



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

Regulación de los canales de calcio neuronales de tipo L (Cav1.3) por α -sinucleína

TESIS

Que presenta

Q.B.T. Susana María Ayala Cháidez

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA CELULAR

Director de Tesis

Dr. Diego Ricardo Félix Grijalva

Ciudad de México

Septiembre, 2023

PREFACIO

Los canales Cav constituyen uno de los más importantes reguladores de la entrada de calcio a las células. Por lo tanto, la señalización dependiente de este ion está sujeta a múltiples interacciones moleculares que resultan en una regulación muy fina de su actividad. En la actualidad se han descrito una gran variedad de estas interacciones y su repercusión funcional recién se empieza a hacer evidente. En la enfermedad de Parkinson, el funcionamiento anormal de los canales Cav en general, y particularmente de los del tipo Cav1.3, puede provocar la formación de agregados de α -sinucleína, así como su liberación al espacio extracelular. Aunque en la actualidad se conoce poco de las funciones celulares de la α -sinucleína, se ha especulado que podría regular a la baja la actividad de los canales Cav controlando la formación y liberación de agregados de α -sinucleína, conformando un sistema de retroalimentación que prevendría el establecimiento de la enfermedad. Por lo tanto, la finalidad del presente trabajo de tesis es investigar si la proteína α -sinucleína puede interactuar funcionalmente con los canales Cav1.3.

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio #4 del departamento de Biología Celular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav) bajo la dirección del Dr. Ricardo Félix Grijalva y con la asesoría de los doctores Guillermo Elizondo Azuela y Enrique Hernández González, todos profesores titulares del Departamento de Biología Celular.

Durante el tiempo que realicé los estudios correspondientes a la maestría fui beneficiaria de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ricardo Félix por aceptarme y permitirme realizar este proyecto en su laboratorio, por las enseñanzas y consejos que me han ayudado a desempeñarme de mejor manera.

A mis asesores el Dr. Guillermo Elizondo y el Dr. Enrique O Hernández G por sus consejos y aportes a este trabajo de tesis.

Al Dr. Ricardo González por sus enseñanzas y apoyo.

Al Dr. Alejandro Sandoval por su apoyo y enseñanzas en las técnicas de electrofisiología.

A la Biol. Mercedes Urban por su ayuda en los cultivos celulares. Al Ing. Hugo Cadena por el apoyo técnico.

A la M. en C. Margarita Leyva, por su ayuda en las técnicas de microscopía.

A Cristina Jaramillo por su amistad y compañerismo.

A mis compañeros del laboratorio, el M. en C. David Muñoz y la Dra. Alejandra Corzo por sus enseñanzas y su apoyo, así como a mis compañeras del departamento de Fisiología, la M. en C. Natalie Jiménez y la Dra. Miriam Fernández, aunque fue poco el tiempo que compartimos, agradezco sus consejos, apoyo y los momentos de distracción.

A mi familia que siempre me apoya en mis proyectos.

Al QBT Alberto Ortiz por su motivación, compañerismo, apoyo incondicional y amor, en las buenas y en las malas.

CONTENIDO	
PREFACIO	2
AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1 INTRODUCCIÓN	8
1.1 Canales iónicos	8
1.2 Estructura y función de los canales de calcio dependientes de voltaje (CaV)	9
1.3 Estructura y función de la α -sinucleína (α -syn)	14
1.4 Homeostasis de Ca ²⁺ intracelular en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson	17
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
3 JUSTIFICACIÓN	22
4 HIPÓTESIS	24
5 OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos específicos	25
6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
7 MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1 Cultivos celulares	27
7.2 Clonas de ADNc y transfección transitoria	27
7.2.1 Análisis bioinformático	27
7.2.2 Construcción y análisis de los plásmidos	30
7.2.3 Secuenciación automática	34
7.2.4 Transfección transitoria	35
7.3 Inmunoelectrotransferencia (Western blot, WB)	36

7.4 Ensayos de interacción proteína-proteína	38
7.4.1 Inmunoprecipitación	38
7.4.2 Ensayo de proximidad de ligando (PLA)	40
7.5 Electrofisiología	41
7.6 Análisis estadístico	44
8 RESULTADOS	45
8.1 Obtención de la clona de ADNc para α -sinucleína	45
8.1.1 Análisis del plásmido pT7-7 WT y clonación en el vector TOPO	45
8.1.2 Análisis in silico de la clonación	47
8.1.3 Clonación del ADNc para α -sinucleína por PCR y análisis del plásmido que codifica para CaV1.3	50
8.1.4 Secuenciación automática de la construcción de α -syn	54
8.2 Expresión de las proteínas en el sistema heterólogo e inmunoprecipitación	55
8.2.1 Inmunoprecipitación (IP)	57
8.3 Interacción de las proteínas evidenciada por ensayos PLA	60
8.4 Ensayos funcionales	61
9 DISCUSIÓN	67
9.1 Relación entre los canales de calcio, α -sinucleína y enfermedad de Parkinson	67
9.2 Perspectivas	71
10 REFERENCIAS	74

RESUMEN

Los iones de calcio contribuyen a determinar las propiedades eléctricas de las células excitables y además actúan como un segundo mensajero en diferentes eventos fisiológicos. Para su ingreso a las células, el calcio requiere de vías de permeabilidad en la membrana plasmática entre las que destacan los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav). Estos canales se clasifican en dos grandes grupos, de bajo umbral de activación (LVA), conformados por una subunidad conductora de los iones, Cav α_1 , y canales de alto umbral de activación (HVA), conformados por la subunidad Cav α_1 y por subunidades auxiliares llamadas Cav β , Cav $\alpha_2\delta$ y Cav γ . Dependiendo del tipo de subunidad Cav α_1 que los conforma, los canales Cav se clasifican en tres familias Cav1-Cav3. Los canales Cav1 (tipo L) incluyen a los Cav1.3 que son el objeto central de estudio del presente trabajo de tesis. En estados patológicos, los canales Cav1.3 participan en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (EP), que se caracteriza principalmente por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la *sustantia nigra pars compacta* y que desencadena los síntomas motores clásicos de la enfermedad. Además, en la EP se tiene la participación de la proteína citosólica α -sinucleína (α -syn), un regulador de la homeostasis sináptica, la cual es abundante en las neuronas y no se encuentra estructurada de forma nativa. De manera interesante, en la EP el calcio intracelular elevado induce la oligomerización y agregación de α -syn, y se ha especulado que la α -syn podría, a su vez, estar regulando la actividad de los canales de calcio. En el presente trabajo se muestran evidencias de una posible interacción molecular entre los canales Cav1.3 y la α -syn, mediante la técnica de PLA en la línea celular HEK-293 transfectada transitoriamente con el complejo de los canales y la proteína α -syn. Además, la posible relevancia funcional de esta novedosa interacción molecular se estudió mediante experimentos de electrofisiología en células HEK-293 que expresan heterológicamente los canales Cav1.3 en ausencia y presencia de α -syn. De manera interesante, los datos muestran una regulación diferencial de α -syn sobre los canales Cav1.3 que al parecer depende del tipo de subunidad Cav β presente en el complejo del canal. Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos muestran una probable relación, hasta ahora desconocida, relevante para la fisiología de las neuronas, y

dado que ambas moléculas han sido implicadas en la fisiopatología de la EP, puede sentar las bases de un importante campo de estudio.

ABSTRACT

Calcium ions contribute to determining the electrical properties of excitable cells and function as a second messenger in different physiological events. For its entry into cells, calcium requires permeability pathways in the plasma membrane, among which voltage-gated calcium channels (Cav) are prominent. These channels are classified into two families, low voltage-activated (LVA) channels, conformed by an ion-conducting subunit Cav α_1 , and high voltage-activated (HVA) channels, comprising the Cav α_1 subunit and auxiliary subunits called Cav β , Cav $\alpha_2\delta$, and Cav γ . Depending on the type of Cav α_1 subunit that the channel contains, Cav channels are classified into three subfamilies (Cav1-Cav3). The Cav1 channels (type L) include the Cav1.3 channels that are the central object of study in this thesis work. In pathological states, Cav1.3 channels participate in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease (PD), characterized by the loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta* and which triggers the classic motor symptoms of the disease. In addition, the pathophysiology of PD has the participation of the cytosolic protein α -synuclein (α -syn), a regulator of synaptic homeostasis, which is abundant in neurons and is not natively structured. Interestingly, in PD, elevated intracellular calcium induces α -syn oligomerization and aggregation, and it has been speculated that α -syn could, in turn, regulate calcium channel activity. This thesis shows evidence of a possible molecular interaction between Cav1.3 channels and α -syn, using the PLA technique in the HEK-293 cell line transiently transfected with the channel complex and the α -syn protein. Furthermore, the possible functional relevance of this novel molecular interaction was studied by electrophysiology in HEK-293 cells heterologously expressing Cav1.3 channels in the absence and presence of α -syn. Interestingly, the data show a differential regulation of α -syn on Cav1.3 channels that seems to depend on the type of Cav β subunit present in the channel complex. Taken together, the results show a probable relationship, hitherto unknown, relevant to the physiology of neurons, and given that both molecules have been implicated in the pathophysiology of PD, it may lay the foundations for an important field of study.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Canales iónicos

En la membrana plasmática se tienen vías de permeabilidad especializadas que permiten el paso de diferentes moléculas cargadas como es el caso de los iones. Estas vías incluyen a los canales iónicos, los cuales son proteínas integrales de membrana que facilitan de manera selectiva el flujo de una especie iónica. Los canales iónicos se clasifican en tres grandes familias dependiendo el estímulo por el cual son activados. La primera de ellas agrupa a los canales dependientes de voltaje que responden a cambios en el voltaje transmembranal; los canales activados por ligandos, los cuales se activan por la unión de un ligando específico extra o intracelular a su receptor, el cual se encuentra acoplado a un canal iónico; y, por último, los canales activados por estímulos físicos, como el estiramiento de la membrana o la temperatura (Islam *et al.*, 2021) (Fig. 1).

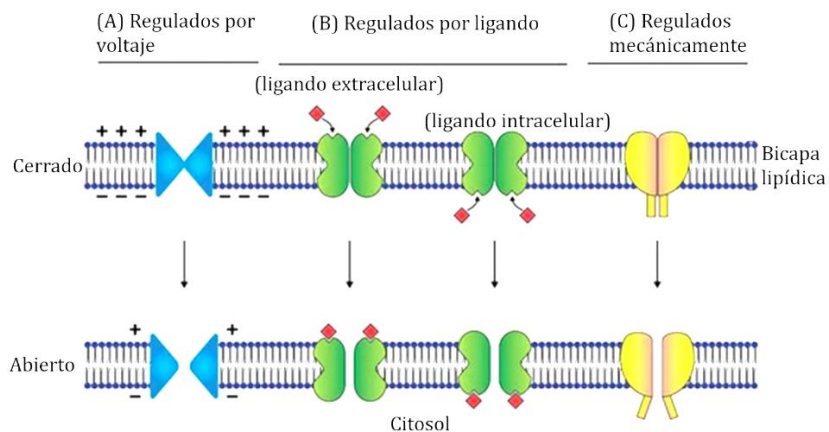


Figura 1. Clasificación de los canales iónicos. A) Los canales activados por voltaje se activan al detectar los cambios en el potencial de la membrana. B) los canales activados por ligandos reconocen a ligandos intra o extracelulares como el GABA, el glutamato o el calcio; y C) los canales activados por estímulos físicos se activan por mecanotención de la membrana o cambios significativos de temperatura (tomado de Islam *et al.*, 2021).

Los canales iónicos dependientes de voltaje contribuyen a iniciar y mantener una gran variedad de funciones celulares y pueden transportar hasta millones de iones por segundo sin necesidad de energía metabólica. Estas proteínas se caracterizan por poseer una maquinaria molecular que determina su activación, inactivación y cierre, así como un filtro de selectividad iónica, que permite el paso de especies iónicas específicas, entre las que destacan el Na^+ , el K^+ , el Ca^{2+} y el Cl^- (Gadsby, 2009; Islam *et al.*, 2021).

1.2 Estructura y función de los canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v)

El calcio es un catión divalente cuya entrada en las células afecta las propiedades eléctricas de las células, pero además actúa como un segundo mensajero regulando diversas vías de señalización intracelular. Debido a estas características, los canales de calcio dependientes de voltaje (Ca_v) tienen un papel dual en la fisiología celular (Fig. 2), por un lado, al conducir los iones de Ca^{2+} , una molécula cargada, influyen en las propiedades eléctricas de células excitables, por ejemplo, en las células marcapasos cardíacas y neuronales. Por otro lado, al ingresar Ca^{2+} a la célula, éste ion puede contribuir a regular una gran variedad de eventos fisiológicos en donde participa como segundo mensajero, por ejemplo, en el acople excitación-contracción del músculo esquelético, el acople excitación-transcripción, en donde activa proteínas que participan en cascadas de señalización que resultan en el control de la expresión de genes, y en el acople excitación-secreción, en donde activa una serie de proteínas dependientes de calcio que sirven para el acercamiento y fusión de las vesículas secretoras a la membrana plasmática, con la consecuente liberación de diferentes hormonas y neurotransmisores (Snutch, 2008).

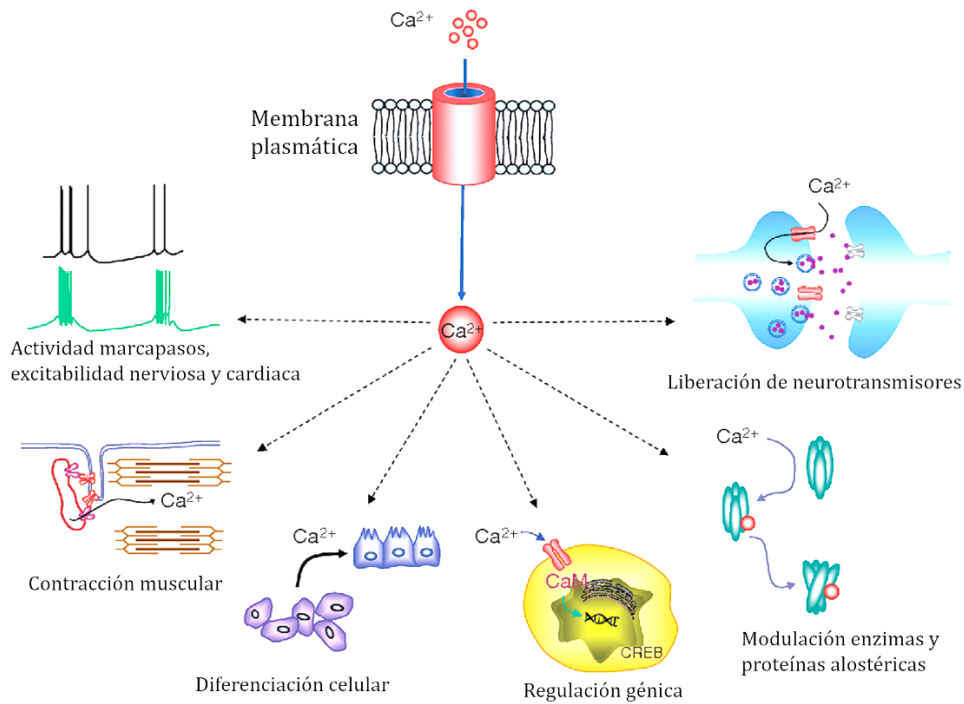


Figura 2. Funciones de los canales de calcio dependientes de voltaje (Cav). Los canales Cav se abren en respuesta a la despolarización de la membrana plasmática facilitando el flujo del calcio y aumentando su concentración intracelular, lo que afecta las propiedades eléctricas de la membrana; además, regula diferentes procesos celulares sensibles a calcio como la contracción muscular, la diferenciación celular, la transcripción génica, la modulación de enzimas y proteínas alostéricas, así como en la neurotransmisión (tomado de Snutch, 2008).

Desde el punto de vista bioquímico y molecular, los canales Cav son proteínas oligoméricas que se encuentran presentes en la membrana plasmática de células nerviosas, musculares, cardíacas, endocrinas, β -pancreáticas e inmunológicas, entre otras, y constituyen la principal vía de entrada de Ca^{2+} a la célula en respuesta a cambios en el voltaje transmembranal. Los canales Cav se clasifican en dos grandes grupos de acuerdo con sus propiedades electrofisiológicas: de bajo umbral de activación (LVA, por sus siglas en inglés, *low-voltage activated*), también llamados canales de tipo T, y de alto umbral de

activación (HVA, *high-voltage activated*), que incluye los tipos L, N, P/Q y R (Tabla 1; Weiss & Zamponi, 2012; Zamponi *et al.*, 2015). Los miembros de la clase HVA son oligómeros de una subunidad principal Cav α_1 formadora del poro que se co-ensambla en un complejo de subunidades auxiliares Cav β , Cav $\alpha_2\delta$ y, en algunos casos, Cav γ (Fig. 3). En contraste, los miembros de la clase LVA son monómeros de la subunidad Cav α_1 . La subunidad Cav α_1 define el subtipo de canal, mientras que las subunidades auxiliares regulan su función y expresión membranar (Felix *et al.*, 2013; Campiglio & Flucher, 2015; Zamponi *et al.*, 2015).

Tabla 1. Clasificación de los canales Cav.

	Subunidad Cav	Corriente	Localización
HVA	Cav1.1		Músculo esquelético
	Cav1.2		Músculo cardiaco, músculo liso, neuronas, células endócrinas
	Cav1.3	Tipo L	Neuronas, músculo esquelético, células endócrinas
	Cav1.4		retina
	Cav2.1	Tipo P/Q	Neuronas, células β -pancreáticas
	Cav2.2	Tipo N	Neuronas
	Cav2.3	Tipo R	Neuronas, células endócrinas
LVA	Cav3.1		Neuronas, músculo cardiaco/esquelético, células endócrinas
	Cav3.2	Tipo T	Neuronas, músculo cardiaco/esquelético, células endócrinas, hígado
	Cav3.3		Neuronas, células espermatozógenas

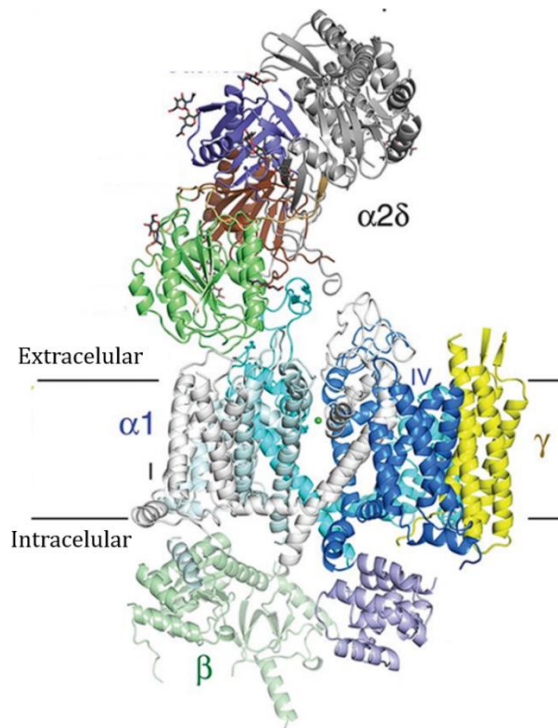


Figura 3. Estructura molecular de los canales Cav. Los canales HVA además de tener la subunidad principal Cav α_1 formadora del poro tiene subunidades auxiliares Cav β , Cav $\alpha_{2\delta}$ y Cav γ . La imagen corresponde a la estructura determinada con crio-EM del complejo Cav1.1 de conejo con una resolución nominal de 4.2 Å. Cabe mencionar aquí que los canales LVA funcionan como monómeros de la subunidad principal Cav α_1 (modificado de Wu *et al.*, 2015).

La subunidad Cav α_1 está conformada por cuatro dominios homólogos repetidos, cada uno formados por 6 segmentos transmembranales y los cuales se unen entre sí mediante lazos intracelulares. El segmento 4 funciona como sensor de voltaje y los segmentos 5 y 6 se organizan alrededor del poro conductor de iones (Fig. 4).

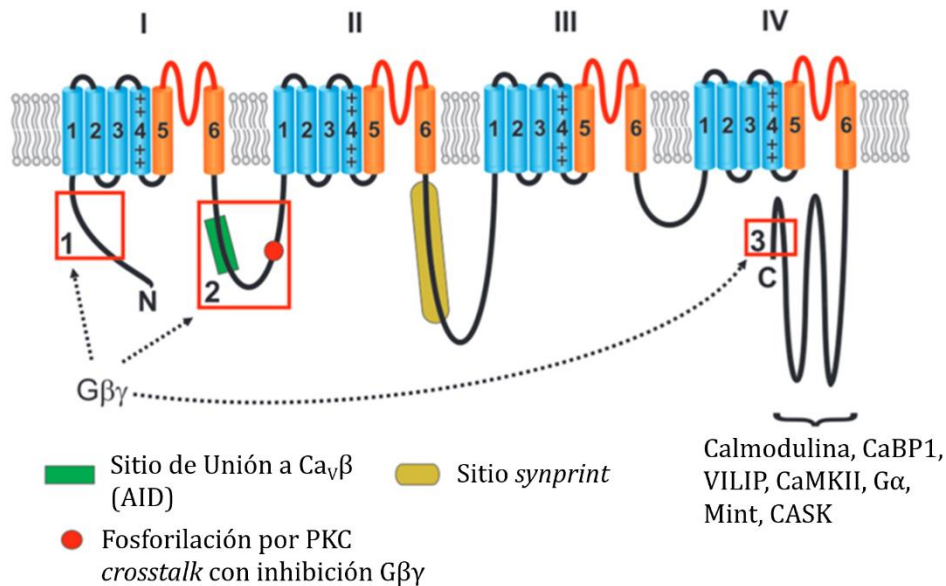


Figura 4. Estructura de la subunidad formadora del poro. La subunidad $Ca_v\alpha_1$ está formada por cuatro dominios homólogos repetidos (I-IV), unidos por lazos o asas citoplasmáticas, cada uno de ellos cuenta con 6 segmentos transmembranales (S1-S6), en donde el segmento 4 es el sensor de voltaje ya que contienen aminoácidos cargados positivamente, y los segmentos 5 y 6 conforman el poro conductor de los iones. La subunidad $Ca_v\beta$ se une al asa de los dominios I-II, la subunidad $Ca_v\alpha_2\delta$ interactúa con $Ca_v\alpha_1$ en el primer lazo extracelular del dominio I y el lazo extracelular 5 del dominio II y III. En el asa que conecta los dominios II y III se encuentra un sitio de interacción con proteínas sinápticas llamado *synprint*. La subunidad $Ca_v\alpha_1$ cuenta además con diversos dominios de interacción con diferentes proteínas que regulan su actividad, entre las que destacan la calmodulina y las proteínas G, según se indica (tomado de Currie, 2010).

Se sabe que existen cuatro diferentes subtipos de canales de tipo L llamados $Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ y $Ca_v1.4$. Los canales $Ca_v1.3$, objeto central del presente trabajo de tesis, se expresan en el cerebro, en receptores del oído interno, en el nodo sinoauricular y en células endocrinas. Asimismo, se sabe que contribuyen a diversas funciones como el desarrollo de la memoria al miedo, la potenciación a largo plazo y la conducta emocional. En el nodo sinoauricular los canales $Ca_v1.3$ determinan las propiedades funcionales de las células marcapaso, mientras que en el oído interno son responsables de la liberación de

neurotransmisores (Striessnig *et al.*, 2010; Zamponi *et al.*, 2015; Berger & Bartsch, 2014). Algunas mutaciones o alteraciones en la subunidad Cav1.3 se han asociado con diferentes trastornos neuropsiquiátricos y con el proceso neurodegenerativo en la enfermedad de Parkinson (EP) (Zamponi *et al.*, 2015; Sandoval *et al.*, 2022).

1.3 Estructura y función de la α -sinucleína (α -syn)

Por otro lado, la α -sinucleína (α -syn) es una proteína neuronal pequeña y abundante que no está estructurada de forma nativa. En el citosol existe como monómero y puede plegarse o adoptar una estructura de α hélice (Fig. 5), mientras que en su región N-terminal, en presencia de lípidos cargados negativamente, se une a la proteína sinaptobrevina-2 (o VAMP2) y se expresa predominantemente en el cerebro, especialmente en la neocorteza, el hipocampo, la *sustantia nigra* (SN), el tálamo y el cerebelo (Burré *et al.*, 2010; Choia *et al.*, 2013; Emamzadeh, 2016; González *et al.*, 2019). Específicamente, la proteína se encuentra en las terminales presinápticas de las neuronas del sistema nervioso central y en los cuerpos de Lewy (LB), y constituye hasta el 1% de la proteína soluble en el cerebro humano. La proteína consta de 140 aminoácidos (~14.5 kDa), y pertenece a la familia de las sinucleínas, un grupo de proteínas “intrínsecamente desordenadas” enriquecidas en el cerebro de los vertebrados (Maroteaux *et al.*, 1988; Burré *et al.*, 2012). Atendiendo a su estructura primaria, la α -syn se divide en tres regiones, la N-terminal (residuos 1-60) que contiene repetidos de la secuencia KTKEGV y participa en la unión a lípidos; la región del componente no amiloide (NAC, residuos 61-95), que es hidrofóbica y fibrilogénica; y la región C-terminal (residuos 96-140), rica en residuos P, N y Q esenciales para bloquear el ensamblaje de filamentos. Algunas de las funciones que se han propuesto para esta proteína incluyen la captación, el almacenamiento y el reciclaje

de vesículas de neurotransmisores; el mantenimiento de los niveles de dopamina; la modulación de la actividad de la calmodulina (CaM) y como una proteína chaperona para favorecer la unión de proteínas del complejo de proteínas SNARE (Emamzadeh, 2016; González *et al.*, 2019).

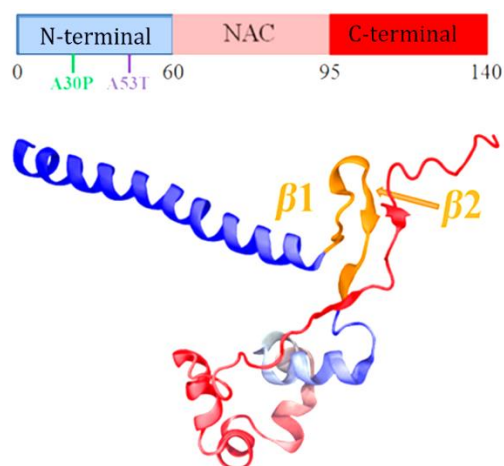


Figura 5. Estructura molecular de la α -syn. La α -syn es una proteína intracelular de ~ 14.5 kDa formada por 140 aminoácidos. Su estructura primaria se divide en tres dominios, la región N-terminal (1-60), el componente no-amiloide (NAC, 61-95) y la región C-terminal (96-140). Las primeras dos regiones sirven de enlace a las membranas biológicas, mientras que la región C-terminal es la responsable de facilitar la interacción de α -syn con diferentes proteínas y mantener la solubilidad de los monómeros (modificado de Yu *et al.*, 2015).

Dentro de estas funciones, una de las más importantes es su participación en la regulación de la homeostasis sináptica, ya que su interacción con proteínas sinápticas que controlan la exocitosis vesicular (fosfolipasa D2 y la familia de pequeñas GTPasas RAB32) es crucial para la propagación del impulso nervioso (Lautenschläger *et al.* 2018). Esto se logra al actuar como chaperona para el complejo de proteínas SNARE influyendo en su ensamblaje y controlando su degradación, ya que, al contribuir al mantenimiento y distribución

espacial de este complejo, participa directamente en la liberación de neurotransmisores, incluida la dopamina (Lashuel *et al.*, 2013; Snead & Eliezer, 2014) (Fig. 6).

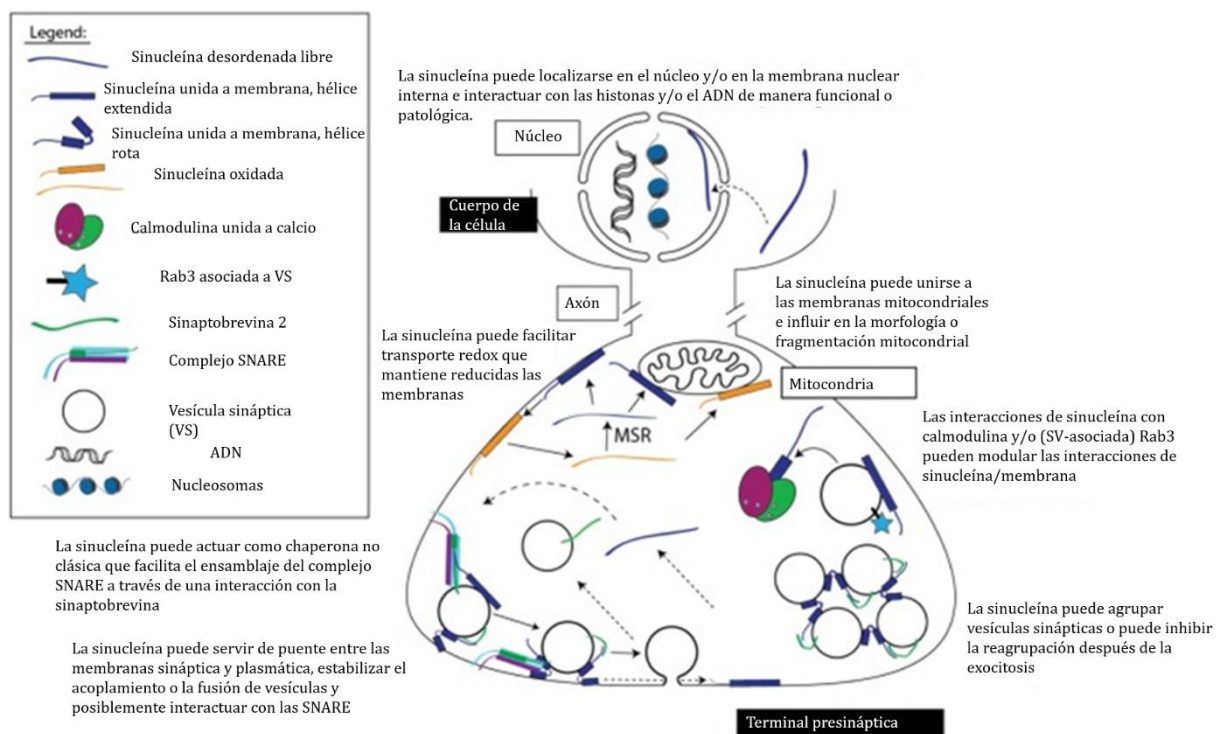


Figura 6. Membranas celulares, dianas y vías potencialmente implicadas en las funciones de la α -syn (tomado de Snead & Eliezer, 2014).

La α -syn también se ha asociado con la dinámica de los microtúbulos (funcionando como proteína MAP) al interactuar con proteínas como la tubulina, la cual puede contribuir a la formación de fibrillas de α -syn en las enfermedades neurodegenerativas asociadas a ella (Alim *et al.*, 2004; Lashuel *et al.*, 2013). Por último, la α -syn, además de actuar en el citoplasma, se puede secretar al líquido cefalorraquídeo y ser absorbida por las neuronas (Stefanis *et al.*, 2019). En condiciones patológicas, como en la EP, estas especies de α -syn

tienen la capacidad de propagarse a lo largo de redes neuronales interconectadas lo que conduce a una alteración funcional progresiva, y en última instancia, a la muerte celular (Bieri *et al.*, 2018) (Fig. 7).

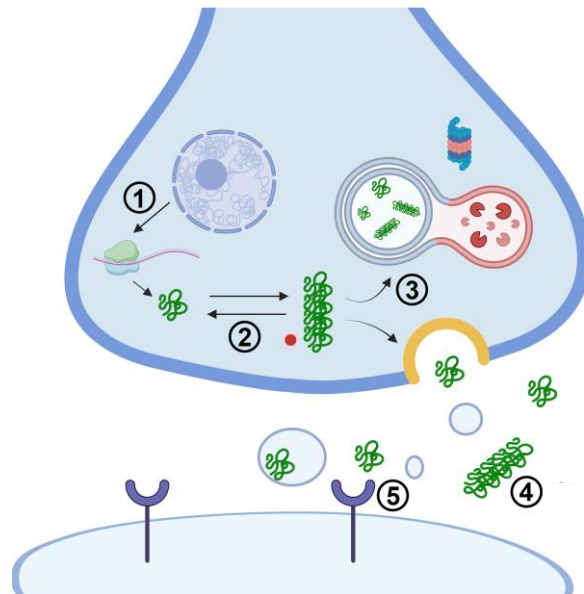


Figura 7. Formación y propagación de los agregados patológicos de α -syn. 1) Expresión de monómeros de α -syn. 2) Polimerización de α -syn monomérica o formación de oligómeros y fibrillas. 3) Inhibición de la degradación de las fibrillas de α -syn por el proteasoma o autofagia/lisosoma. 4) Liberación de fibrillas de α -syn al espacio extracelular. 5) Interacción de las fibrillas de alfa-sinucleína con un receptor membranal aún no identificado que favorece la internalización de los agregados de la proteína y la propagación de la patología (tomado de Wu *et al.*, 2023).

1.4 Homeostasis de calcio intracelular en la fisiopatología molecular de la enfermedad de Parkinson (EP)

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente, después de la enfermedad de Alzheimer (EA). Se caracteriza principalmente por la pérdida o muerte de las neuronas dopaminérgicas de la *sustantia nigra pars compacta*

(SNpc), y la pérdida concomitante de la inervación dopaminérgica estriatal, lo que desencadena en los síntomas motores clásicos: bradicinesia, rigidez, acinesia, postura anormal y temblor en reposo que es el trastorno del movimiento más prevalente. Se sabe que la edad es el principal factor de riesgo, ya que afecta al 1% de las personas mayores de 60 años y puede llegar del 2-4% en las mayores de 80 años. Mientras progresa la enfermedad, en las últimas etapas, se presenta también disfunción sensoriomotora, deterioro cognitivo y trastornos del sueño (Lees *et al.*, 2009; Hurley *et al.*, 2013; Caulfield *et al.*, 2023).

En las neuronas dopaminérgicas vulnerables en la EP, se puede observar la aparición de agregados filamentosos de proteínas de diferente naturaleza, que son conocidos como cuerpos y neuritas de Lewy. Los cuerpos de Lewy están conformados principalmente por agregados de α -syn patológica (Martínez, 2016; Bachiller *et al.*, 2018). Estas alteraciones presentes en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, a su vez pueden desencadenar modificaciones en el cuerpo estriado, donde se encuentran las neuronas espinosas medianas (NSM). Las NSM constituyen ~95-98% de las neuronas en el estriado. Su definición anatómica está asociado a la presencia de un árbol dendrítico extenso, densamente poblado de protuberancias espinosas llamadas “espinas dendríticas”. Estas espinas son los objetivos específicos de la información transmitida por el glutamato cortical y la DA. En las espinas dendríticas se expresan receptores a DA (D1/D2), así como canales de calcio Cav1.3, los cuales son regulados por D1/D2 (Caulfield *et al.*, 2023) (Fig. 8).

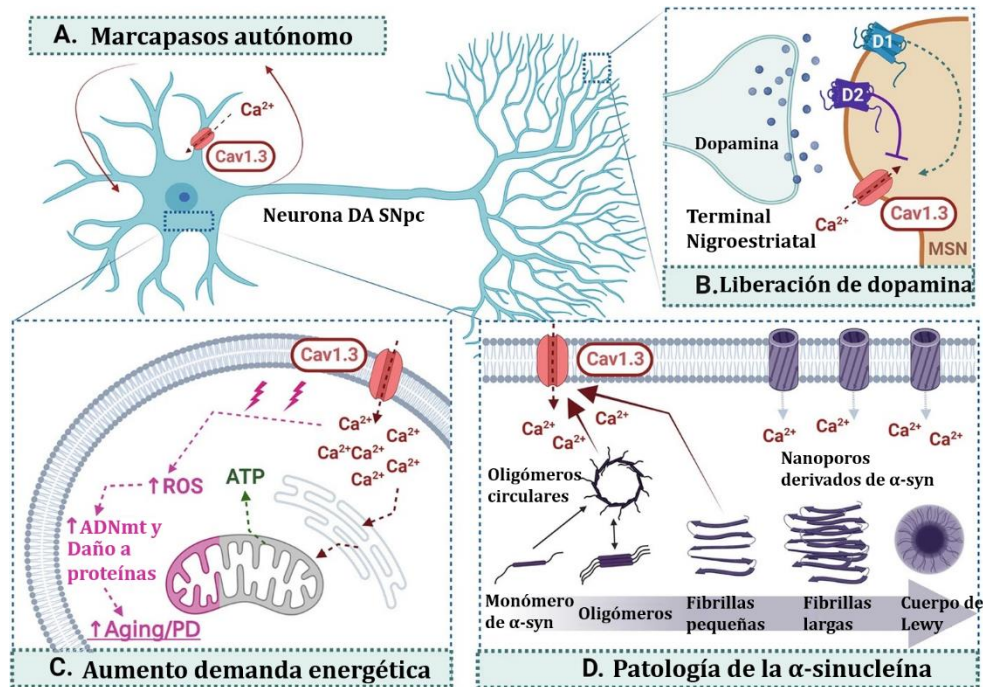


Figura 8. Posible contribución de las alteraciones en la homeostasis del calcio intracelular a una mayor vulnerabilidad de las neuronas DA en el envejecimiento y la EP. a, b) Las neuronas de la SNpc tienen actividad marcapasos autónoma que da como resultado la liberación tónica de DA en el estriado. c) Existe una gran demanda energética en estas neuronas autónomamente activas para extruir iones de calcio mediante procesos dependientes de trifosfato de adenosina (ATP) mediados por la fosforilación oxidativa mitocondrial que da como resultado la generación de superóxido y especies reactivas de oxígeno (ROS). Los estímulos nocivos ambientales pueden aumentar aún más la generación de estrés oxidativo mitocondrial, lo que hace que estas neuronas sean vulnerables a la neurodegeneración en el envejecimiento y la EP. d) El calcio citosólico elevado en la SNpc induce la oligomerización y agregación de α -syn y, a su vez, el α -syn a través de la regulación que ejerce sobre algunas vías de entrada de calcio promueve la desregulación de la homeostasis del ion. Además, se ha planteado que la patogenia de la EP podría implicar la permeabilización de la membrana por formas protofibrilares de α -syn que forman estructuras similares a poros denominadas nanoporos de α -syn que promueven la elevación del calcio intracelular (tomado de Caulfield *et al.*, 2023).

Cuando se da la degeneración en la EP y hay una pérdida del tono dopaminérgico, también se pierde la regulación que los receptores dopaminérgicos ejercen sobre los canales Cav1.3

y se desencadena una alteración en la homeostasis de calcio, lo que a la larga resulta en la degeneración de las espinas dendríticas. Así, el aumento transitorio de la concentración de Ca^{2+} intracelular que ocurre de manera normal en las neuronas del estriado y la SNpc, en respuesta a la actividad de los canales Cav , puede conducir a neurodegeneración cuando se asocia a algunos mecanismos complejos como la activación de enzimas apoptóticas dependientes de Ca^{2+} en células con baja capacidad de amortiguamiento del ion. Para evitarlo, las neuronas activan, a su vez, otros mecanismos dependientes de ATP mediados por la fosforilación oxidativa mitocondrial, en donde el resultado es la generación de superóxido y especies reactivas de oxígeno (ROS). Cuando las células no pueden regular el aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , por la demanda metabólica excesivamente alta, se puede generar estrés oxidativo mitocondrial que desencadena la neurodegeneración, por ejemplo, asociada con el envejecimiento y la EP. El aumento en la concentración de ROS eventualmente también puede terminar afectando la proteostasis (Caulfield *et al.*, 2023) (Fig. 8).

Por último, se sabe que, en la EP el Ca^{2+} intracelular elevado induce la oligomerización y agregación de α -syn. Se cree, además, que esto podría estar regulando la actividad de los canales $\text{Cav}1.3$ por la α -syn, ya sea en estado monomérico o de fibrillas pequeñas y, también, que las formas patológicas de α -syn pueden generar nanoestructuras similares a poros no selectivos en la membrana celular, los que podrían ser permeables a calcio y que estarían promoviendo la desregulación de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, lo que a su vez resultaría en un círculo vicioso que favorecería el progreso de la enfermedad (Caulfield *et al.*, 2023) (Fig. 8).

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Trabajos previos han indicado la presencia de un mecanismo dependiente de calcio para la secreción de α -syn, tanto en neuronas en cultivo, como en el contexto de una red en el cerebro de ratón, que es mediada por canales de calcio presinápticos (Emmanouilidou *et al.*, 2016). Es así, que la entrada de calcio puede desencadenar la agregación de α -syn, lo que proporciona una vía para la neurodegeneración en la EP. También existe evidencia de que los canales Cav pueden facilitar la secreción de α -syn en condiciones normales o patológicas, aunque el mecanismo de este proceso aún es difícil de explicar. La función anormal de canales Cav puede provocar la acumulación local de α -syn en el espacio extracelular que podría ser absorbida por las neuronas vecinas, promoviendo así la propagación de la patología de la enfermedad de célula a célula. También es posible que las diferentes especies de α -syn (monómeros, oligómeros y fibrillas) tengan la capacidad de actuar a través de mecanismos moleculares independientes de la movilización de calcio intracelular, sin embargo, el papel que podrían jugar los canales Cav en este proceso aún está por dilucidarse.

Debido a la importancia de la homeostasis del calcio en la supervivencia neuronal, y la evidencia de que la interrupción de los procesos que subyacen dicha homeostasis son los principales factores que contribuyen a las enfermedades neurodegenerativas, se han examinado los efectos de la α -syn sobre la señalización por calcio en general, y de los canales Cav en particular, en líneas celulares de origen neuronal, usando α -syn silvestre y formas mutantes de la proteína sobre todo en un afán de entender con mayor detalle la fisiopatología de la EP. Es así, que Hettiarachchi *et al.* (2009) reportaron que la entrada de calcio dependiente de voltaje aumenta en células que expresan la forma silvestre de α -syn

debido, al menos en parte, al aumento en la actividad de los canales Cav de tipo L (Cav1). Sin embargo, en este estudio no se mostraron datos directos de la regulación de los canales Cav y tampoco queda claro cuál de los subtipos de canales L es el que está siendo regulado por la α -syn.

3 JUSTIFICACIÓN

Los canales Cav constituyen uno de los más importantes reguladores de la entrada de calcio a las células y por lo tanto de la señalización dependiente de este ion, y están sujetos a múltiples interacciones moleculares que resultan en una regulación muy fina de su actividad. En la actualidad se han descrito una gran variedad de estas interacciones y su repercusión funcional recién empieza a evidenciarse. Asimismo, en la búsqueda de los mecanismos moleculares de progresión de la enfermedad en la EP, trabajos previos se ha centrado en la conexión entre la secreción de α -syn, la neurodegeneración y las alteraciones en la entrada de calcio, principalmente a través de los canales Cav.

Cabe señalar que en la EP la degeneración se produce preferentemente en las neuronas dopaminérgicas de la *sustantia nigra pars compacta* (SNpc), mientras que las neuronas dopaminérgicas que residen en el área tegmental ventral (VTA) en su mayoría no se ven afectadas. Se ha propuesto que las diferencias en la regulación de la homeostasis de calcio en estas dos poblaciones neuronales podrían contribuir a la aparición y progresión de la neurodegeneración en la EP. En particular, las neuronas de la SNpc adultas dependen principalmente de canales Cav de tipo L para su actividad basal y, más específicamente, del subtipo Cav1.3 (Mercuri *et al.*, 1994). Las neuronas dopaminérgicas de la SNpc también

expresan proteínas de unión a calcio a un nivel más bajo en comparación con las neuronas dopaminérgicas VTA (Foehring *et al.*, 2009). Estas diferencias parecen estar coordinadas de tal manera que durante el desarrollo los canales Cav1.3 se convierten en los principales canales dependientes de voltaje en las neuronas de la SNpc y responsables de su actividad marcapaso (Chan *et al.*, 2007; Sandoval *et al.*, 2022).

El uso de nimodipina, un bloqueador de canales L en neuronas en cultivo tratadas con L-DOPA disminuye los niveles de DA citosólica, lo que sugiere un papel de los canales de tipo L en el metabolismo de la DA y la supervivencia neuronal (Mosharov *et al.*, 2009). Además, se ha visto que los canales L son responsables de la elevación del calcio intracelular en las neuronas dopaminérgicas expuestas a MPP⁺ (un modelo de la EP). Tal aumento no se observa en cultivos de neuronas *knockout* para α -syn, lo que sugiere que α -syn está implicada en los cambios de calcio intracelular en condiciones de estrés (Lieberman *et al.*, 2017). De manera interesante, el aumento del calcio intracelular en las neuronas de la SNpc que sobre-expresan α -syn conduce a una mayor oxidación mitocondrial y neurotoxicidad, pero no en las neuronas VTA, probablemente debido a que las neuronas VTA no dependen de los canales Cav1.3 para su activación (Lieberman *et al.* 2017). Un estudio reciente describió la importancia del equilibrio entre la α -syn y el calcio intracelular. La unión a calcio por la α -syn media la localización de la proteína en las vesículas sinápticas y, en condiciones de aumento de calcio o α -syn, esta localización promueve la agrupación de vesículas sinápticas y la agregación de α -syn. El tratamiento con un bloqueador de canales L, isradipina, previene la agregación de α -syn y disminuye la muerte neuronal (Lautenschläger *et al.*, 2018).

Los resultados que se obtengan durante el estudio de la regulación de los canales Cav1.3 por α -syn, mostrarán indicios de una probable relación, hasta ahora desconocida, relevante para la fisiología de las neuronas ya que ambas moléculas han sido implicadas en la fisiopatología de la EP, lo que puede propiciar un importante campo de estudio. El funcionamiento anormal de los canales Cav en general, y de los del tipo Cav1.3 en particular, puede provocar la formación de agregados de α -syn, así como una liberación excesiva de la proteína al espacio extracelular. En este contexto, la α -syn podría regular a la baja la actividad de los canales Cav controlando la formación de agregados y la liberación de α -syn, conformando un sistema de retroalimentación que prevendría el establecimiento de la EP. Esta novedosa vía molecular de regulación de los canales Cav en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc podría además constituir un novedoso enfoque terapéutico alternativo para la EP. Además, estos resultados servirán para definir o acrecentar el conocimiento de los procesos básicos en la fisiología celular de los canales Cav, como son los mecanismos del tráfico celular y la expresión membranar de los canales iónicos.

4 HIPÓTESIS

La proteína α -syn interactúa y regula la actividad de los canales de calcio de tipo L (Cav1.3) responsables de diversos eventos fisiológicos en las células nerviosas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Investigar si la proteína α -syn puede interactuar funcionalmente con los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L (Cav1.3), usando un abordaje experimental que combina técnicas bioquímicas y de biología molecular con el registro electrofisiológico.

5.2 Objetivos específicos

1. Determinar la interacción molecular entre α -syn y los canales Cav1.3, empleando un sistema de expresión heterólogo (células HEK-293).
2. Determinar si la interacción de α -syn con el complejo de los canales Cav1.3 ocurre a través de la subunidad principal conductora de los iones, o si se lleva a cabo a través de otra(s) proteína(s).
3. Determinar si la interacción de α -syn con el complejo de los canales Cav1.3 causa alteraciones en la función y/o en el tránsito de los canales hacia la membrana celular.

6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos descritos en este trabajo, se siguió la estrategia experimental que se describe a continuación. En primer lugar, se realizó la clonación de la proteína α -syn en vectores de expresión en mamíferos, para emplearlos en la transfección en un sistema heterólogo. Una vez obtenidas las construcciones deseadas, se realizaron transfecciones transitorias en células HEK-293 y se analizó, por la técnica de *Western blot*, la expresión de la α -syn y el canal Cav1.3. Posteriormente, se llevaron a cabo los análisis de inmunoprecipitación recíproca y ensayos de ligadura de proximidad (PLA), co-transfectando ambas construcciones en esta línea celular. En estos últimos, la interacción entre las proteínas se evidenció por medio de microscopía confocal. Finalmente, la repercusión funcional de la interacción entre las proteínas de interés se estudió mediante ensayos de electrofisiología empleando la técnica de *patch-clamp* en su modalidad de célula completa.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Cultivos celulares

Como modelo experimental se emplearon cultivos de la línea celular HEK-293 (ATCC; # Cat. CRL-1573). Ésta es una línea celular que deriva de células embrionarias de riñón, y se escogió debido a que no expresa de manera endógena tanto a los canales Cav1.3 como a la α -syn. Las células se dispersaron y se mantuvieron en cultivo en cajas Petri de 35 mm y/o en cajas Petri de 100 mm de diámetro en donde se dejaron en condiciones estándar de cultivo en medio DMEM suplementado con 25 mM de glucosa (DMEM-HG), 5% de suero fetal bovino, 1 mL de antibiótico (penicilina, estreptomycin), L-glutamina y 1 mL de piruvato de sodio. Las células permanecieron a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 80% de humedad relativa.

7.2 Clonas de ADNc y transfección transitoria

7.2.1 Análisis bioinformático

Para desarrollar el trabajo, se partió del plásmido pT7-7 generosamente donado por la Dra. Liliana Quintanar (Depto. de Química, Cinvestav), que es un vector de expresión en bacterias (Fig. 9; Hoyer *et al.*, 2004). Por lo tanto, para poder realizar la transfección transitoria en los cultivos de células HEK-293 resultó necesario extraer el fragmento correspondiente a la secuencia de ADN que codifica para la proteína α -syn con ayuda de *primers* específicos (Tabla 2). Una vez obtenida la clona de la proteína α -syn, se diseñó un plásmido de expresión en mamíferos empleando el vector pEGFP-C1 (Addgene; Plasmid #46956), agregando los sitios de corte de las enzimas *XhoI* y *PstI*. Este vector tiene la

ventaja que, dentro de sus características principales, contiene la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés).

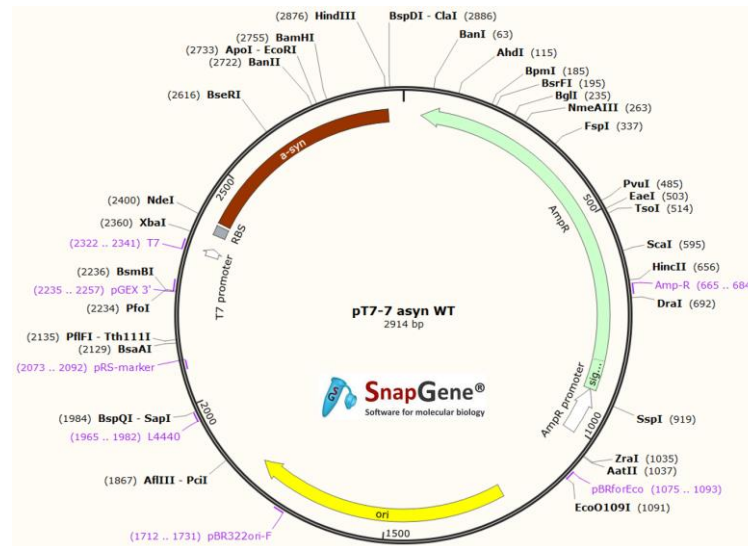


Figura 9. Mapa del plásmido de expresión en bacterias pT7-7 que codifica para α -syn. En rojo se indica la localización de la secuencia de la proteína α -syn; en verde se indica la localización y dirección del gen Amp^r (que confiere la resistencia al antibiótico ampicilina) y en amarillo se indica el origen de replicación en *E. coli*. En blanco se muestra el promotor T7 (promotor de RNA polimerasa del bacteriófago T7). Imagen obtenida con el programa SnapGene (<https://www.snapgene.com/>).

Los análisis *in silico* de la clonación de α -syn en este vector de expresión se realizaron empleando las bases de datos y herramientas bioinformáticas de acceso libre en internet. Utilizando el programa *Align Sequences Nucleotide* BLAST® del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) disponible en la dirección electrónica <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, se corroboró la subclonación de la secuencia de la región codificante de la proteína α -syn. Una vez realizada la clonación, se procedió a corroborar su idoneidad para uso posterior mediante una clonación *in silico* en el vector pEGFP-C1 (Fig. 10).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de α -syn (*Homo sapiens*) por PCR.

Nombre	Secuencia
A-syn.HS.For	5'-CTCGAGTATGGATGTATTCATGAAAG-3'
A-syn.HS.Rev	5'-CTCGAGTTCATAAGCCTCATTGTCAG-3'
A-syn.HS.2.For	5'-CTCGAGTTATGGATGTATTCATGAAAGG-3'
A-syn.HS.2.Rev	5'-CTGCAGTTAGGCTTCAGGTTTCGTAGT-3'

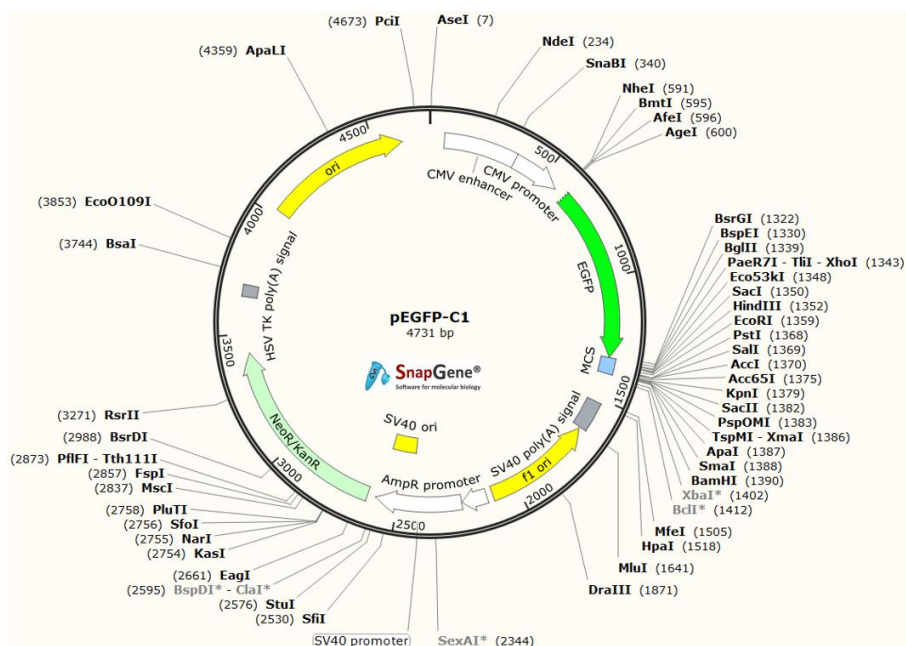


Figura 10. Mapa del vector de expresión en mamíferos pEGFP-C1. En verde se indica la localización y sentido de la secuencia de la proteína GFP, seguido de un sitio múltiple de clonación (MCS). En amarillo se muestran las secuencias de origen de replicación, ORI (sitio de origen de replicación) y F1 ORI (sitio de replicación de bacteriófago f1). En azul se indica el gen Neor/KanR que confiere la resistencia a los antibióticos kanamicina, neomicina y geneticina (G418). En blanco se muestran los promotores de AmpR, SV40 y CMV (citomegalovirus humano), respectivamente. Imagen obtenida del programa SnapGene.

7.2.2 Construcción y análisis de los plásmidos

Tomando en consideración la información obtenida del análisis de la región codificante en las bases de datos, a continuación, se procedió a liberar el fragmento de α -syn del plásmido pT7-7, con la ayuda de las enzimas *NdeI* y *HindIII*. El producto de la reacción de restricción se visualizó en un gel de agarosa. El análisis de la banda generada tenía un tamaño de 476 pb, lo cual corresponde al tamaño de la secuencia de α -syn.

Por otro lado, para asegurar la clonación exitosa de la secuencia de la α -syn en el vector de mamífero, en paralelo se utilizó una segunda estrategia experimental en la que se emplearon oligonucleótidos específicos para la amplificación de la secuencia de interés en ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ensayos se realizaron bajo las siguientes condiciones: 5 μ L de *buffer* de reacción (10X), 2 μ L de ADN molde [425.24 ng/ μ L], 2.5 μ L del oligonucleótido sentido [10 μ M], 2.5 μ L del oligonucleótido antisentido [10 μ M], 1 μ L de la mezcla de dNTPs y 3 μ L de MgCl₂ [25 mM]. Asimismo, se usaron 1 μ L de ADN polimerasa (Agilent; Herculase II Fusion DNA Polymerase, Cat. #600675) [2.5 U/ μ L] y 34.5 μ L de ddH₂O para obtener un volumen final de 50 μ L. La amplificación se llevó a cabo empleando un termociclador de PCR (Thermo Scientific) con un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 3 min. El alineamiento de nucleótidos se realizó en 35 ciclos con variaciones de temperatura de la siguiente manera, 94 °C durante 45 s, 57.5 °C por 30 s, 72 °C por 4 min y 30 s, y un ciclo a 72 °C durante 10 min.

Con la finalidad de facilitar la clonación de este fragmento amplificado de α -syn en el vector pEGFP-C1, se utilizó el Kit de clonación TOPO TA (Invitrogen) que contiene el vector transitorio pCR2.1-TOPO (Fig. 11) mediante el siguiente protocolo. A 4 μ L del producto de

PCR se añadió 1 μ L de solución salina, así como 1 μ L del vector TOPO, para obtener un volumen total de 6 μ L por cada reacción. Cada tubo de reacción se agitó suavemente y se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, se procedió con la transformación de bacterias competentes.

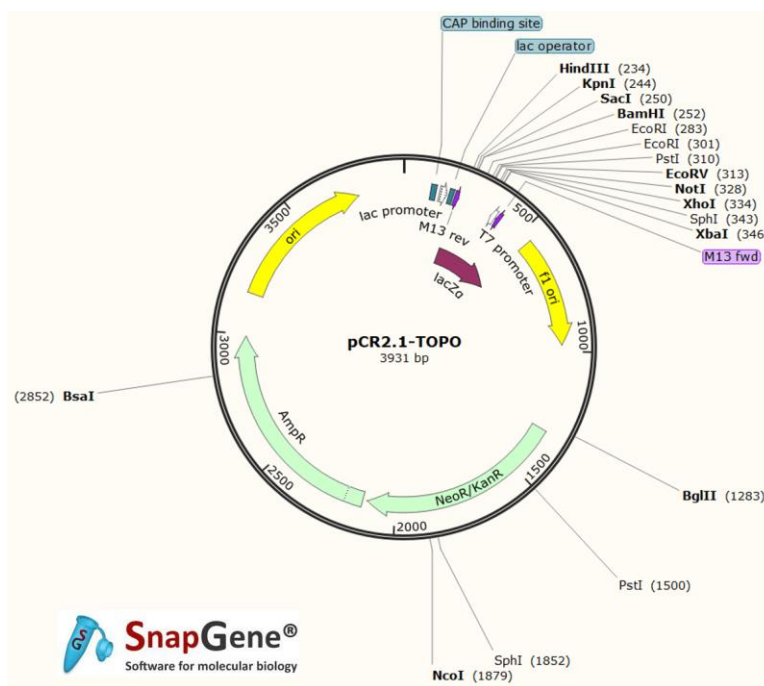


Figura 11. Mapa del vector transitorio pCR2.1-TOPO. En amarillo se muestran las secuencias de origen de replicación (ORI) y F1 ORI (sitio de replicación de bacteriófago f1). En azul se muestran las secuencias de los genes AmpR, NeoR/KanR que confieren resistencia a los antibióticos. El sitio de clonación múltiple del vector presenta sitios de corte para la endonucleasa *EcoRI* donde se insertó el fragmento de interés. En blanco se muestran los promotores lac (promotor del operon lac de *E. coli*) y T7 (promotor de RNA polimerasa del bacteriófago T7). Imagen obtenida con el programa SnapGene.

El protocolo de transformación de las bacterias con el vector transitorio TOPO se llevó a cabo como se indica a continuación. El volumen total de la reacción de clonación se colocó en un tubo con 200 μ L de bacterias *E. coli* competentes DH5 α y se incubó a 4 $^{\circ}$ C durante

30 min, con agitación cada 10 min. Después se incubó a 42 °C por 1 min y se volvió a incubar a 0 °C durante 2 min. Transcurrido los tiempos de incubación, se agregaron 800 µL de medio Luria Bertani (LB) y se incubó a 37 °C en agitación constante por 1 h. Finalmente, se tomaron 200 µL de las bacterias y se sembraron en cajas con LB agar suplementado con 100 µg/mL de kanamicina dejándose incubar a 37 °C durante 16 h. Las colonias que crecieron se resembraron en 3 mL de medio líquido LB con kanamicina y se incubaron a 37 °C en agitación constante durante 16 h.

La extracción del plásmido se realizó mediante el uso del paquete comercial *PureLink Quick Plasmid Miniprep Kits* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante. En primer lugar, las bacterias se empaquetaron por centrifugación a máxima velocidad por 1 min. Posteriormente se procedió a agregar 250 µL de *buffer* de resuspensión con ARNasa y se mezcló hasta obtener una solución homogénea. A continuación, se agregaron 250 µL de *buffer* de lisis. La suspensión se mezcló por inversión (5-6 veces), y se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 350 µL de *buffer* de precipitación y se mezcló nuevamente por inversión hasta que se obtuvo una solución homogénea. A continuación, se procedió a centrifugar a 12000 x *g* durante 10 min, y el sobrenadante que se obtuvo se transfirió a una columna en un tubo de recolección, procediéndose a centrifugar nuevamente a 12000 x *g* por 1 min. La solución del tubo se desechó y se agregaron 700 µL de *buffer* de lavado con etanol, se centrifugó nuevamente a 12000 x *g* por 1 minuto y se desechó el sobrenadante. De nueva cuenta se centrifugó el tubo a 12000 x *g* por 1 min y se desechó el sobrenadante. A continuación, la columna se transfirió en un tubo de recuperación de 1.5 mL, se agregaron 75 µL de *buffer* TE y se incubó a temperatura

ambiente por 1 min. Finalizado el tiempo de incubación, la columna y el tubo de recolección se sometieron a centrifugación a 12000 x *g* por 2 min para recuperar el plásmido de ADN purificado.

Ya obtenido el plásmido, se incubó durante 3 h con las enzimas *XhoI* y *SacI* y posteriormente se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Al liberarse un fragmento de ~520 pb, tamaño esperado de la secuencia, se confirmó la correcta clonación de la secuencia en el vector TOPO. A continuación, se incubó el vector pEGFP-C1 con las enzimas *XhoI* y *PstI* durante 3 h, así como también se incubó nuevamente el plásmido TOPO con la secuencia clonada de α -syn con estas enzimas, para posteriormente analizarlos en un gel de agarosa. Las bandas obtenidas tanto del vector pEGFP-C1 linearizado como de TOPO, se extrajeron y purificaron del gel con el paquete comercial *QIAquick® Gel Extraction Kit* (QIAGEN), según las recomendaciones del fabricante.

Al obtener los fragmentos, se realizó la reacción de ligación del vector pEGFP-C1 con la secuencia de α -syn usando 100 ng del vector y 36.8 ng del inserto, 1 μ L de ligasa T4 DNA Ligase (Roche), 2 μ L de *buffer* de la ligasa y se completó con la cantidad necesaria de agua para llevar a un volumen final de 20 μ L. Esta mezcla se incubó por 16 h a 16 °C y posteriormente, se transformaron de nueva cuenta bacterias *E. coli* DH5 α , para después extraer el plásmido, analizarlo con las enzimas *XhoI* y *PstI* y visualizar el producto en un gel de agarosa al 1%. La reacción liberó un fragmento correspondiente a 437 pb de α -syn, confirmando la correcta clonación de la secuencia de interés. La construcción se envió a secuenciación automática.

Por otro lado, para el trabajo con la clona del canal de tipo L Cav1.3, se utilizó una clona con la que ya se contaba en el laboratorio y que se encuentra en un vector de expresión en mamíferos llamado Cav1.3e [8a, 11, 31b, Δ32, 42a]. Para su análisis este plásmido se incubó con las enzimas *NheI* y *SacII* durante 3 h, y después los productos de la reacción se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.5%. La liberación de un fragmento de 5.7 Kb, tamaño esperado de la secuencia de interés, confirmó la presencia de la subunidad α_1 del canal Cav1.3 en el plásmido analizado.

7.2.3 Secuenciación automática

Para confirmar la correcta clonación del fragmento de α -syn en el vector pEGFP-C1, la construcción se analizó por medio de secuenciación automática. Para esto, se utilizó el paquete comercial *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), en donde, la construcción se extrajo de las bacterias *E. coli* DH5 α transformadas empleando el paquete comercial *PureLink Quick Plasmid Miniprep Kits* (Thermo Fisher Scientific) anteriormente descrito, y posteriormente, se amplificó utilizando 400 ng del plásmido, 1 μ L del oligonucleótido antisentido [10 μ M], 8 μ L de *BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix*, y el volumen necesario de agua para completar un total de 20 μ L. El programa del termociclador empleado fue el siguiente. Se inició con un ciclo de desnaturalización a 96 °C durante 1 min, el alineamiento de nucleótidos se realizó en 25 ciclos con variaciones de temperatura de la siguiente manera, 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s, 60 °C por 4 min.

Finalizado el tiempo de amplificación, los productos se precipitaron de acuerdo con el siguiente protocolo experimental. El volumen de la reacción se mezcló con 5 μ L de EDTA [125 mM] y 60 μ L de etanol (100%). El tubo se invirtió varias veces y se dejó incubando a

temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad por 5 min y se desechó el sobrenadante, para después agregar 60 μL de etanol (70%). A continuación, se centrifugó a máxima velocidad por 5 min y se desechó el sobrenadante. Se realizó una repetición agregando 60 μL de etanol (70%), centrifugando y retirando el sobrenadante. Para finalizar, el tubo se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 10 min para facilitar que se evaporara el solvente. La muestra se mandó secuenciar a la Red de Apoyo a la Investigación (RAI) en el laboratorio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Al obtener los resultados, se analizaron con el *software* Vector NTI Advance 11.5 (Thermo Fisher Scientific).

7.2.4 Transfección transitoria

Para la transfección transitoria, las células se sembraron en cajas Petri de 35 mm de diámetro, llevando el cultivo a una confluencia de 70-80%. Para la transfección se empleó el paquete comercial *Lipofectamine 2000 Reagent* (Invitrogen). Para cada ensayo de transfección, en un tubo *ependorf* de 1.5 mil se colocaron 100 μL de medio DMEM sin suplementos y se adicionó de 1 a 1.5 μg de cada plásmido, según fuese el caso. En otro tubo se colocaron 100 μL de medio DMEM sin suplementos y se agregó el volumen necesario del reactivo de transfección (*Lipofectamine 2000*) en una relación 1:3. Los tubos se dejaron a temperatura ambiente por 15 min, y transcurrido este tiempo se mezclaron y dejaron incubar por 20 min adicionales. Durante el tiempo que duró la incubación de los tubos, se prepararon las células HEK-293 retirando el medio de cultivo y lavando las células dos veces con 1 mL de PBS. Después de los lavados, se añadió 1 mL de medio de cultivo sin suplementos. Una vez terminada esta incubación, se colocaron ~ 200 μL de la suspensión en la caja de cultivo y se incubó durante 4 a 6 h a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO_2 y

80% de humedad relativa. Al finalizar el tiempo de incubación, se cambió el medio de cultivo sin suplementos por 2 mL de medio suplementado y las células se dejaron nuevamente en incubación. A las 24 h se realizó un segundo cambio empleando medio fresco suplementado y a las 48 h después de la transfección las células se emplearon en los ensayos correspondientes.

7.3 Inmunoelectrotransferencia (*Western blot*, WB)

Para realizar el análisis de la expresión de la proteína α -syn y del canal Cav1.3 se extrajeron las proteínas totales de las células HEK-293 no transfectadas y transfectadas con los plásmidos de interés. Primero, las células se lavaron con 1 mL de PBS frío, después se incubaron con *buffer* de lisis (150 a 200 μ L; SDLB 1X, PMSF 1 mM, Complete 1X) en hielo durante 30 min, con agitación en vórtex cada 10 min. Posteriormente, se centrifugaron a 12000 rpm a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante se recuperó y se depositó en un tubo nuevo y para obtener la concentración de proteínas, se cuantificó con el método de Bradford.

Los extractos proteicos del lisado total se analizó por *Western blot* en condiciones desnaturizantes, empleando de 25 a 30 μ g de proteínas que se mezclaron con *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) y se calentaron durante 5 min a 100 °C. A continuación, los extractos de proteínas se depositaron en un gel SDS-PAGE al 8-10% de poliacrilamida, para separarlas por electroforesis. Después, las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-N; GE Healthcare) utilizando un *buffer* de transferencia (48 mM Tris-base, 39 mM glicina, 20% metanol) a 120-150 mA en cámara

semiseca (TE70X Hoefer) por 2 h. Finalizado este tiempo, para confirmar que la transferencia se realizó correctamente, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau, observando diferentes bandas las cuales confirmaron la transferencia de las proteínas. Posteriormente, se realizaron lavados con *buffer* TBS-T 1X (10 mM Tris base pH 7.6, 0.15 M NaCl, 0.05% Tween 20) para seguir con el bloqueo de la membrana con leche al 5% en TBS-T 1X. El bloqueo se realizó en agitación constante a temperatura ambiente durante 1 h. Terminado el tiempo de incubación, la membrana se lavó de nueva cuenta con *buffer* TBS-T 1X y se dejó incubando a 4 °C toda la noche con los anticuerpos primarios conejo anti-Cav1.3 (1:5000; Alomone); anti-GFP (1:1000; Sigma; ó 1:1000; Santa Cruz Biotechnology); y conejo anti- β -actina (1:10000; GeneTex). El anticuerpo del canal Cav1.3 se disolvió en TBS-T 1X con leche al 5%, mientras que los demás se disolvieron en TBS-T 1X.). La Tabla 3 resume las características principales de los anticuerpos empleados en este trabajo.

Finalizada la incubación, se realizaron tres lavados con TBS-T 1X y las membranas se incubaron por 1 h con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (HRP), anti-conejo diluido en TBS-T 1X con leche al 5% (1:5000), y anti-cabra o anti-ratón diluidos en TBS-T 1X (1:5000). Al finalizar la segunda incubación, las membranas se lavaron con TBS-T 1X, para posteriormente realizar el revelado de las proteínas de interés utilizando el reactivo *Immobilon Western* (Millipore) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las señales emitidas de quimioluminiscencia se detectaron con la ayuda del equipo Odyssey (LI-COR Biosciences).

Tabla 3. Anticuerpos empleados.

Nombre	Proveedor	Número de catálogo	Especie	Tipo	Dilución
Primarios					
anti-Cav1.3	Alomone	ACC-005	conejo	policlonal	1:5000 / 1:50
anti-GFP	NOVUS BIOLOGICALS	NB600-308	conejo	policlonal	1:1000
anti-GFP	Santa Cruz Biotechnology	sc-5385	cabra	policlonal	1:1000
anti-β-actina	GeneTex	GTX629630	ratón	monoclonal	1:10000
anti-α-syn	Abcam	ab27766	ratón	monoclonal	1:50
anti-HA	Santa Cruz Biotechnology	sc-7392	ratón	monoclonal	-
Secundarios					
anti-conejo	Jackson ImmunoResearch	111-035-003	cabra	monoclonal	1:5000
anti-cabra	Jackson ImmunoResearch	705-035-003	burro	policlonal	1:5000
anti-ratón	Jackson ImmunoResearch	115-035-003	cabra	policlonal	1:5000

7.4 Ensayos de interacción proteína-proteína

El análisis de la interacción entre la proteína α -syn y el canal Cav1.3 se realizó por medio de dos ensayos diferentes; el primero, consistió en la inmunoprecipitación de los extractos proteicos y el segundo, en ensayo de ligación por proximidad (PLA) como se describe a continuación.

7.4.1 Inmunoprecipitación (IP)

El protocolo de IP se realizó de la siguiente manera. En primer lugar, se transfectaron transitoriamente las células HEK-293 con los plásmidos de interés y a continuación se obtuvieron los extractos proteicos correspondientes. Una vez obtenido el lisado de las células, se procedió a pre-equilibrar la proteína G Agarosa (PGA), usando 20 μ L de la resina

por cada ensayo de IP, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 500 µL de *buffer* de lisis (TrisHCl pH 8.0 50 mM; NaCl 150 mM; Tritón X-100 1%; EDTA 10 mM; PMSF 0.5 mM; Complete 2X), se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. Se agregaron 500 µL de *buffer* de lisis conteniendo 1% de BSA y se dejó incubando por 4 h a 4 °C en agitación constante. Después del tiempo de incubación, se centrifugó la PGA a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, se añadieron 50 µL de *buffer* de lisis sin BSA a la resina.

El segundo lugar, los extractos proteicos se pre-clarificaron utilizando 0.5-1.5 mg de proteínas totales para cada ensayo de IP en una mezcla con 30 µL de PGA pre-equilibrada y 500 µL de *buffer* de lisis sin BSA. Los tubos se incubaron a 4 °C durante 2 h en agitación constante. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm a 4 °C por 5 min, y los sobrenadantes se recuperaron y se desecharon las pastillas de PGA. En tercer lugar, para el ensayo de IP, se utilizaron 2.5 µg de cada anticuerpo por ensayo. Para el control negativo se empleó un anticuerpo no relacionado (Tabla 3). La mezcla se preparó con ~470 µL de extractos proteicos pre-clarificados, 20 µL de PGA pre-equilibrada y 2.5 µg de los anticuerpos contra la proteína de interés. La incubación de esta mezcla se dejó toda la noche a 4 °C en agitación constante. Finalizada la incubación, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm a 4 °C durante 5 min y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se realizaron tres lavados a la pastilla obtenida con 1 mL de *buffer* de lavado (TrisHCl pH 8.0 50 mM; NaCl 500 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 1%; SDS 0.1%; PMSF 0.5 mM) incubando en agitación constante por 10 min a 4 °C. Entre cada lavado, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C y se eliminó el sobrenadante.

Una vez finalizados los lavados mencionados, a continuación, se procedió a lavar nuevamente dos veces con 500 μ L de PBS por 10 min a 4 °C en agitación constante, y a centrifugar a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C, al término de lo cual se eliminó el sobrenadante. Por último, se añadieron 20 μ L de *buffer* de carga 1X a la pastilla y se incubó a 95 °C durante 5 min. Posterior a la desnaturalización, las muestras se centrifugaron y se realizó el análisis por *Western blot*.

Este protocolo se complementó, realizando los ensayos de IP con la ayuda del paquete comercial *Pierce Crosslink Immunoprecipitation Kit* (Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

7.4.2 Ensayos de proximidad de ligando (PLA)

Para evidenciar la posible interacción de la proteína α -syn con el canal Cav1.3, además, se utilizó la técnica de PLA. Esta metodología es capaz de detectar interacciones entre proteínas con una alta sensibilidad y especificidad. La técnica de PLA se basa en una amplificación de la fluorescencia de los productos de ligación de oligonucleótidos sintéticos que se encuentran unidos a anticuerpos secundarios de dos especies diferentes (por ejemplo, conejo y ratón), que reconocen a las proteínas de interés que se encuentren a una distancia menor a 40 nm. Para los ensayos PLA, se utilizaron células HEK-293 transfectadas, siguiendo el protocolo ya establecido para el paquete comercial *Doulink In situ* (Sigma Aldrich). El fundamento de la técnica se muestra de una manera resumida en la figura 12. Cabe mencionar que para estos ensayos se emplearon las siguientes concentraciones 1:50 de los anticuerpos primarios, anti-Cav1.3 (conejo; Alomone) y anti- α -syn (ratón; Abcam).

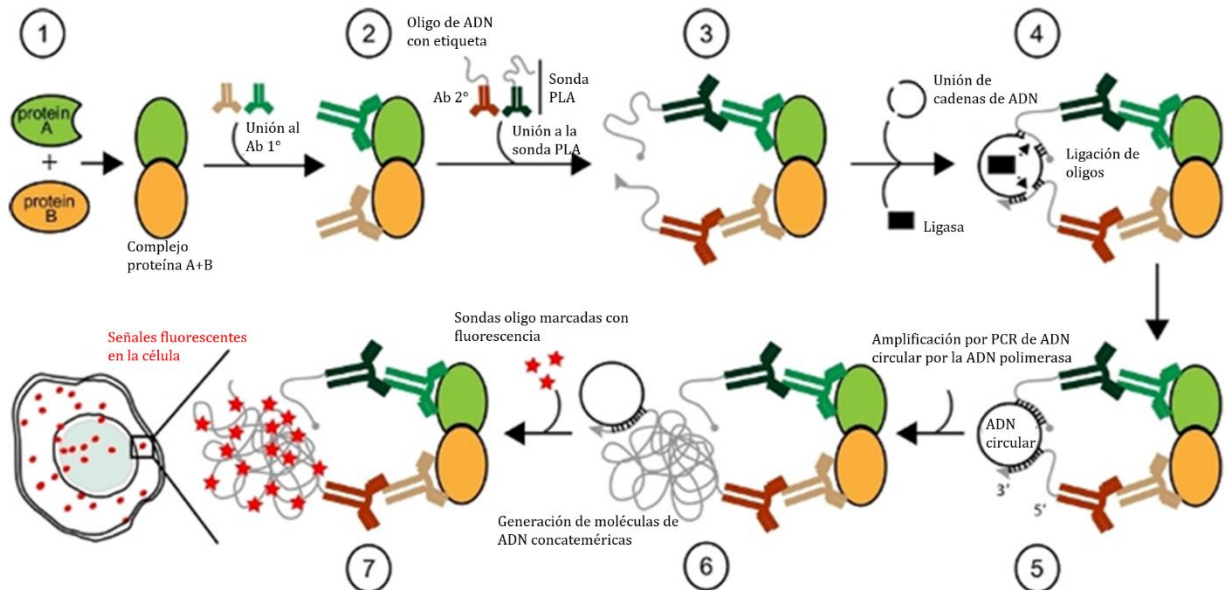


Figura 12. Protocolo de los ensayos PLA. Resumen paso a paso del protocolo experimental para mostrar las interacciones proteína-proteína usando la técnica de PLA. Si las proteínas se encuentran en una proximidad <math><40\text{ nm}</math> (1-3) se genera la hibridación de los oligonucleótidos conectores (4), los cuales, a su vez, forman un ADN circular que es amplificado (5-6), para posteriormente emplear sondas fluorescentes que ayuden a su detección por microscopía confocal (7) (tomado de Alberts *et al.*, 2019).

7.5 Electrofisiología

Las células HEK-293 se transfectaron de acuerdo con el siguiente protocolo. Veinticuatro h antes de la transfección, las células se sembraron en cajas Petri de 35 mm hasta alcanzar una confluencia alrededor del 60-70%. El día de la transfección, se prepararon las mezclas correspondientes con los reactivos necesarios para la transfección. Brevemente, en un tubo Eppendorf se agregaron 150 μL de medio de cultivo DMEM sin suplementos y los plásmidos correspondientes de acuerdo con lo descrito en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de transfección para las células sometidas a registro electrofisiológico.

Plásmido	Canal recombinante	
	Control	+ α-sinucleína
Cav1.3 (α_{1D})	3 μ L (1.2 μ g)	3 μ L (1.2 μ g)
Cavβ3	3 μ L (1.2 μ g)	3 μ L (1.2 μ g)
Cavα2δ-1	3 μ L (1.2 μ g)	3 μ L (1.2 μ g)
GFP	2.5 μ L (1.0 μ g)	-
α-sinucleína	-	3 μ L (1.2 μ g)
Turbofect	12 μ L	12 μ L

Los tubos se agitaron y se dejaron incubando 15-20 min a temperatura ambiente. Sin cambiar el medio de cultivo, se agregaron las mezclas de transfección y las cajas conteniendo las células se colocaron en el interior de una incubadora de CO₂. Transcurridas 24 h de cultivo, se procedió a cambiar el medio de cultivo por DMEM suplementado como se mencionó en la sección de Métodos y posteriormente, a las 48 h se realizaron los registros electrofisiológicos.

Las células transfectadas con los plásmidos que codifican para las proteínas del canal Cav1.3 y la α -syn/GFP, se estudiaron mediante la técnica de registro electrofisiológico en áreas restringidas de membrana (*patch-clamp*) en la modalidad de célula completa (Fig. 13). Solamente aquellas células que expresaban el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) se eligieron para este análisis funcional.

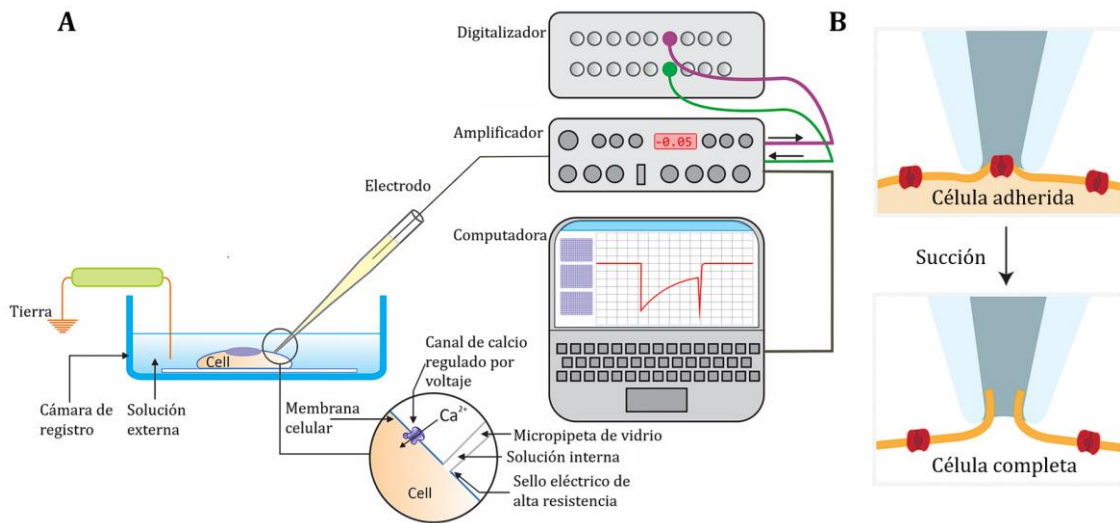


Figura 13. Arreglo experimental para realizar la técnica de *patch-clamp*. A) Las células sujetas a estudio se encuentran sumergidas en la solución externa de registro dentro de una cámara. Las corrientes iónicas en la célula de interés se registran a través de una micropipeta de vidrio que forma un sello de muy alta resistencia eléctrica (giga-sello) con la membrana plasmática. La micropipeta contiene una solución interna de registro que conecta el interior de la célula con la resistencia de retroalimentación y ésta a su vez con el amplificador a través de un electrodo de plata. El flujo de corriente medido durante un experimento de *patch-clamp* es de magnitud igual y opuesta a la corriente de la micropipeta. B) Existen diferentes configuraciones de la técnica convencional de *patch-clamp*. La empleada en los estudios presentados en este trabajo de tesis es la llamada configuración de célula completa, que consiste en que, una vez obtenido el giga-sello, se aplica una leve succión para destruir el parche de membrana contenido en boca de la pipeta de registro, y de esta manera se tiene acceso eléctrico a toda la célula (modificado de Gandini *et al.*, 2014).

Los cubreobjetos con las células de interés se colocaron en la cámara de registro electrofisiológico con 500 μL de solución externa, compuesta por (en mM): TEACl 130, BaCl₂ 10, HEPES 10 y glucosa 10; pH 7.3 y osmolaridad de ~ 300 mOsm/L. La pipeta de registro se llenó con la solución interna compuesta por (en mM): CsCl 125, MgCl₂ 5, HEPES

10, EGTA 10, ATP 4 y GTP 0.1; pH 7.3 y osmolaridad de ~290 mOsm/L. Para la adquisición de los datos se empleó un amplificador operacional Axopatch 200B (Molecular Devices) conectado a una tarjeta digitalizadora Digidata 1440 (Molecular Devices) controlado por una computadora. Los protocolos de pulsos, la captura de los datos y el análisis de los registros se realizaron empleando los programas de cómputo pCLAMP versión 10.7 (Molecular Devices) y Sigma Plot versión 12.5 (SPSS). Las corrientes de Ba²⁺ a través de los canales Cav se evocaron mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de 140 ms de duración a -30 mV a partir de un potencial de mantenimiento de -80 mV. Las corrientes de fuga y capacitativas residuales se restaron en línea con un protocolo P/4. Las señales de corriente se filtraron a 2 kHz y se digitalizaron a 5.7 kHz. La capacitancia de la membrana se calculó de acuerdo con lo reportado previamente (Ávila *et al.*, 2004) y se usaron para normalizar las corrientes. Para definir la dependencia al voltaje de las corrientes se empleó un protocolo que consiste en una serie de pulsos despolarizantes de 100 ms a partir del potencial de mantenimiento, desde -70 hasta +60 mV en incrementos de 5 mV. Para cada uno de los voltajes se determinó la corriente máxima y se construyeron curvas corriente-voltaje (I-V).

7.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se graficaron y analizaron en el programa Sigma Plot versión 12.5 (SPSS). En las gráficas se presenta la media \pm el error estándar de los datos obtenidos. Los datos graficados muestran el promedio \pm el error estándar de cada serie experimental. Las diferencias entre las medias de dos grupos experimentales se consideraron estadísticamente significativas sólo cuando el valor de *P* resultaba <0.05 empleando la prueba T de Student.

8 RESULTADOS

8.1 Obtención de la clona de ADNc para α -sinucleína

Inicialmente se empleó un plásmido que contenía la secuencia que codifica para la proteína α -sinucleína (donado por la Dra. Liliana Quintanar), llamado pT7-7 α -syn WT, clonada en un vector de expresión bacteriana. Por tal razón, se procedió a escindir la secuencia de interés para posteriormente clonarlo en el vector de expresión en mamíferos.

8.1.1 Análisis del plásmido pT7-7 α -syn WT y clonación en el vector TOPO

Para confirmar la presencia del fragmento correspondiente a α -syn, el fragmento de ADNc que codifica para la proteína se liberó del plásmido pT7-7 α -syn WT realizando una doble reacción de digestión empleando las enzimas de restricción *Hind*III y *Nde*I. Al término de la reacción y el subsecuente análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % se observó un producto de \sim 476 pb, que corresponde efectivamente al tamaño esperado de la secuencia de ADNc de interés (Fig. 14).

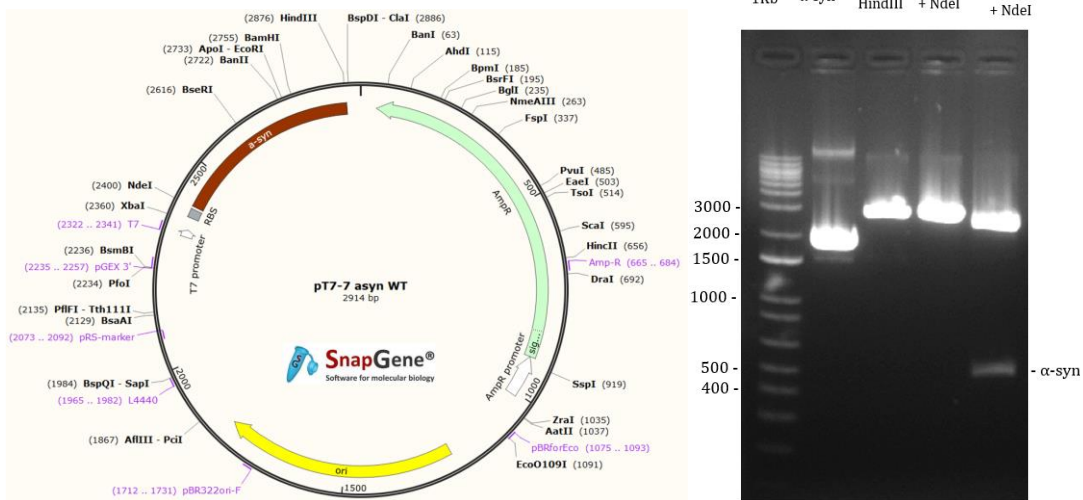


Figura 14. Análisis de restricción del plásmido pT7-7 α -syn WT (izquierda). Imagen del análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del fragmento obtenido empleando las endonucleasas de restricción *Hind*III y *Nde*I (derecha).

A continuación, se diseñaron los oligonucleótidos que serían empleados en la amplificación del fragmento de interés por el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tabla 2). El resultado de la amplificación del fragmento, empleando estos nuevos oligonucleótidos se muestra en la figura 15.

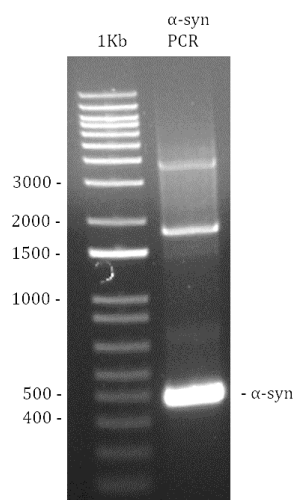


Figura 15. Análisis de la secuencia de α -syn amplificada por PCR. El resultado de la reacción se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2%, en donde se logra observar una banda correspondiente a \sim 476 pb con mayor intensidad, que corresponde al tamaño esperado de la secuencia de interés. Cabe hacer notar, que el análisis usando las endonucleasas de restricción arrojó la presencia de otras bandas inespecíficas con tamaños cercanos a los 2000 y 4000 pb.

Posteriormente, se procedió a realizar la clonación del fragmento amplificado de α -syn en el vector transitorio TOPO, en donde, después de realizar los análisis de restricción con las enzimas *Xho*I y *Sac*I, se logró liberar el fragmento esperado que correspondía a 476 pb

(Fig. 16). Este resultado se consideró inicialmente satisfactorio, por lo que se decidió continuar con la clonación de la secuencia obtenida en el vector de mamífero pEGFP-C1.

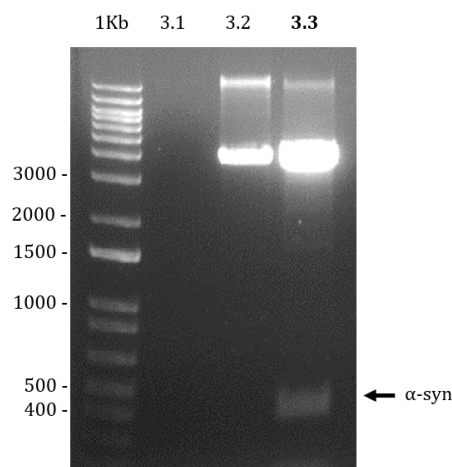


Figura 16. Análisis de restricción del vector transitorio TOPO conteniendo la secuencia que codifica para α -syn. Imagen representativa del análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Se analizaron las colonias de bacterias competentes transformadas con el plásmido y que crecieron en placa con medio LB + kanamicina, numeradas consecutivamente. La imagen muestra que se obtuvo la liberación de una secuencia del tamaño esperado (476 pb), en la tercera muestra (3.3).

8.1.2 Análisis *in silico* de la clonación

Con el fin de corroborar los datos de la clonación de la secuencia de α -syn en el vector TOPO, y antes de proceder a su clonación definitiva en el vector de expresión en células de mamífero, a continuación, se realizó una simulación *in silico* de clonación en el vector pEGFP-C1 usando los datos de la secuenciación automática del fragmento de \sim 476 pb, usando el programa SnapGene. El resultado de este análisis alertó sobre la posible presencia de diferentes codones de paro en distintos sitios una vez que la secuencia de interés fuera clonada en el vector de mamífero (Fig. 17), indicando que dicha secuencia se

encontraría fuera de fase. Este resultado, por lo tanto, reveló que, si se procedía a la clonación, entonces probablemente se obtendría una proteína truncada no funcional.

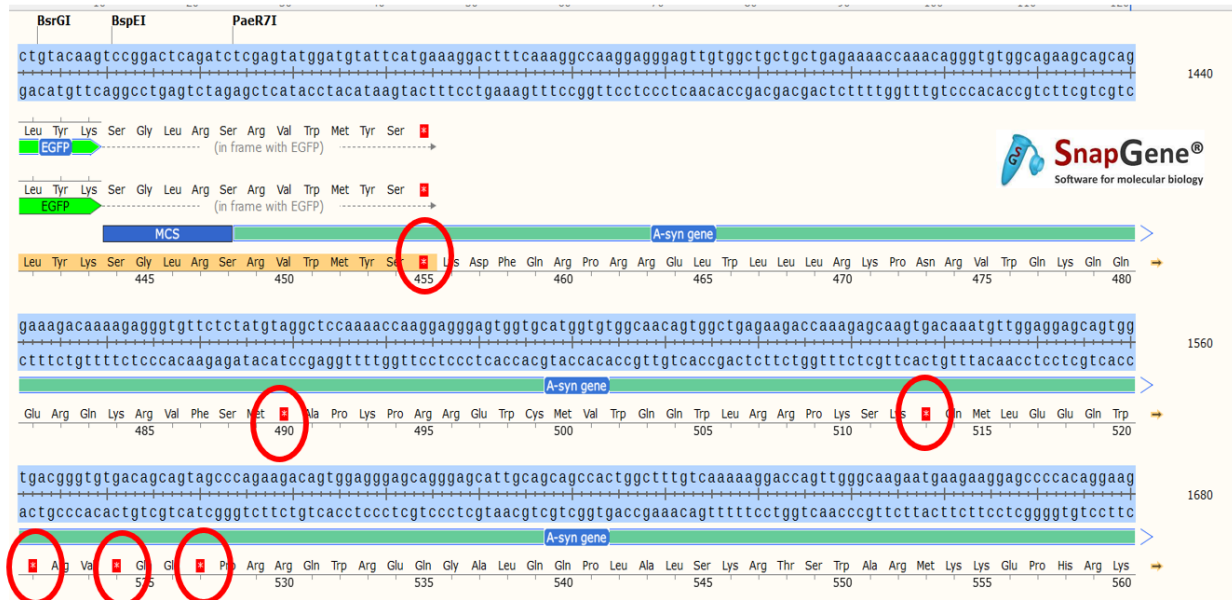


Figura 17. Análisis *in silico* de la secuencia de α -syn. El análisis del fragmento de 476 pb arrojó que dicha secuencia se encontraba fuera de fase al ser clonado en los sitios de corte de las enzimas *XhoI* y *PstI* en el vector de mamífero. El análisis mostró que el marco de lectura abierto se había modificado generando seis codones de paro (círculos rojos).

Estos hallazgos, nos urgieron entonces a realizar una búsqueda en las bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_000345.4) con la finalidad de encontrar y seleccionar la región codificante de la proteína, la cual resultó ser de 423 pb. Con base en esta información se diseñaron nuevos oligonucleótidos (Tabla 3), los cuales se emplearon en una segunda amplificación por PCR (Fig. 18).



Figura 18. Secuencia de α -syn obtenida del análisis bioinformático de la región codificante de la proteína en la base de datos del NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_000345.4). La imagen muestra además las secuencias de los oligonucleótidos empleados para la amplificación por PCR (enmarcadas), y se obtuvo con la ayuda del programa SnapGene.

Esta nueva secuencia de 423 pb se analizó de la misma manera descrita para el fragmento de 476 pb, y el resultado de la clonación *in silico* de este fragmento en el vector pEGFP-C1 esta vez resultó exitoso (Fig. 19). En este caso, el plásmido contenía la secuencia codificante de α -syn en fase, lo cual adelantaba la expresión de la proteína funcional.

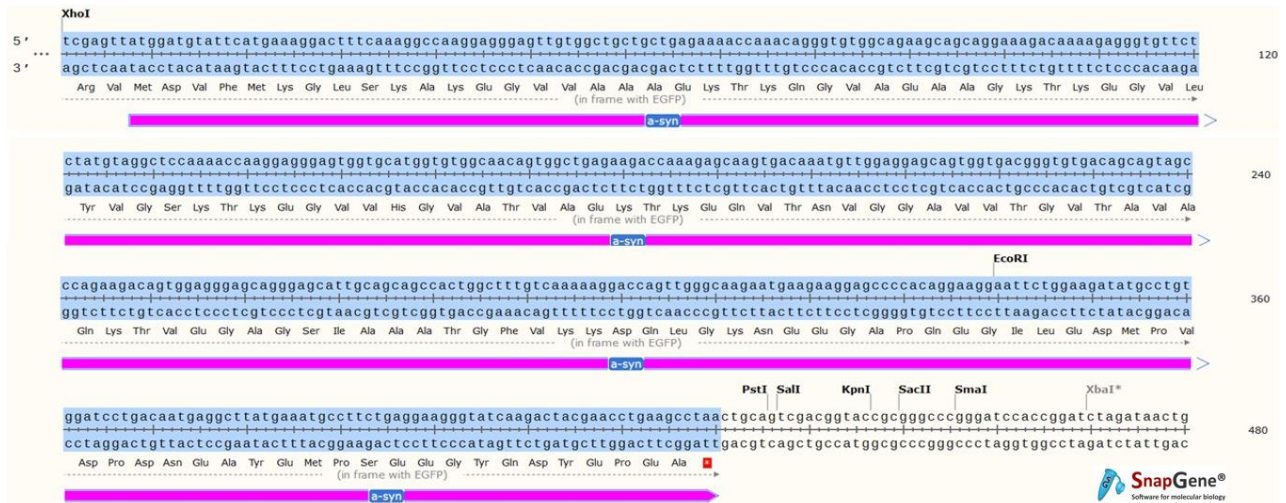


Figura 19. Secuencia de aminoácidos de la proteína α -syn. La imagen muestra la región de 437 pb correspondiente a la proteína α -syn (en rosa) clonada *in silico* en el plásmido pEGFP-C1 con su sitio correspondiente de término de la traducción (en rojo).

8.1.3 Clonación del ADNc para α -sinucleína por PCR y análisis del plásmido que codifica para Cav1.3

Una vez obtenida la secuencia teórica que codifica para α -syn en la base de datos de NCBI, se procedió a realizar la amplificación por PCR, empleando los nuevos oligonucleótidos diseñados (Tabla 3). El resultado de este análisis se muestra Fig. 20.

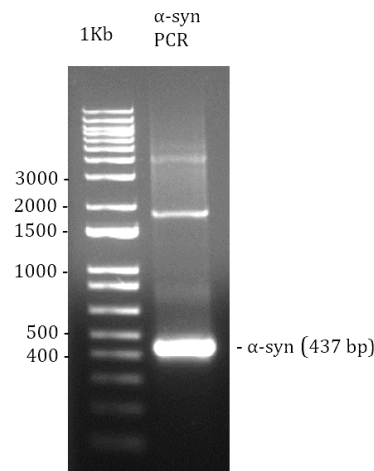


Figura 20. Imagen de electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del producto de la reacción de PCR para la amplificación de α -syn. Se muestra el análisis del producto de la reacción en donde se visualiza una banda correspondiente a ~ 437 pb, el tamaño esperado del fragmento amplificado.

A continuación, se realizó la clonación de este fragmento de α -syn amplificado por PCR en el vector transitorio TOPO. Para ello, primero se transformaron las células competentes, posteriormente se extrajo el ADN, y finalmente se analizó con las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*. La imagen en la figura 21, muestra el análisis de 4 extractos en los que se observa la liberación de un fragmento de ~ 437 pb, lo que confirma la clonación correcta de la secuencia de α -syn en el vector transitorio.

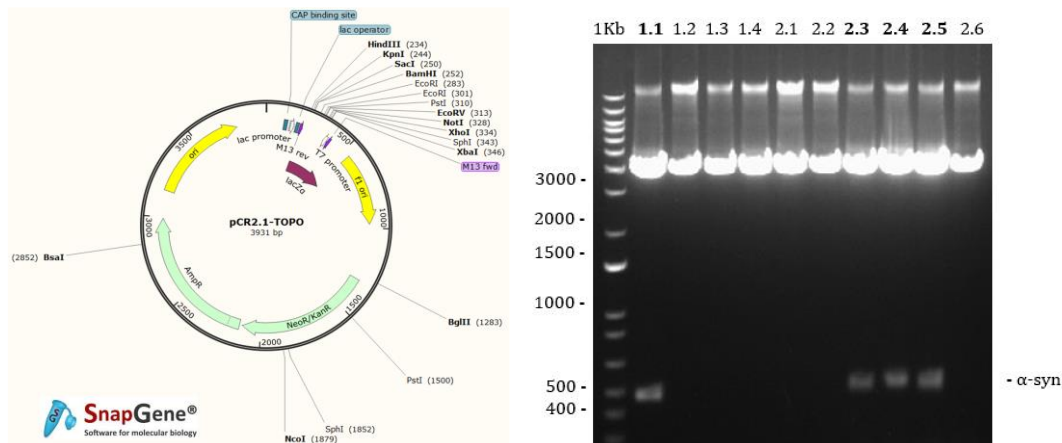


Figura 21. Análisis de restricción del vector pCR2.1-TOPO (panel izquierdo). El panel derecho muestra la imagen del análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del fragmento obtenido empleando las endonucleasas de restricción *XhoI* y *SacI*, en donde se observa la liberación de los fragmentos correspondientes de α -syn (~ 437 pb) en 4 de las muestras analizadas.

A continuación, la secuencia de α -syn se escindió del vector transitorio incubando con las enzimas de restricción *XhoI* y *PstI*. De igual manera el vector de expresión de mamífero pEGFP-C1 se incubó con dichas enzimas, para posteriormente emplearlos en la reacción de clonación con la enzima ligasa. Una vez finalizado el tiempo de la reacción de las endonucleasas, se extrajeron los plásmidos y con ellos se transformaron las células competentes. La presencia del fragmento correspondiente a 437 pb de la α -syn se confirmó también a través de un análisis de restricción, en los cuales se observó la liberación de una banda del tamaño esperado (Fig. 22). Al término de este análisis, la obtención el plásmido conteniendo la secuencia de α -syn se corroboró mediante secuenciación automática.

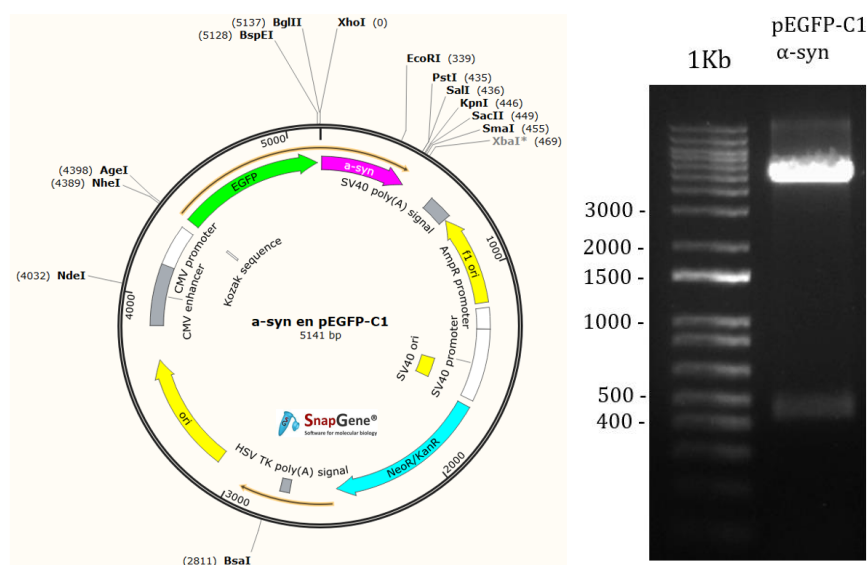


Figura 22. Análisis empleando endonucleasa de restricción del vector pEGFP-C1 conteniendo la secuencia de α -syn (panel izquierdo). El panel de la derecha muestra la imagen del análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% del fragmento obtenido empleando las enzimas *XhoI* y *PstI*. Se puede apreciar la expresión de un fragmento de \sim 437 pb que corresponde al tamaño esperado de la secuencia que codifica para α -syn.

A continuación, se realizó el análisis del plásmido que contiene la secuencia que codifica para el canal Cav1.3: Al igual que con los anteriores, con este fin se realizó una reacción de doble digestión del plásmido Cav1.3e [8a, 11, 31b, Δ32, 42a] con las enzimas de restricción *NheI* y *SacII*. Posteriormente, el producto de la reacción se analizó en un gel de agarosa al 0.5%, en donde se observó la liberación de un fragmento de ADNc del tamaño esperado para el canal Cav1.3 (Fig. 23).

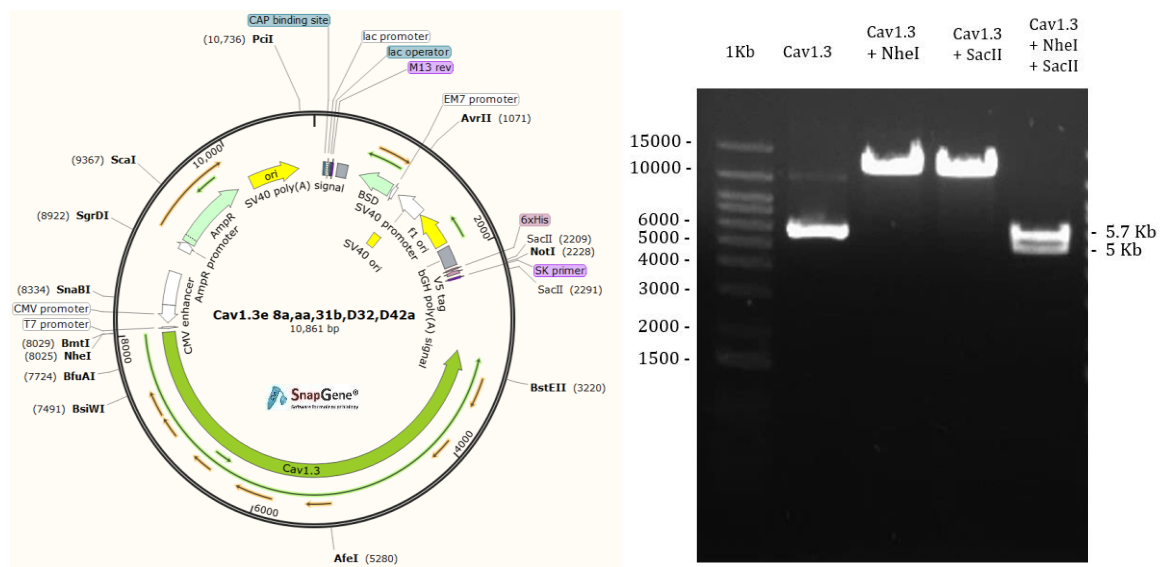


Figura 23. Análisis de restricción del plásmido Cav1.3e[8a, 11, 31b, Δ32, 42a] (panel izquierdo). El panel derecho muestra la imagen del análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0.5% del fragmento obtenido empleando las endonucleasas de restricción *NheI* y *SacII*. Se observan los fragmentos correspondientes al canal Cav1.3 (~5.7 kb) y al vector (~5 kb).

8.1.4 Secuenciación automática de la construcción de α -syn

Para el análisis de la secuenciación del plásmido con la α -syn, se utilizó el *primer* oligonucleótido antisentido (Tabla 3) y el resultado se examinó en el *software Vector NTI Advance 11.5*, con la herramienta AlignX. El alineamiento del fragmento clonado en el vector de expresión en mamíferos pEGFP-C1 con la secuencia de α -syn depositada en la base de datos del NCBI, confirma la identidad molecular de la secuencia de interés (Fig. 24).



Figura 24. Secuenciación y alineamiento la secuencia de α -syn clonada en el vector pEGFP-C1. La imagen muestra el alineamiento del fragmento con la secuencia de la región codificante de la α -syn con la reportada en la base de datos del NCBI. Estos datos confirman la compatibilidad entre ambas secuencias lo que confirma la identidad de la secuencia que codifica para la proteína α -syn.

8.2 Expresión de las proteínas en el sistema heterólogo e inmunoprecipitación

Una vez obtenida la construcción de α -syn en el vector de mamífero, que también codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), a continuación, se procedió a su transfección en las células HEK-293 y posteriormente se hicieron ensayos de inmunoelectrotransferencia para corroborar su expresión en el sistema heterólogo. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se lisaron y los extractos proteicos se analizaron mediante la técnica de *Western blot* (WB). Los resultados de este análisis se muestran en la figura 25. El uso de anticuerpos específicos (Tabla 3) permitió la detección de las proteínas de interés en los extractos proteicos de las células transfectadas. La figura 25A muestra los resultados de la detección de α -syn, que en este caso se manifestó como una banda de ~ 40 kDa. Cabe mencionar que el peso molecular de la proteína es de ~ 14.5 kDa, por lo que la banda encontrada está ~ 25 kDa por arriba del peso esperado. Al respecto, cabe mencionar que esto muy probablemente se debe a la presencia de la proteína GFP fusionada a la α -syn. Por otro lado, el uso de anticuerpos contra Cav1.3 resultó en la detección de una banda de ~ 150 kDa, el tamaño esperado para la subunidad Cav α_1 del canal (Fig. 25B). Estos hallazgos confirman la correcta expresión de las dos proteínas de interés en el sistema heterólogo empleado. Cabe mencionar que en ambas series de experimentos se usaron los extractos de células HEK-293 sin transfectar como control negativo y se utilizó β -actina como control de carga de la técnica.

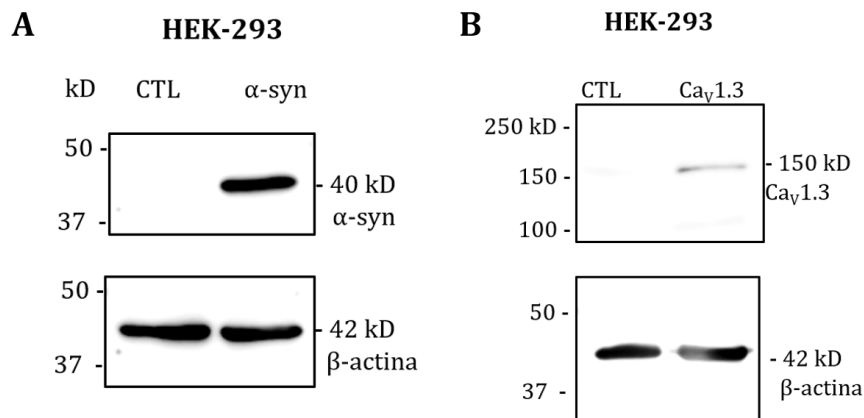


Figura 25. Análisis de expresión de α -syn y Cav1.3. A) Análisis por WB de los extractos proteicos de células HEK-293 transfectadas con la construcción α -syn/GFP en donde para su detección se empleó el anticuerpo primario anti-GFP de conejo, el peso de 40 kDa es aproximado debido a que el peso de la α -syn es de ~ 14.5 kDa y el de GFP es de ~ 25 kDa. B) análisis por WB de los extractos proteicos de células HEK-293 transfectadas con el plásmido que codifica para el canal Cav1.3. La banda encontrada tiene un peso molecular de ~ 150 kDa una vez que se utilizó el anticuerpo primario anti-Cav1.3 de conejo. En ambos análisis los controles que se emplearon fueron los extractos proteicos de células HEK-293 sin transfectar, y el control de carga se detectó empleando un anticuerpo anti- β -actina de ratón.

Confirmada la correcta expresión de las proteínas de manera independiente, y antes de continuar con los análisis inmunoprecipitación (IP), se procedió a realizar una serie de experimentos de co-trasfección en células HEK-293 para α -syn/GFP y el canal Cav1.3. A continuación se extrajeron las proteínas y se analizaron por WB. El resultado de estos experimentos se muestra en la figura 26. La detección de las proteínas resultó en un patrón de bandas muy similar al encontrado cuando las construcciones que codifican para α -syn/GFP y el canal Cav1.3 se transfectaron por separado.

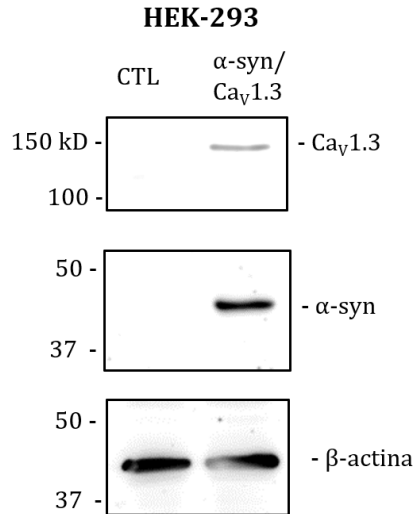


Figura 26. Análisis de la co-trasfección con las construcciones que codifican para las proteínas de interés. En el panel superior se muestra la detección del canal Cav1.3 con el anticuerpo anti-Cav1.3 de conejo; en el panel central se muestra la presencia de la banda correspondiente a α -syn/GFP detectada con el anticuerpo anti-GFP de cabra y en el panel inferior se muestra la detección de β -actina como control de carga. Los lisados de las células HEK-293 sin transfectar se emplearon como control negativo.

8.2.1 Inmunoprecipitación (IP)

Al conseguir que en las células HEK-293 se expresaran tanto la proteína α -syn como el canal Cav1.3, a continuación, se realizaron los ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando los extractos proteicos de células HEK-293 transfectadas con los plásmidos para la expresión de α -syn/GFP y Cav1.3. En primer lugar, se realizaron los experimentos de inmunoprecipitación empleando el anticuerpo anti-Cav1.3 de conejo como inmunoprecipitante y el anticuerpo anti-GFP de cabra para el análisis por WB. Los resultados de este análisis arrojaron la presencia de una banda en el WB que debería corresponder a la interacción entre ambas proteínas. Sin embargo, el peso molecular de la banda identificada fue cercano a 50 kDa. Este resultado sugiere que podría tratarse de una

interacción inespecífica y que dicha banda podría en realidad corresponder a las cadenas pesadas de los anticuerpos empleados en los ensayos (Fig. 27A).

Por su parte, los experimentos de inmunoprecipitación recíproca ahora empleando el anticuerpo anti-GFP de cabra como inmunoprecipitante y el anticuerpo anti-Cav1.3 de conejo para el análisis por WB, no mostraron ninguna banda en el carril del inmunoprecipitado (Fig. 27B). Estos datos sugieren que podría no existir una interacción molecular entre las proteínas α -syn y Cav1.3.

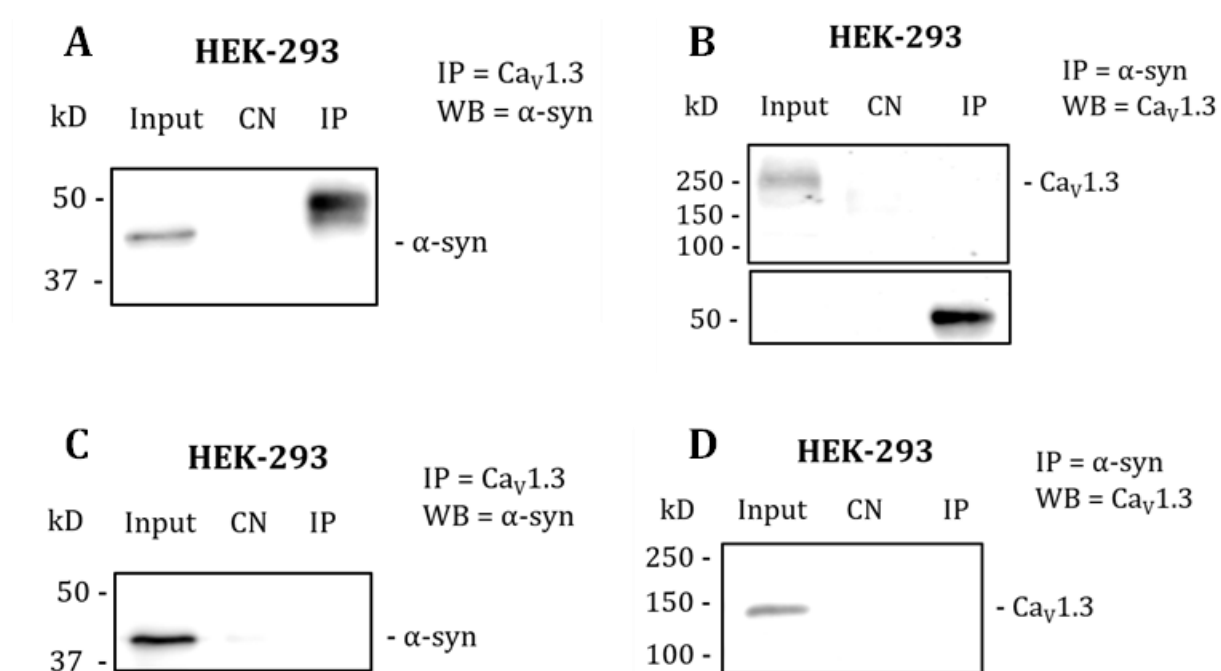


Figura 27. Ensayos de inmunoprecipitación. A) La IP se realizó con el anticuerpo anti-Cav1.3 de conejo y en el análisis por WB se utilizó el anti-GFP de cabra. B) Imagen del ensayo recíproco, empleando el anticuerpo anti-GFP de cabra en la IP y el anti-Cav1.3 de conejo en el WB. Como control negativo (CN) se utilizó un anticuerpo anti-HA de conejo (Tabla 3). C y D) Ensayos de inmunoprecipitación empleando el paquete comercial *Pierce Crosslink Immunoprecipitation Kit*. La IP se realizó el anticuerpo anti-Cav1.3 de conejo y para el WB se utilizó el anti-GFP de cabra (C). Resultado del ensayo recíproco en que se empleó el anticuerpo anti-GFP de cabra en la IP y para el WB se usó el anticuerpo anti-

Cav1.3 de conejo (D). Como control negativo (CN) se utilizó el anticuerpo anti-HA de conejo.

A continuación, en un afán por mejorar las condiciones de los ensayos de IP se realizaron repeticiones de dichos ensayos empleando el paquete comercial *Pierce Crosslink Immunoprecipitation Kit*, tratando de promover un entrecruzamiento entre las proteínas y así evitar interacciones inespecíficas incluidas aquellas que se pudieran estar dando entre las proteínas de interés y las cadenas pesadas de los anticuerpos empleados en los ensayos. En ambos casos el resultado de la inmunoprecipitación resultó negativo. A pesar de poder visualizar proteínas en el carril del *input*, no fue posible detectar proteínas en el ensayo de WB del inmunoprecipitado (Fig. 27C y 27D).

Aquí cabe mencionar, que estos experimentos se realizaron en células transfectadas únicamente con la proteína que forma el poro conductor de los iones (Cav1.3 α_1) y no con el complejo del canal completo, con la intención de investigar la posibilidad de que la interacción entre α -syn y el canal se estuviera dando a través de una interacción con esta subunidad. Por lo tanto, estos resultados muestran que, de haber una interacción entre estas proteínas, debería existir una proteína adicional que, ya sea estuviera actuando como intermediaria de la interacción o que le confiriera al canal la conformación tridimensional que expusiera los posibles sitios de unión a α -syn. Para explorar esta posibilidad a continuación se realizó otra serie de experimentos de interacción-proteína mediante ensayos PLA, en los que además de la subunidad formadora del poro se incluyó uno de los integrantes del complejo del canal Cav1.3, la subunidad auxiliar Cav β , tal y como se describe a continuación.

8.3 Interacción de las proteínas evidenciada por ensayos PLA

En paralelo con los ensayos de IP empleando el sistema de entrecruzamiento se realizaron una serie de ensayos de ligadura de proximidad (PLA, por sus siglas en inglés; Fig. 11) para tratar de evidenciar la interacción directa entre α -syn/GFP y el canal Cav1.3. En este caso, las células HEK-293 se sembraron en cubreobjetos de 22 x 22 mm, y se transfectaron con las construcciones que codifican para α -syn/GFP y Cav1.3, así como la subunidad Cav β . Después de 48 h, las células se fijaron para continuar con el protocolo PLA implementado de acuerdo con las especificaciones del fabricante y previamente validado en nuestro laboratorio (Corzo-López *et al.*, 2023; Leyva-Leyva *et al.*, 2023). Una vez realizadas las maniobras experimentales, las células en los cubreobjetos se observaron al microscopio confocal.

Las imágenes de microscopía representativas en la figura 29 muestran que Cav1.3 y α -syn están en suficiente proximidad como para dar lugar a una señal positiva en los ensayos de PLA, evidenciada por la presencia de un patrón de puntillado rojo, sugiriendo que ambas proteínas podrían ser parte de un mismo complejo y que la interacción entre las dos proteínas se podría estar dando tanto en el citoplasma como en la membrana celular. Sin embargo, aún se requieren más experimentos para poder definir el patrón de distribución subcelular de este posible complejo molecular recién identificado.

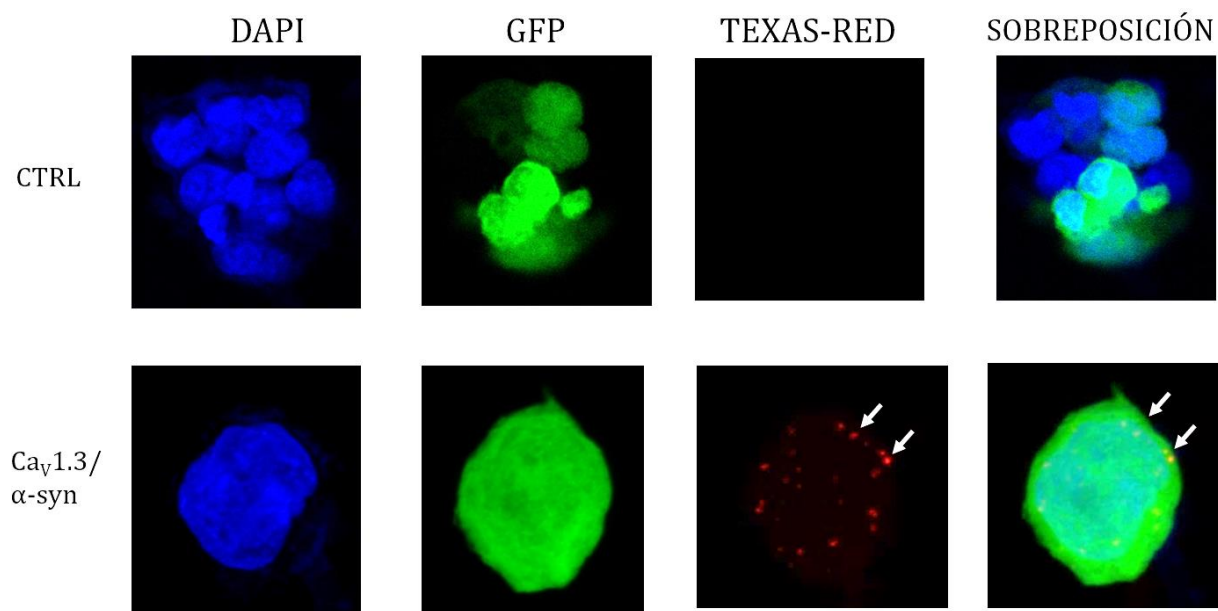


Figura 29. Imágenes de microscopía confocal correspondientes a los ensayos de PLA. Imágenes obtenidas por microscopía confocal (63x) en células HEK-293 transfectadas con α -syn/GFP y Cav1.3. En los paneles superiores se muestran las imágenes correspondientes al control negativo, mientras que en los paneles inferiores se muestran las imágenes del ensayo PLA para las proteínas de interés. En el canal azul se muestran los núcleos, en el canal verde se observa GFP, correspondiente a las células transfectadas, y en el canal rojo se muestra la señal PLA. Las imágenes son representativas de esta serie de experimentos independientes (n=1).

8.4 Ensayos funcionales

Los resultados anteriores sugieren una interacción directa entre α -syn/GFP y Cav1.3, por lo que a continuación, se evaluó su posible repercusión funcional mediante registros electrofisiológicos usando la técnica de *patch-clamp* en su configuración de célula completa (Fig. 12). Con este fin, las células HEK-293 se transfectaron con las construcciones de α -syn/GFP y Cav1.3 (Tabla 4). Cuarenta y ocho horas después, las células se dispersaron y se sembraron a una baja densidad sobre cubreobjetos pre-tratados con poli-L-lisina (0.05%). Para el control, se realizó la transfección del canal

Cav1.3 con sus subunidades auxiliares Cav β_3 o Cav β_{1b} , $\alpha_2\delta$ -1 y GFP para identificar las células transfectadas. En la cámara de registro se agregaron 500 μ L de la solución externa de registro y a las micropipetas se les agregó el volumen necesario de la solución interna. Como se mencionó, las células control se seleccionaron por la expresión de GFP. Durante la aplicación de un pulso despolarizante a -30 mV y 500 ms de duración, desde el potencial de mantenimiento de -80 mV, se generaron corrientes entrantes que se activaron e inactivaron rápidamente. Para la condición experimental no hubo necesidad de transfectar las células con el plásmido de GFP, ya que la construcción de α -syn se encuentra fusionada a ella. En estas células la corriente generada en respuesta al pulso de prueba a -30 mV fue similar al control. Aunque hubo una discreta tendencia a ser de menor amplitud en las células que co-expresaban α -syn (Fig. 30A), esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

A continuación, para conocer la dependencia al voltaje de las corrientes, se aplicaron una serie de pulsos despolarizantes de 500 ms de duración desde el potencial de mantenimiento de -80 mV con incrementos de 5 mV hasta alcanzar los 70 mV. Para cada uno de los trazos obtenidos, se registró el tamaño de la corriente máxima y se dividió entre la capacitancia de la célula, para obtener la densidad de corriente-voltaje a cada uno de los voltajes estudiados. Así, en concordancia con los datos obtenidos a partir de los valores de la amplitud de la corriente máxima, la curva densidad de corriente-voltaje muestra una tendencia (no significativa) a ser de menor magnitud en la condición en que se co-expresó α -syn. En el análisis de 18 células para cada condición, la corriente al pico para el control fue de -129 ± 17 pA/pF, mientras que en presencia de α -syn, tuvo un valor de -118 ± 16.5 pA/pF (Fig. 30B). Cabe señalar que, en las dos condiciones estudiadas, la corriente se

activó alrededor de -55 mV, alcanzó el pico en -30 mV e invirtió de dirección de entrante a saliente alrededor de 60 mV (Fig. 30B). Estos valores son similares a los previamente reportados para los canales Cav1.3 recombinantes (Loya-López *et al.*, 2020; Grimaldo *et al.*, 2022).

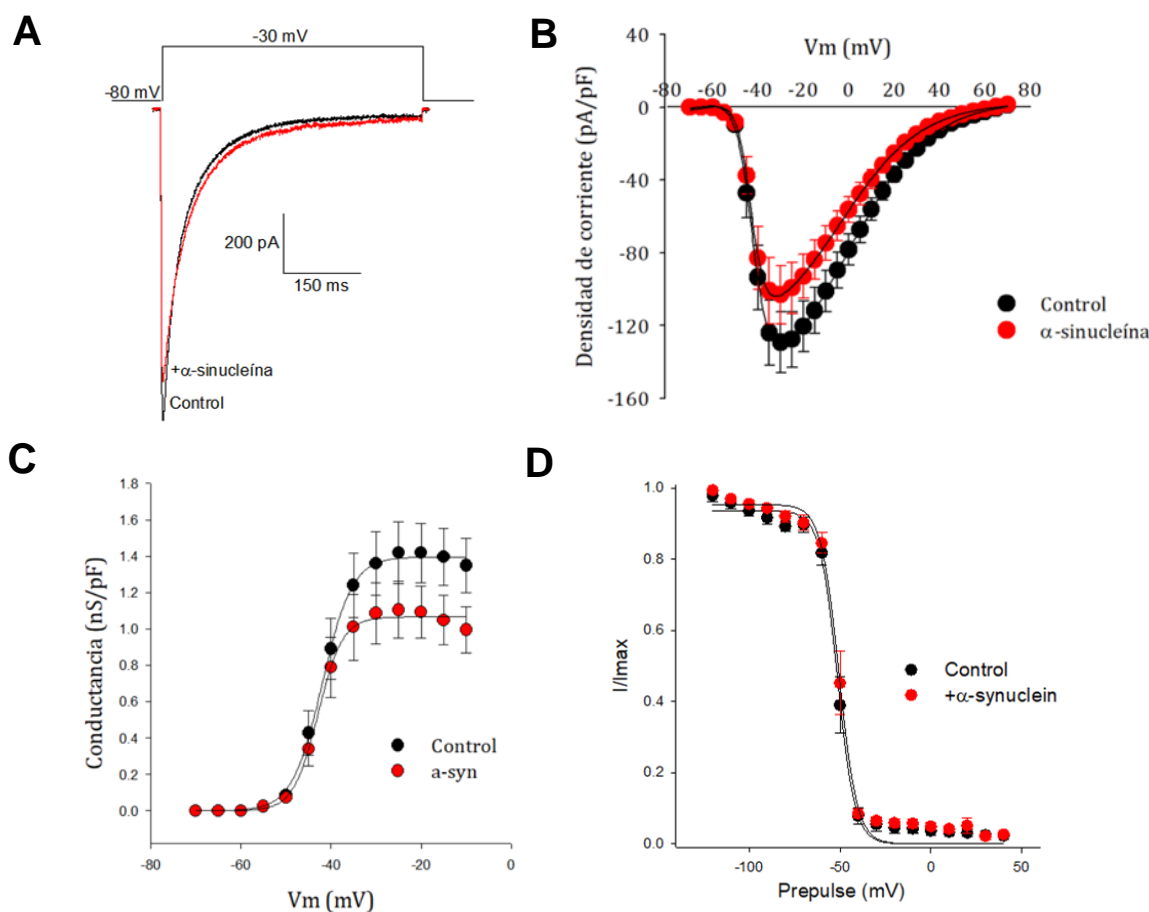


Figura 30. Efecto de α -syn sobre las corrientes de calcio a través de canales Cav1.3 recombinantes expresados en células HEK-293. A) Trazos representativos de la corriente de Ca^{2+} a través de canales Cav1.3/Cav β ₃/Cav α δ -1, en ausencia (negro) y en presencia de α -syn (gris). En esta serie de experimentos se evaluaron un total de 18 células para cada condición. B) Comparación de las curvas densidad de corriente-voltaje. En negro se muestran los resultados obtenidos de las células control y en rojo son las células transfectadas con α -syn. C) Comparación de la curvas conductancia-voltaje. En negro se muestran los resultados obtenidos de las células control y en rojo son las células transfectadas con α -syn. Los valores normalizados se ajustaron con una función sigmoidea tipo Boltzmann. D) Comparación de las curvas de inactivación en el estado estacionario en

la condición control y en presencia de α -syn. Los datos se obtuvieron como se menciona en el texto y después se graficaron y ajustaron mediante funciones sigmoideas.

Para conocer la dependencia al voltaje de la activación, se usaron los valores de corriente obtenidos a partir de la curva I - V para construir una curva de activación (Fig. 30C), también conocida como curva de conductancia-voltaje (G - V), usando la fórmula $G=I/(V-V_i)$, donde G es la conductancia, I es la corriente, V es el voltaje al cual se generó la corriente y V_i , es el potencial de inversión. Los valores de conductancia se graficaron en función del voltaje y se ajustaron a una función sigmoidea tipo Boltzmann (Fig. 30C). De acuerdo con este análisis, la G_{\max} (conductancia máxima) fue de ~ 1.4 nS, el factor dependiente (k) de ~ 3.3 mV y el voltaje medio de activación ($V_{1/2}$) de ~ -41.8 mV. Los valores de estos parámetros para la condición con α -syn fueron 1.2 nS, 2.6 mV y -43.0 mV, respectivamente. Estos datos indican que la expresión de α -syn disminuyó en $\sim 16\%$ la conductancia máxima, aunque esta tendencia no alcanzó un valor estadísticamente significativo.

Para conocer la dependencia al voltaje de la inactivación se aplicó un protocolo de dos pulsos, un prepulso, con una duración de 5 s que partió del potencial de mantenimiento de -80 mV a -120 mV, con un breve periodo interpulso de 12 ms, seguido del pulso de prueba a 0 mV, de 140 ms de duración. El prepulso se incrementó en pasos de 10 mV hasta llegar a 20 mV, mientras que el pulso de prueba se mantuvo al mismo voltaje. A continuación, se construyó la curva de inactivación en el estado estacionario al graficar los valores de corriente normalizados obtenidos durante el pulso de prueba como función del voltaje del prepulso (Fig. 30D). Los datos se ajustaron con funciones sigmoidales y parámetros del ajuste mostraron una similitud muy estrecha en la inactivación de las

corrientes en ambas condiciones experimentales. La corriente máxima normalizada en el control (I_{\max}) fue de 0.93, el factor de pendiente k de -4.8 mV y la $V^{1/2}$ de -51.4 mV. En presencia de α -syn los valores fueron 0.95, -4.9 mV y -50.5 mV, respectivamente.

Tomados en su conjunto, estos datos sugieren que en presencia de α -syn hay una disminución (no significativa estadísticamente) de la densidad de corriente, sin mayores cambio en la voltaje-dependencia y en la cinética de las corrientes.

Con la finalidad de estudiar con mayor detalle la regulación de los canales Cav1.3 por α -syn, a continuación, se exploró la posibilidad de que la composición del complejo del canal en términos de subunidades podría estar jugando un papel en la interacción funcional entre estas proteínas. Para ello, se transfectaron células HEK-293 con α -syn/GFP y el canal con una composición molecular distinta: Cav1.3 α_1 con sus subunidades auxiliares Cav β_{1b} (en sustitución de Cav β_3 , la subunidad empleada en los experimentos descritos en los párrafos precedentes) y $\alpha_2\delta$ -1. Los protocolos de transfección y registro electrofisiológicos fueron los mismos que los empleados en los experimentos en que se evaluó la interacción funcional del canal conteniendo Cav β_3 y α -syn.

Durante la aplicación de los pulsos despolarizantes de 500 ms a -30 mV, desde el potencial de mantenimiento de -80 mV, se generaron corrientes entrantes que difirieron significativamente entre la condición control y en presencia de α -syn. En este caso amplitud en las células que co-expresaban α -syn fue 53% más pequeña que en el control (Fig. 31A). Consistente con estos valores, el análisis de las curvas densidad de corriente-voltaje mostró una disminución en su magnitud a los diferentes voltajes en la condición en que se co-expresó α -syn (Fig. 31B).

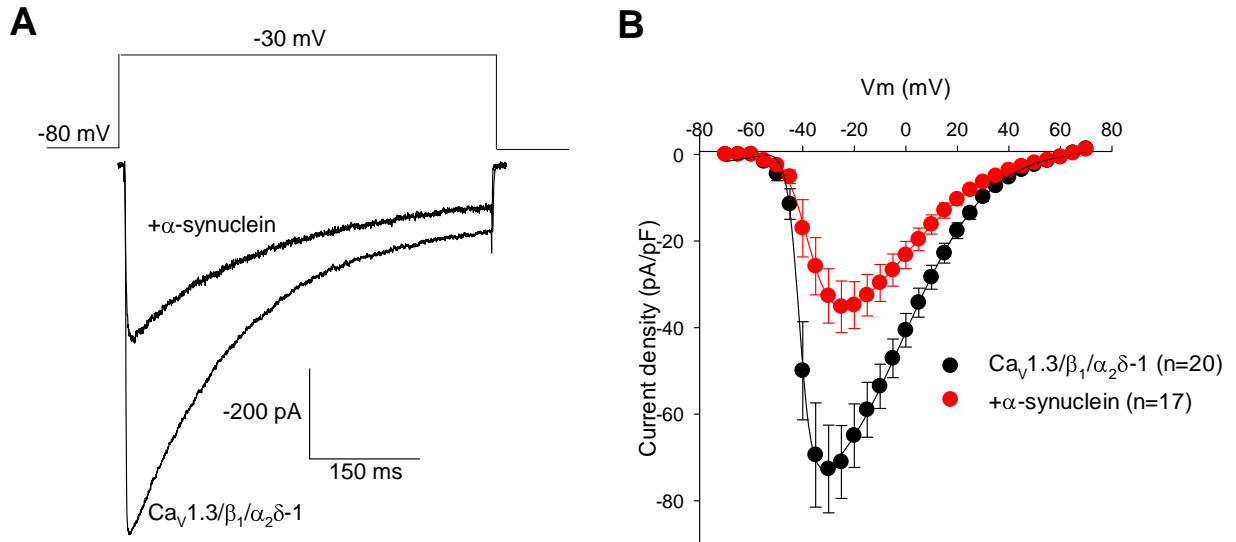


Figura 31. Efecto de α -syn sobre las corrientes de calcio a través de canales $Ca_v1.3$ recombinantes expresados en células HEK-293. A) Trazos representativos de la corriente de Ca^{2+} a través de canales $Ca_v1.3/Ca_v\beta_{1b}/Ca_v\alpha_2\delta-1$, en ausencia y en presencia de α -syn, como se indica. B) Comparación de las curvas densidad de corriente-voltaje. En negro se muestran los resultados obtenidos de las células control y en gris son las células transfectadas con α -syn. En esta serie de experimentos se evaluaron un total de 17-20 células.

9 DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos a lo largo de este trabajo de tesis, se puede destacar que, 1) se logró obtener satisfactoriamente la construcción de ADNc que codifica para α -syn, cuya identidad molecular se confirmó por secuenciación automática, y se consiguió su expresión en la línea celular HEK-293; 2) se identificó una interacción directa entre el canal y la α -syn mediante ensayos PLA y; 3) se obtuvieron evidencias electrofisiológicas de que la interacción entre α -syn y el canal Cav1.3 pudiera tener importantes repercusiones funcionales. A nuestro saber y entender, esta es la primera vez que se identifica una interacción molecular de esta naturaleza.

9.1 Relación entre canales de calcio, α -sinucleína y enfermedad de Parkinson

En estudios previos se ha mostrado que los canales Cav1.3 pueden estar participando en el funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y, en condiciones patológicas, en la aparición y/o desarrollo de la EP. Primeramente, se sabe que el subtipo del canal de calcio Cav1.3 participa de manera determinante en el desarrollo de la actividad marcapasos que caracteriza a este tipo neuronal (Chan *et al.*, 2007; Hurley & Dexter, 2012; Sandoval *et al.*, 2022).

En ese contexto, las neuronas SNpc DA son marcapasos autónomos que generan potenciales de acción (PA) con una frecuencia relativamente baja (2-10 Hz) en ausencia de una entrada sináptica (Grace & Bunney, 1984; Chan *et al.*, 2007). Los PA en estas neuronas son amplios, lo que maximiza la entrada de Ca^{2+} y promueve una actividad rítmica lenta. Esta actividad autónoma se acompaña de oscilaciones lentas en la concentración intracelular de Ca^{2+} causadas por la apertura de los canales Cav1 de la

membrana plasmática y la liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE), así como por una baja amortiguación del Ca^{2+} intracelular (Chan *et al.*, 2007; Foehring *et al.*, 2009; Hurley *et al.*, 2013). Se sabe que los canales de tipo Cav1.2 y Cav1.3 contribuyen a estas oscilaciones en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc.

Los canales Cav1.3 son particularmente interesantes porque se activan a potenciales de membrana relativamente hiperpolarizados (Loya-López *et al.*, 2020; Grimaldo *et al.*, 2022; Sandoval *et al.*, 2022). De hecho, debido al rango operativo despolarizado de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, los canales Cav1.3 nunca se cierran por completo durante el ciclo de marcapasos. Esto y la expresión de variantes de procesamiento alternativo del ARN de la subunidad Cav1.3 α_1 que dan origen a proteínas con C-terminal más corto, como la usada en este trabajo de tesis, minimizan la inactivación dependiente de Ca^{2+} , y dan como resultado una entrada sostenida de Ca^{2+} . Recientemente, también se ha mostrado que el umbral de activación bajo de los canales Cav1.3, contribuye en gran medida a la propagación retrógrada de los PA en las dendritas, lo que aumenta aún más la entrada de Ca^{2+} y modula la ganancia sináptica tras la estimulación y, en consecuencia, el inicio del disparo en ráfaga (Surmeier *et al.*, 2017). Habiendo subrayado la importancia potencial de estas oscilaciones de calcio, se ha propuesto que la pérdida de su control puede contribuir a la vulnerabilidad neuronal en la EP.

El fenotipo de marcapasos inusualmente lento que involucra a los canales Cav1 y que deriva en las oscilaciones sostenidas de calcio intracelular en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, participa en el control indirecto de la fosforilación oxidativa mitocondrial, lo que, en condiciones patológicas podría llevar a un estrés oxidativo mitocondrial sostenido. Este fenómeno, con el tiempo, podría conducir a una pérdida

progresiva de la función mitocondrial que se traduce en déficits bioenergéticos. El estrés oxidativo también podría aumentar la disfunción proteostática al dañar las proteínas celulares y aumentar el flujo mitofágico, comprometiendo la capacidad de las células de lidiar con la disfunción proteica. Además, la elevación en la concentración de Ca^{2+} citosólico que acompaña a este mecanismo de retroalimentación podría promover la agregación de α -syn, un componente importante de la EP (Vekrellis *et al.*, 2011; Caulfield *et al.*, 2023). Por lo tanto, este fenotipo podría predisponer a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc a una vulnerabilidad selectiva en la EP (Surmeier *et al.*, 2017).

Se sabe que la α -syn es una proteína que está involucrada en diferentes patologías neuronales incluidas la demencia por cuerpos de Lewy, y la EP (Hettiarachchi *et al.*, 2009; Vekrellis *et al.*, 2011; Bachiller *et al.*, 2018). Particularmente en la EP, los agregados de la proteína pueden formar poros en la membrana permeables a distintas moléculas incluidos los iones, como Ca^{2+} , y alterar la homeostasis celular (Caulfield *et al.*, 2023). A su vez, se sabe que los agregados de la proteína, presentes en las enfermedades neurodegenerativas, interfieren con su función normal al alterar las vesículas sinápticas y provocar una fuga de neurotransmisores hacia el citoplasma. Un aumento de la dopamina intracelular podría provocar estrés oxidativo y desencadenar una cascada neurodegenerativa (Vekrellis *et al.*, 2011; Surmeier *et al.*, 2017). Se sabe además que la α -syn patológica puede liberarse en el espacio extracelular y propagarse entre las neuronas en áreas del cerebro conectadas sinápticamente, lo que ayuda a la dispersión de la patología en las neuronas vecinas sanas (Leandrou *et al.*, 2019; Caulfield *et al.*, 2023).

En el contexto de la EP, se sabe que existe una correlación entre el aumento de la actividad de los canales Cav1.3 y la generación de agregados patológicos de α -syn, que está

relacionado, como se mencionó anteriormente, con alteraciones en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular. Inicialmente, cuando se aumenta la concentración de Ca^{2+} se favorece la oligomerización patogénica y la generación de los agregados de α -syn, así como también, se interfiere con los mecanismos de transmisión sináptica, la plasticidad neuronal y la supervivencia de las neuronas (Surmeier *et al.*, 2017; Leandrou *et al.*, 2019; Cauldield *et al.*, 2023).

Por otro lado, en este trabajo de tesis se muestran evidencias experimentales de que la α -syn puede interactuar directamente con el canal Cav1.3 y que esta regulación tiene una repercusión funcional importante. Con los datos aquí mostrados se pueden hacer algunas especulaciones que, de ser confirmadas experimentalmente, eventualmente contribuirían a aumentar nuestro conocimiento del funcionamiento de los canales Cav1.3 en las neuronas de la SNpc, y de cómo su alteración podría participar en el desarrollo de la fisiopatología de la EP. La regulación inhibitoria de la actividad de los canales por la α -syn aquí mostrada, podría jugar un papel muy importante para mantener la homeostasis del calcio en las neuronas de la SNpc. En condiciones de salud, la α -syn monomérica podría unirse a los canales e inhibir las corrientes iónicas de calcio que subyacen a la actividad marcapaso de las células. En ese sentido, representarían un freno para la entrada de calcio al interior celular. Sin embargo, en condiciones patológicas, la α -syn se organizaría en oligómeros y fibrillas que podrían ya no interactuar con el canal liberándolo de la inhibición ejercida por la proteína, incrementándose su actividad con el consecuente aumento en el calcio citosólico.

Además, la regulación de los canales por α -syn podría estarse dando a través de la interacción con la subunidad Cav β , la cual es muy importante en la función de los canales

y su envío hacia la membrana plasmática. En este caso, la interacción de α -syn con Cav β ocasionaría que el tráfico normal de los canales hacia la membrana podría estar siendo modificado. De manera interesante, de acuerdo con los resultados de los ensayos funcionales aquí mostrados, esta regulación es, aparentemente, dependiente del tipo de subunidad Cav β que se encuentre interactuando con el canal Cav1.3. Este tipo de interacción representa un mecanismo muy fino de regulación de la expresión funcional de los canales y podría estar asociado con algún tipo celular específico, o participar en alguna etapa particular del desarrollo, donde se expresaran preferencialmente las subunidades Cav β que son capaces de unirse a α -syn.

De hecho, la hipótesis de que los canales de calcio juegan un papel central en la EP está respaldada por estudios en humanos. Particularmente, datos epidemiológicos muestran una vinculación del uso de dihidropiridinas, fármacos inhibidores de los canales Cav1, con un menor riesgo de desarrollar EP y con una evolución más lenta de la enfermedad (Surmeier *et al.*, 2017; Leandrou *et al.*, 2019; Cauldield *et al.*, 2023).

9.2 Perspectivas

A partir de los datos aquí presentados, las perspectivas a corto plazo del trabajo incluyen, primero, continuar con los ensayos de IP para confirmar cómo se está llevando a cabo la interacción entre Cav1.3 y α -syn, identificando si esta interacción en efecto se lleva a cabo directamente o se encuentran presentes actores moleculares secundarios como proteínas amortiguadoras de unión a calcio. Aquí es importante resaltar que existen evidencias sólidas de que la calmodulina (CaM) puede unirse tanto al canal de calcio como a la α -syn,

por lo que representaría un candidato natural para ser intermediario en esta interacción molecular (Hurley et al., 2012; 2013).

Segundo, sería necesario dar continuidad a los ensayos de PLA para identificar los sitios donde se está llevando a cabo la interacción entre α -syn y el canal Cav1.3. Aquí cabe mencionar que el análisis de los registros electrofisiológicos en el presente trabajo en presencia y en ausencia de α -syn, muestran una regulación inhibitoria de la densidad de corriente que no se acompaña de una alteración en la cinética o la dependencia al voltaje de estas, lo que sugiere que el efecto sobre las corrientes ocurre a través de una regulación del envío de los canales a la membrana. Es decir, para explicar la inhibición por α -syn hay dos posibilidades, alterar (inhibir) la función de los canales o disminuir el número de canales funcionales en la membrana. Dado que las propiedades biofísicas fundamentales de los canales no se ven afectadas, entonces, la posibilidad de un tránsito disminuido de canales a la membrana emerge como la posibilidad más plausible.

Por otro lado, se necesita también profundizar en los estudios funcionales para entender mejor los mecanismos moleculares que subyacen las acciones inhibitorias de la α -syn sobre los canales Cav1.3. En este sentido, sería interesante abundar sobre la posibilidad de que la regulación ejercido por α -syn ocurriera de manera diferencial dependiendo de la composición de los canales en términos de las subunidades Cav β que conforman el complejo del canal. De hecho, estos estudios podrían dar un poco de luz en el enigmático tema de la vulnerabilidad selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc a la neurodegeneración. Una especulación al respecto pasaría entonces por la posibilidad de que las neuronas DA de la SNpc tuvieran canales Cav1.3 con una composición particular en términos de subunidades que los predispusiera a perder con mayor facilidad el control

inhibitorio de la α -syn. Asimismo, los ensayos funcionales podrían también ser muy útiles para estudiar el posible papel que pudiera ejercer la CaM en esta nueva interacción molecular entre α -syn y los canales.

Por otro lado, dentro de las perspectivas a mediano y a largo plazo, se puede plantear el estudio funcional de las variantes patológicas de α -syn, utilizando mutagénesis dirigida y analizando si la interacción entre Cav1.3 y α -syn se modifica de alguna manera. Las mutantes que se planea analizar son la A53T y la S129D. La primer mutante es la que se encuentra relacionada con las formas familiares raras de la EP y es la que genera los agregados patológicos de α -syn, mientras que la segunda mimetiza la fosforilación de la proteína que se ha visto tiene un efecto protector de la formación de los agregados de α -syn (Hettiarachchi *et al.*, 2009; Burré *et al.*, 2012). Los estudios electrofisiológicos de estas variantes de α -syn podrían ayudar a contrastar la hipótesis de que son los monómeros de la proteína los que tienen la capacidad de unirse al complejo del canal Cav1.3 y regular su actividad.

10 REFERENCIAS

1. Alam M. (2018) Proximity ligation assay (PLA). *Curr Protoc Immunol* 123, 1-8.
2. Alberts N, Mathangasinghe Y, Nillegoda NB. (2019) In situ monitoring of transiently formed molecular chaperone assemblies in bacteria, yeast, and human cells. *J Vis Exp Sep 2* (151).
3. Alim MA, Ma QL, Takeda K, Aizawa T, Matsubara M, Nakamura M, Asada A, Saito T, Kaiji H, Yoshii M, Hisanaga S, Uéda K. (2004) Demonstration of a role for α -synuclein as a functional microtubule-associated protein. *J Alzheimers Dis* 6, 435-442.
4. Avila G, Sandoval A, Felix R. (2004) Intramembrane charge movement associated with endogenous K^+ channel activity in HEK-293 cells. *Cell Mol Neurobiol* 3, 317-30.
5. Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T, Boza-Serrano A. (2018) Microglia in neurological diseases: A road map to brain-disease dependent-inflammatory response. *Front Cell Neurosci* 12, 488.
6. Berger SM, Bartsch D. (2014) The role of L-type voltage-gated calcium channels Cav1.2 and Cav1.3 in normal and pathological brain function. *Cell Tissue Res* 357, 463-476.
7. Bieri G, Gitler AD, Brahic M. (2018) Internalization, axonal transport and release of fibrillar forms of α -synuclein. *Neurobiol Dis* 109, 219-225.
8. Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC. (2010) α -synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329, 1663-1667.
9. Burré J, Sharma M, Südhof TC. (2012) Systematic mutagenesis of α -synuclein reveals distinct sequence requirements for physiological and pathological activities. *J Neurosci* 32, 15227-15242.

10. Campiglio M, Flucher B. (2015) The role of auxiliary subunits for the functional diversity of voltage-gated calcium channels. *J Cell Physiol* 230, 2019-2031.
11. Caulfield ME, Manfredsson FP, Steece-Collier K. (2023) The role of striatal Cav1.3 calcium channels in therapeutics for Parkinson's disease. *Handb Exp Pharmacol* 279, 107-137.
12. Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ. (2007) 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 447, 1081-1086.
13. Choia B, Choib M, Kimc J, Yangb Y, Laie Y, Kweond D, Ki Leea N, Shin Y. (2013) Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 4087-4092.
14. Corzo-López A, Leyva-Leyva M, Castillo-Viveros V, Fernández-Gallardo M, Muñoz-Herrera D, Sandoval A, González-Ramírez R, Felix R. (2023) Molecular mechanisms of nuclear transport of the neuronal voltage-gated Ca^{2+} channel β_3 auxiliary subunit. *Neuroscience* 522, 150-164.
15. Currie KP. (2010) G protein modulation of Cav2 voltage-gated calcium channels. *Channels (Austin)* 4, 497-509.
16. Emamzadeh FN. (2016) α -synuclein structure, functions, and interactions. *J Res Med Sci* 21, 29.
17. Emmanouilidou E, Vekrellis K. (2016) Exocytosis and spreading of normal and aberrant α -synuclein. *Brain Pathol* 26, 398-403.

18. Felix R, Calderón-Rivera A, Andrade A. (2013) Regulation of high-voltage-activated Ca²⁺ channel function, trafficking, and membrane stability by auxiliary subunits. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 2, 207-220.
19. Foehring RC, Zhang XF, Lee JC, Callaway JC. (2009) Endogenous calcium buffering capacity of substantia nigral dopamine neurons. *J Neurophysiol* 102, 2326-2333.
20. Gadsby D. (2009) Ion channels versus ion pumps: the principal difference, in principle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 344-352.
21. Gandini MA, Sandoval A, Felix R. (2014) Patch-clamp recording of voltage-sensitive Ca²⁺ channels. *Cold Spring Harb Protoc* 2014, 329-325.
22. Gandini MA, Zamponi GW. (2021) Voltage-gated calcium channel nanodomains: molecular composition and function. *FEBS J* 289, 614-633.
23. González N, Arcos-López T, König A, Quintanar L, Menacho Márquez M, Outeiro TF, Fernández CO. (2019) Effects of α -synuclein post-translational modifications on metal binding. *J Neurochem* 150, 507-521.
24. Grace AA, Bunney BS. (1984) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* 4, 2866-2876.
25. Grimaldo L, Sandoval A, Duran P, Gómez Flores-Ramos L, Felix R. (2022) The ubiquitin E3 ligase Parkin regulates neuronal Cav1.3 channel functional expression. *J Neurophysiol* 128, 1555-1564.
26. Hettiarachchi NT, Parker A, Dallas ML, Pennington K, Hung CC, Pearson HA, Boyle JP, Robinson P, Peers C. (2009) α -Synuclein modulation of Ca²⁺ signaling in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *J Neurochem* 111, 1192-1201.

27. Hoyer W, Cherny D, Subramaniam V, Jovin TM (2004) Impact of the acidic C-terminal region comprising amino acids 109-140 on α -synuclein aggregation *in vitro*. *Biochemistry* 43, 16233-16242.
28. Hurley MJ, Dexter DT. (2012) Voltage-gated calcium channels and Parkinson's disease. *Pharmacol Ther* 133, 324-333.
29. Hurley MJ, Brandon B, Gentleman SM, Dexter DT. (2013) Parkinson's disease is associated with altered expression of Cav1 channels and calcium-binding proteins. *Brain* 136, 2077-2097.
30. Islam MS, Gaston JP, Baker MAB. (2021) Fluorescence approaches for characterizing ion channels in synthetic bilayers. *Membranes (Basel)* 11, 857.
31. Kingwell K. (2017) Zeroing in on neurodegenerative α -synuclein. *Nat Rev Drug Discov* 16, 371-373
32. Lashuel HA, Overk CR, Oueslati A, Masliah E. (2013) The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target. *Nat Rev Neurosci* 14, 38-48.
33. Lautenschläger J, Stephens AD, Fusco G, Ströhl F, Curry N, Zacharopoulou M, Michel CH, Laine R, Nespovitaya N, Fantham M, Pinotsi D, Zago W, Fraser P, Tandon A, St George-Hyslop P, Rees E, Phillips JJ, De Simone A, Kaminski CF, Schierle GSK. (2018) C-terminal calcium binding of α -synuclein modulates synaptic vesicle interaction. *Nat Commun* 9, 712.
34. Leandrou E, Emmanouilidou E, Vekrellis K. (2019) Voltage-gated calcium channels and α -synuclein: implications in Parkinson's disease. *Front Mol Neurosci* 12, 237.
35. Lees AJ, Hardy J, Revesz T. (2009) Parkinson's disease. *Lancet* 373, 2055-2066.

36. Leyva-Leyva M, Sandoval A, Morales-Lázaro SL, Corzo-López A, Felix R, González-Ramírez R. (2023) Identification of Dp140 and α 1-syntrophin as novel molecular interactors of the neuronal CaV2.1 channel. *Pflugers Arch* 475, 595-606.
37. Lieberman OJ, Choi SJ, Kanter E, Saverchenko A, Frier MD, Fiore GM, Wu M, Kondapalli J, Zampese E, Surmeier DJ, Sulzer D, Mosharov EV. (2017) α -synuclein-dependent calcium entry underlies differential sensitivity of cultured sn and vta dopaminergic neurons to a parkinsonian neurotoxin. *ENeuro* 4, ENEURO.0167-17.2017.
38. Loya-López S, Sandoval A, González-Ramírez R, Calderón-Rivera A, Ávalo-Fuentes A, Rodríguez-Sánchez M, Caballero R, Tovar-Soto D, Félix R, Florán B. (2020) Cdk5 phosphorylates Cav1.3 channels and regulates GABA_A-mediated miniature inhibitory post-synaptic currents in striato-nigral terminals. *Biochem Biophys Res Commun* 524(1):255-261.
39. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8, 2804-2814.
40. Martínez JH. (2016) Rol de alfa-sinucleína en la función y dinámica mitocondrial en modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson. *FCEN-UBE* 1-174.
41. Mercuri NB, Bonci A, Calabresi P, Stratta F, Stefani A, Bernardi G. (1994) Effects of dihydropyridine calcium antagonists on rat midbrain dopaminergic neurones. *Br J Pharmacol* 113, 831-838.
42. Mosharov EV, Larsen KE, Kanter E, Phillips KA, Wilson K, Schmitz Y, Krantz DE, Kobayashi K, Edwards RH, Sulzer D. (2009) Interplay between cytosolic dopamine, calcium, and α -synuclein causes selective death of substantia nigra neurons. *Neuron* 62, 218-229.

43. Niemeyer BA, Mery L, Zawar C, Suckow A, Monje F, Pardo LA, Stühmer W, Flockerzi V, Hoth M. (2001) Ion channels in health and disease. *EMBO reports* 2, 568-573.
44. Sandoval A, Duran P, Corzo-López A, Fernández-Gallardo M, Muñoz-Herrera D, Leyva-Leyva M, González-Ramírez R, Felix R. (2022) The role of voltage-gated calcium channels in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Int J Neurosci* (en prensa).
45. Snead D, Eliezer D. (2014) α -synuclein function and dysfunction on cellular membranes. *Exp Neurobiol.* 23, 292-313.
46. Snutch TP. (2008) Voltage-gated calcium channels. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:1615741>.
47. Stefanis L, Emmanouilidou E, Pantazopoulou M, Kirik D, Vekrellis K, Tofaris GK. (2019) How is α -synuclein cleared from the cell? *J Neurochem* 150, 577-590.
48. Striessnig J, Bolz H. J, Koschak A. (2010) Channelopathies in Cav1.1, Cav1.3, and Cav1.4 voltage-gated L-type Ca^{2+} channels. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 460, 361-374.
49. Surmeier DJ, Schumacker PT, Guzman JD, Ilijic E, Yang B, Zampese E. (2017) Calcium and Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 483, 1013-1019.
50. Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L. (2011) Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders. *Lancet Neurol* 10, 1015-25
51. Weiss N, Zamponi GW. (2012) Regulation of voltage-gated calcium channels by synaptic proteins. *Adv Exp Med Biol.* 740,759-75.
52. 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.

53. Wu S, Hernandez Villegas NC, Schekman R. (2023) Chemical disaggregation of α -synuclein fibrils as a therapy for synucleinopathies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 120, e2300965120.
54. Yu H, Han W, Ma W, Schulten K. (2015) Transient β -hairpin formation in α -synuclein monomer revealed by coarse-grained molecular dynamics simulation. *J Chem Phys* 143, 243142.
55. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. (2015) The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev* 67, 821-870.