel auxiliary $\alpha_2\delta$ and β subunits: trafficking and one step beyond. *Nat Rev Neurosci*. 13:542-555.
- Dolphin A (2012) The $\alpha_2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim Biophys Acta*. 1828:1541-1549.
- Escayg A, De Waard M, Lee D, Bichet D, Wolf P, Mayer T, Johnston J, Baloh R, Sander T, Meisler M. (2000) Codin and noncoding variation of the human calcium-channel β_4 -subunit gene *CACNB4* in patients with idiopathic generalized epilepsy and episodic ataxia. *Am J Hum Genet*. 66:1531-1539.

- Fan M, Buraei Z, Luo H-R, Levenson-Palmer R, Yang J. (2010) Direct inhibition of P/Q-type voltage-gated Ca²⁺ channels by Gem does not require a direct Gem/Cav β interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 107(33):14887-92.
- Felix R. (2005) Molecular regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *J Recept Signal Transduct Res*. 25:57-71.
- Felix R, Calderon-Rivera A, Andrade A. (2013) Regulation of high-voltage-activated Ca²⁺ channel function, trafficking, and membrane stability by auxiliary subunits. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*. 5:207-220.
- Geisler S, Schöpf C, Obermair G. (2014) Emerging evidence for specific neuronal functions of auxiliary calcium channel $\alpha\delta$ subunits. *Gen Physiol Biophys*. 34:105-118.
- Gerhardstein B, Puri T, Chien A, Hosey M. (1999) Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the β_2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry*. 38:10361-10370.
- Görlach M, Burd C, Portman D, Dreyfuss G. (1993) The hnRNP proteins *Mol Biol Rep*. 18:73-78.
- Gregg R, Messing A, Strube C, Beurg M, Moss R, Behan M, Sukhareva M, Haynes S, Powell J, Coronado R, Powers P. (1996) Absence of the β subunit (*cchb1*) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the α_1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:13961-13966.
- Huang JH, Ku WC, Chen YC, Chang YL, Chu CY. (2017) Dual mechanisms regulate the nucleocytoplasmic localization of human DDX6. *Sci Rep*. 7:42853.

- Ishizawa J, Kojima K, Hail N, Tabe Y, Andreeff M. (2015) Expression, function, and targeting of the nuclear exporter chromosome region maintenance 1 (CRM1) protein. *Pharmacol Ther.* 153:25-35.
- Kao S, Wang W, Chen C, Chang Y, Wu Y, Wang Y, Wang S, Nesvizhskii A, Chen Y, Hong T, and Yang P. (2015) Analysis of protein stability by the cycloheximide chase assay. *Bio Protoc.* 5:e1374.
- Karunasekara Y, Dulhunty A, Casarotto M. (2009) The voltage-gated calcium-channel β subunit: more than just an accessory. *Eur Biophys J.* 39:75-81.
- Lacinova L. (2005) Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys.* 1:1-78
- Lange A, Mills R, Lange C, Stewart M, Devine S, Corbett A. (2007) Classical nuclear localization signals: Definition, function, and interaction with importin α . *J Biol Chem.* 282:5101-5105.
- Lindström M & Zhang Y. (2006) B23 and ARF: friends or foes? *Cell Biochem Biophys.* 46:79-90.
- Low Y-H, Asi Y, Foti S, Lashley T. (2020) Heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins: Implications in neurological diseases. *Mol Neurobiol.* 58:631-646.
- Murakami M, Fleischmann B, De Felipe C, Freichel M, Trost C, Ludwig A, Wissenbach U, Schwegler H, Hofmann F, Hescheler J, Flockerzi V, Cavalié A. (2002) Pain perception in mice lacking the β_3 subunit of voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem.* 277:40342-40351.
- Opatowsky Y, Chomsky-Hecht, Kang M-G, Campbell K, Hirsch J. (2003) The voltage-dependent calcium channel β subunit contains two stable interacting domains. *J Biol Chem.* 278:52323-52332.

- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP. (1994) Calcium channel β -subunit binds to a conserved motif the I-II cytoplasmic linker of the α_1 -subunit. *Nature*. 368:67-70.
- Pumroy R, Cingolani G. (2015) Diversification of importin α isoforms in cellular trafficking and disease states. *Biochem J*. 466:13-28
- Reichhart N, Milenkovic V, Halsband C-A, Cordeiro S, Strauss O. (2010) Effect of bestrophin-1 on L-type Ca^{2+} channel activity depends on the Ca^{2+} channel β -subunit. *Exp Eye Res*. 91:630-639.
- Rima M, Daghsni M, Fajloun Z, M'rad R, Brusés J, Ronjat M, De Waard M. (2016) Protein partners of the calcium channel β subunit highlight new cellular functions. *Biochem J*. 473:1931-1488.
- Rima M, Daghsni M, De Waard S, Gaborit N, Fajlouj Z, Ronjat M, Mori Y, Brusés J, De Waard M. (2017a) The β_4 subunit of the voltage-gated calcium channel (*Cacnb4*) regulates the rate of cell proliferation in chinese hamster ovary cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 28:57-70.
- Rima M, Daghsni M, Lopez A, Fajloun Z, Lefrancois L, Dunach M, Mori Y, Merle P, Brusés J, De Waard M, Ronjat M. (2017b) Down-regulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by *Cacnb4*. *Mol Biol Cell*. 28:3699-3708.
- Sandoval A, Arikath J, Monjaraz E, Campbell K, Felix R. (2007a) γ_1 -dependent-down-regulation of recombinant voltage-gated Ca^{2+} channels. *Cell Mol Neurobiol*. 27:901-908.
- Sandoval A, Andrade A, Beedel A, Campbell K, Felix R. (2007b) Inhibition of recombinant N-type Ca_v channels by the γ_2 subunit involves unfolded protein

- response (UPR)- dependent and UPR-independent mechanisms. *J Neurosci.* 27:3317-3327
- Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler D, Dang Y, Bhat S, Merrick W, Green R, Shen B, Liu J. (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol.* 6:209-217.
- Shengnan L, Paterno G, Gillespie L. (2013) Nuclear localization of the transcriptional regulator MIER1 α requires interaction with HDAC1/2 in breast cancer cells. *Plos One.* 8:84046
- Simms B, Zamponi G. (2014) Neuronal voltage-gated calcium channels: Structure, function and dysfunction. *Neuron.* 82:24-45.
- Stewart M. (2007) Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:192-208.
- Subach FV, Subach OM, Gundorov IS, Morozova KS, Piatkevich KD, Cuervo AM, Verkhusha VV. (2009) Monomeric fluorescent timers that change color from blue to red report on cellular trafficking. *Nat Chem Biol.* 5, 118-126.
- Subramanyam P, Obermair G, Baumgartner S, Gebhart M, Striessnig J, Kaufmann W, Geley S, Flucher B. (2009) Activity and calcium regulate nuclear targeting of the calcium channel β_{4b} subunit in nerve and muscle cell. *Channels.* 5:343-355.
- Tadmouri A, Kiyonaka S, Barbado M, Rousset M, Fablet K, Sawamura S, Bahembera E, Pernet-Gallay K, Arnoult C, Miki T, Sadoul K, Gory-Faure S, Lambrecht C, Lesage F, Akiyama S, Khochbin S, Baulande S, Janssens V, Andrieux A, Dolmetsch R, Ronjat M, Mori Y, De Waard M. (2012) *Cacnb4* directly couples electrical activity

- to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *EMBO J.* 31:3730-3744.
- Taylor J, Pereyra A, Zhang T, Messi M, Wang Z-Min, Hereñú C, Kuan P-F, Delbono O. (2014) The Cav β _{1a} subunit regulates gene expression and suppresses myogenin in muscle progenitor cells. *J Cell Biol.* 205:829-849.
- Tomita S, Shenoy A, Fukata Y, Nicoll RA, Brecht DS. (2007) Stargazin interacts functionally with the AMPA receptor glutamate-binding module. *Neuropharmacology.* 52:87-91.
- Yang L, Liu G, Zakharov S, Bellinger A, Mongillo M, Marx S. (2007) Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 α _{1c} and β ₂ subunits. *Circ Res.* 101:465-474.
- Yang T, Colecraft H. (2013) Regulation of voltage-dependent calcium channels by RGK proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1828:1644-1654.
- Viard P, Butcher A, Halet G, Davies A, Nürnberg B, Hebllich F, Dolphin A. (2004) PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nat Neurosci.* 7:939-946.
- Wagstaff K, Jans D. (2009) Importins and beyond: Non-conventional nuclear transport mechanisms. *Traffic.* 10:1188-1198.
- Wagstaff K, Sivakumaran H, Heaton S, Harrich D, Jans D. (2012) Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem J.* 443:851-856.
- 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.

Xu X, Lee Y, Holm J, Terry M, Oswald R, Horne W. (2011) The Ca²⁺ channel β_{4c} subunit interacts with heterochromatin protein 1 via a PXVXL binding motif. *J Biol Chem.* 286:9677-9687.

Zamponi G, Striessnig J, Koschak A, Dolphin A. (2015) The physiology, pathology and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev.* 67:821-870.

Zhang T, Taylor J, Jiang Y, Pereyra A, Messi M, Wang Z-M, Hereñú C, Delbono O. (2015) Troponin T3 regulates nuclear localization of the calcium channel Cav β_{1a} subunit in skeletal muscle. *Exp Cell Res.* 336:276-286.

Zhang Y, Yamada Y, Fan M, Bangaru S, Lin B, Yang J. (2010) The β subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels interacts with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6. *J Biol Chem.* 285:2527-2536.