

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**REGIONES MOLECULARES RESPONSABLES DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL
RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1 (AT1) Y LA SUBUNIDAD DEL CANAL DE
CALCIO TIPO L Ca_v1.2**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

EDGARDO ANDRES SALAMANCA AVALOS

TEMUCO – CHILE

2012

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**REGIONES MOLECULARES RESPONSABLES DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL
RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO 1 (AT1) Y LA SUBUNIDAD DEL CANAL DE
CALCIO TIPO L Ca_v1.2**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

EDGARDO ANDRES SALAMANCA AVALOS
PROFESOR GUÍA: DIEGO ERNST VARELA LEKANDA
TEMUCO – CHILE

2012

“REGIONES MOLECULARES RESPONSABLES DE LA INTERACCIÓN ENTRE AT1 Y
Ca_v1.2”

PROFESOR GUÍA

: _____

Diego Ernst Varela Lekanda

Profesor Asistente

Dr. en Ciencias Biomédicas

Departamento de Fisiopatología

Facultad de Medicina, Universidad de Chile,
ICBM

PROFESOR CONSEJERO

: _____

Luis Antonio Salazar Navarrete

Profesor Titular

Dr. en Farmacia

Universidad de La Frontera

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS

: _____

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos hacia todas las personas que contribuyeron en la realización de este trabajo, que con su apoyo, amistad, cariño y compañía permitieron que todo el tiempo dedicado haya sido de gran provecho para el buen término de este.

Agradezco a mis tutores, Dr. Diego Varela y Dr. Luis Salazar, por el gran apoyo que me brindaron durante este proceso, y por darme la oportunidad de formarme académicamente bajo su profesionalismo y dedicación a la investigación. En particular, al Dr. Varela y su esposa, Dra. Hermosilla, por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su tutoría, dándome la guía, orientación y gran dedicación, las cuales fueron fundamentales. Agradezco enormemente la paciencia que mostraron conmigo a lo largo de este año, ya que me permitió seguir adelante a pesar de los errores y problemas. Por su parte, al Dr. Salazar agradezco su buena disposición a revisar y evaluar de forma coherente y desinteresada esta tesis.

A todo el equipo y personas con quienes compartí en el laboratorio de fisiopatología molecular: Dr. Andrés Stutzin, Dr. Ricardo Armisen, Mg. Cristian Moreno, Pablo Báez y Candidato a doctor Alfredo Sagredo, muchas gracias por los momentos compartidos. En especial, agradezco a Heidi Pérez, por su compañía y por brindarme alegría día tras día, y a Eduardo Sagredo, por su compañerismo, paciencia, ayuda, comprensión y empatía durante este largo proceso, muchas gracias amigo.

De manera muy especial quiero agradecer a toda mi familia, que siempre ha estado conmigo apoyando y entregándome el cariño de forma incondicional. A mi padre, Pr. Edgardo Salamanca, y mi madre, Carmen Gloria Avalos, que me han llenado de amor durante toda mi vida y me han inculcado los valores y principios que me permitieron llegar hasta donde estoy, y que han sido fundamentales en este proceso. A mis hermanos, José Pablo y Matías, por siempre estar conmigo.

A pesar de que este año no estuvimos juntos, les agradezco a todos ustedes, siempre sentí su presencia y preocupación los cuales me ayudaron a seguir adelante.

A mi familia en Santiago, a mis tíos, Pablo, Lucy, Paola y Axel y mis primos Nastienka, Pía e Ignacio, por estar conmigo y alegrarme cuando lo necesitaba. En particular, doy muchas gracias a mis abuelos, José Pablo Avalos y Lucila Flores, por acogerme y darme todo la atención, comodidades y amor durante todo este año, sin ustedes hubiera sido muy difícil.

Agradezco a Camila Saiz, por la comprensión, paciencia, por confiar en mí, por estar conmigo en todo momento, y por todo el amor entregado durante todos estos años. Toda la fuerza que me entregaste ha sido la energía para terminar este trabajo.

Deseo agradecer todo el cariño y preocupación por parte todos mis amigos y de todas aquellas personas que han acompañado a lo largo de este proceso. En particular, a Juan Dinamarca, por sus consejos y compañía en momentos difíciles.

Finalmente, deseo agradecer a mi querido Tío Elías Salamanca, el cual siempre estuvo preocupado y atento a mis necesidades. Sus consejos sobre los estudios y ánimo a seguir adelante, fueron el pilar principal para desarrollar este trabajo, el cual me permitirá obtener mi grado profesional. Este trabajo está dedicado a él. Lo quiero mucho y siempre estará en mi corazón.

ÍNDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Canales iónicos	3
2.1.1	Canales de Ca ²⁺ dependientes de potencial	4
2.1.2	Actividad y estructura de los canales de Ca ²⁺ dependientes de potencial	4
2.1.3	Clasificación de los canales de Ca ²⁺	6
2.2	Angiotensina II	7
2.2.1	Receptor de angiotensina AT-1	8
2.2.2	Internalización del receptor de angiotensina AT-1	9
2.3	Canales de Ca ²⁺ dependientes de potencial y receptores acoplados a proteína G	10
2.3.1	Angiotensina II y su efecto sobre las corrientes de Ca ²⁺ tipo L	11
	HIPOTESIS	16
	OBJETIVOS	16
3	MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1	Constructos	16
3.2	Predicción de los lazos intracelulares del canal de calcio tipo L Ca _v 1.2	16
3.3	Diseño de partidores de cada lazo intracelular	17
3.4	Amplificación	20
3.5	Ligación de pGEM T-Easy, transformación y extracción DNA plasmidial	20
3.6	Ligación a pGEX-2TKG, electroporación y secuenciación.	22
3.7	Producción y extracción de las proteínas de fusión GST	24

3.8	Análisis de interacción entre lazos intracelulares y AT1 (<i>pull-down</i>) y detección.	25
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	27
4.1	Amplificación	27
4.2	Clonación a pGEM T-Easy	30
4.3	Clonación a pGEX-2TKG	32
4.4	Producción de proteínas de fusión e interacción de los lazos con el receptor AT-1	35
5	CONCLUSIONES	43
6	RESUMEN	44
7	SUMMARY	45
8	LITERATURA CITADA	46
9	ANEXOS	52

1. INTRODUCCIÓN

En cardiomiocitos, la despolarización de la membrana plasmática causa la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L gatillando la salida de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico. Se cree que alteraciones en este proceso son causantes de distintas patologías cardiacas como la hipertrofia cardiaca, la cual se caracteriza por un engrosamiento de la pared del corazón lo que conlleva a falla cardiaca y aumento en el riesgo de ataque cardiaco.

Los canales de Ca^{2+} tipo L son complejos multiprotéicos que consisten en una subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$ que conforma el poro del canal, más las subunidades auxiliares $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$ y $\text{Ca}_v\beta$. La subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$ cardiaca, denominada $\text{Ca}_v1.2$, está compuesta por cuatro dominios homólogos (I-IV), cada uno formado por seis hélices transmembranales. Estos dominios se encuentran unidos por lazos intracelulares.

Por otro lado, angiotensina II (AngII) es una hormona que produce una serie de señales intracelulares mediante la activación de su receptor, AT1, el cual forma parte de la gran familia de receptores de membrana asociados a proteína G (GPCR), que se caracterizan por ser internalizados posterior a su activación, en un mecanismo dependiente de β -arrestina.

Es sabido que algunos canales de calcio interactúan con GPCRs, como también hay antecedentes que demuestran la interacción del receptor AT1 con canales iónicos. Sumado a esto, resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que la subunidad $\text{Ca}_v1.2$ es internalizada al estimular las células con AngII. Estos datos sugieren la existencia de una relación entre estas dos moléculas. Nuestro laboratorio demostró la formación de un macro-complejo proteico entre la subunidad $\text{Ca}_v1.2$ y el receptor AT1. Hasta el momento no se ha demostrado si la subunidad $\text{Ca}_v1.2$ interactúa directamente con el receptor AT1. Por esta razón, este trabajo tuvo como objetivo determinar si existe una interacción directa entre el receptor AT1 y la subunidad $\text{Ca}_v1.2$.

De esta manera, se llevaron a cabo distintas metodologías que permitieron cumplir este objetivo. Se generaron proteínas de fusión de cada lazo intracelular de la subunidad $Ca_v1.2$ con glutatión-S-transferasa (GST); las proteínas de fusión purificadas se unieron a glutatión sefarosa y se realizaron experimentos de precipitación por afinidad (*pull-down*) con lisados de cardiomiocitos. Finalmente se realizó la detección del receptor AT1 mediante *Western Blot*. Para llevar a cabo esto, se amplificó cada lazo intracelular de $Ca_v1.2$ por medio de PCR y los productos amplificados fueron clonados en el vector de expresión pGEX-2TKG. Posterior a la confirmación del correcto marco de lectura de las proteínas de fusión, se indujo su expresión con IPTG, en bacterias BL-21, y la purificación de las proteínas se realizó con protocolos estandarizados.

Mediante todas estas aproximaciones determinamos que el receptor AT1 interactúa con el canal, al menos con una de las regiones intracelular de la subunidad $Ca_v1.2$. De este modo, se podrán llevar a cabo estudios que evalúen el papel de este macro-complejo proteico en la hipertrofia cardiaca.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Canales iónicos.

El estudio de las proteínas de membrana es de gran importancia en el ámbito de la fisiología celular, ya que estas proteínas tienen un papel protagónico en la interacción de las células con su entorno y los efectos que causa éste en las células.

Dentro de las proteínas de membrana, se destacan los canales iónicos (Latorre, 1996), los cuales permiten el paso de iones a través de la membrana. Entre los canales iónicos podemos mencionar los canales de sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}), entre otros, dependiendo del ion que permea preferentemente. Los canales de Na^+ y K^+ participan, entre otras cosas, directamente en los procesos de despolarización y repolarización celular de células excitables, respectivamente (Latorre, 1996).

Por su parte, los canales de Ca^{2+} tienen un papel importante en la regulación del potencial de acción en células cardiacas y de señales de transducción intracelular, lo cual, en consecuencia, produce una serie de efectos que varían dependiendo de la célula en que se encuentren expresados. En neuronas, los canales de Ca^{2+} dependientes de potencial (Ca_v) cumplen el trabajo de regular la liberación de neurotransmisores, la formación y la plasticidad sináptica (Calin-Jageman y Lee, 2008), mientras que en el sistema cardiovascular, se encuentran involucrados en la contracción muscular, regulando el ingreso de Ca^{2+} a la célula y la liberación de éste desde el retículo endoplasmático al citoplasma (Chen-Izu, 2010), en un proceso conocido como liberación de calcio inducida por calcio.

2.1.1 Canales de Ca^{2+} dependientes de potencial.

Los canales de calcio dependientes de potencial están a cargo de mediar la entrada de los iones de calcio dentro de células excitables, como también, están involucradas en diversos procesos dependientes de calcio, tales como, la contracción muscular, liberación de hormonas o neurotransmisores, expresión génica, movilidad celular, división celular y muerte celular, además tienen la capacidad de prolongar el potencial de acción (Schultz *et al.*, 1993). La cantidad de Ca^{2+} transportado por los canales de calcio dependientes de potencial está estrechamente regulada. Una entrada de Ca^{2+} en exceso ha sido asociada con alteraciones en la funcionalidad de células neuronales y cardíacas, incluso llegando a la muerte célula (Yasuda *et al.*, 2003). Por otro lado, estudios realizados por Molkenin *et al.* (1998) sostienen que el Ca^{2+} intracelular tiene un papel protagónico en la señales que llevan a una hipertrofia cardíaca, enfermedad que es caracterizada por el engrosamiento del músculo del corazón el cual está asociado con la falla cardíaca, aumentando el riesgo de ataque cardíaco.

2.1.2 Actividad y estructura de los canales de Ca^{2+} dependientes de potencial.

Los canales de Ca^{2+} dependientes de potencial se encuentran conformados por un complejo proteico que comprende las subunidades $\text{Ca}_v\alpha_1$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$, $\text{Ca}_v\beta$ (figura 1), y de forma excepcional, la subunidad $\text{Ca}_v\gamma$ en el caso de musculatura esquelética (Bodi *et al.*, 2005). La subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$ es la subunidad estructural que conforma el poro y se encuentra formada por cuatro dominios homólogos (I-IV) unidos por lazos intracelulares, los que, a su vez, se encuentran constituidos por 6 segmentos transmembranales (S1-S6) (Figura 1a). Los genes que codifican para la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$ se encuentran agrupados en tres familias: Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 . Las dos primeras familias presentan las subunidades accesorias $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$, $\text{Ca}_v\beta$ y $\text{Ca}_v\gamma$ (Bodi *et al.*, 2005), mientras que la tercera familia no precisa de subunidades auxiliares para su funcionamiento. Se ha descrito que estas subunidades accesorias presentan funciones reguladoras modificando algunas propiedades de los canales de Ca^{2+} . La subunidad $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$ se encuentra

relacionada con el transporte de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$ a la membrana plasmática y con la unión de algunos fármacos, los cuales provocan diversas modificaciones en la cinética del canal (Bodi *et al.*, 2005), mientras que la subunidad $\text{Ca}_v\gamma$, participa en la dinámica de activación de la contracción muscular (Wang *et al.*, 2004; Bodi *et al.*, 2005). En cuanto a la subunidad $\text{Ca}_v\beta$, su papel principal es permitir el correcto tráfico de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$, desde el retículo endoplasmático hacia la membrana plasmática, al actuar como chaperona (Catterall, 2000; Opatowsky *et al.*, 2003; Bodi *et al.*, 2005), como también se ha descrito que ésta modifica las corrientes de Ca^{+2} mediante el cambio de sus características biofísicas (Catterall, 2000; Opatowsky *et al.*, 2003). De esta última subunidad se han descrito 4 isoformas ($\text{Ca}_v\beta_1$ - β_4), las que presentan distintos efectos sobre la cinética de inactivación de los Ca_v una vez en la membrana. Bodi *et al.* (2005) mencionan que las isoformas $\text{Ca}_v\beta_1$ y $\text{Ca}_v\beta_3$ se comportan funcionalmente de una forma muy similar, por su parte; Qin *et al.* (1998) describen que la subunidad $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ presenta dos cisteínas C (3, 4) vecinas en su segmento N terminal, a las que se les adiciona un ácido palmítico, el cual le confiere a la subunidad $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ la capacidad de anclarse a la cara citoplasmática de la membrana celular. Esto se descubrió remplazando estas cisteínas, por serinas, generando así la isoforma mutada de la subunidad $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ $c(3,4)_S$, carente de la capacidad de unir ácidos palmíticos, y modificándose de ésta forma la capacidad de anclarse a la membrana (Qin *et al.*, 1998; Opatowsky *et al.*, 2003). En cuanto a la subunidad $\text{Ca}_v\beta_4$, sólo se sabe que es expresada principalmente en cerebro (Birnbaumer *et al.*, 1998; Buraei and Yang, 2010).

Como se mencionó anteriormente, los dominios transmembranales de la subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$, se encuentran unidos intracelularmente mediante lazos (I-II, II-III y III-IV), los cuales, junto a las regiones N y C Terminal (Figura 1a), están sujetos a modificaciones dependientes de segundos mensajeros, las cuales son capaces de modular la actividad del canal de calcio tipo L (Catterall, 2000). Gomez-Ospina *et al.* (2006) reportó que la región C terminal de la subunidad $\text{Ca}_v1.2$ del canal de calcio tipo L, es translocada hacia el núcleo actuando como factor de transcripción, sugiriendo que, en condiciones elevadas de tonalidad de calcio, este factor de transcripción regula la expresión de genes específicos, como por ejemplo, disminuyendo la expresión de la misma subunidad $\text{Ca}_v\alpha_1$.

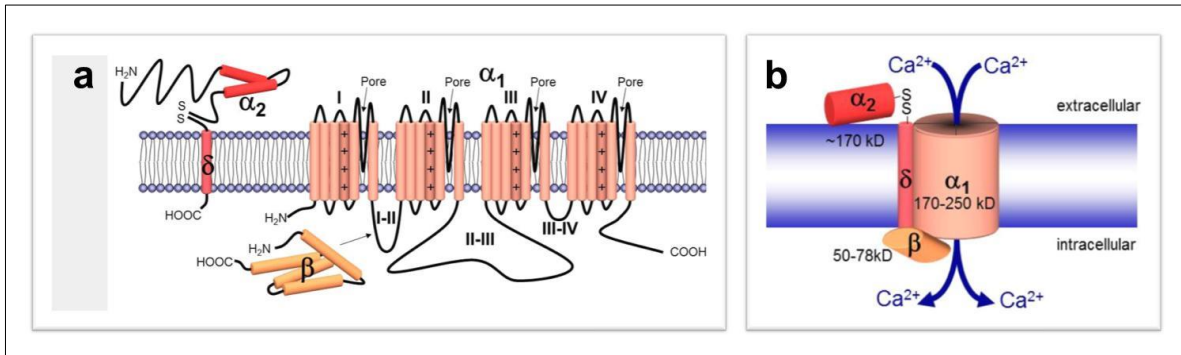


Figura 1. Representación esquemática del complejo proteico de canal de Ca²⁺ dependiente de potencial de alta activación (Ca_v1). En ambas imágenes (a y b) se observa la interacción de la subunidad Ca_vα₁ que forma el poro y las subunidades accesorias (Ca_vα₂δ₁, Ca_vβ) que poseen funciones reguladoras del canal de Ca²⁺. FUENTE: Modificado de Lehmann-Horn y Jurkat-Rott (1999)

2.1.3 Clasificación de los canales de Ca²⁺.

Los canales de Ca²⁺ dependientes de potencial (Ca_v) se pueden clasificar, en base a su potencial umbral de activación: canales de alto potencial de activación, son aquellos que se activan en torno a -20mV, y canales de bajo potencial de activación, aquellos activados a despolarizaciones mayores a -50mV (Keja y Kits, 1994). Los primeros pertenecen a la familia Ca_v1, la que incluye los canales tipo L, y a la familia Ca_v2, la cual codifica para los canales tipo P/Q, N y R. Por su parte, los canales de bajo potencial umbral de activación pertenecen a la familia Ca_v3, cuyos representantes pertenecen a los canales tipo T. Como se mencionó, las subunidades accesorias sólo están presentes en los canales de alto potencial umbral de activación. (Catterall, 2000).

Según describen Arikath y Campbell (2003) en células de músculo esquelético se expresan Ca_vα_{1S} (Ca_v1.1) y las subunidades auxiliares Ca_vγ, Ca_vα₂δ y Ca_vβ₁. De igual forma, las subunidades que se encuentran en células del músculo cardiaco, tipo celular en la cual realizaremos nuestro estudio, son la subunidad formadora de poro Ca_vα_{1C} (Ca_v1.2) y las subunidades accesorias, Ca_vα₂δ₁ y, principalmente Ca_vβ₂.

2.2 Angiotensina II.

En mamíferos, el sistema renina-angiotensina es uno de los reguladores claves de la presión sanguínea. A partir del péptido angiotensinógeno, un polipéptido de 14 aminoácidos que se origina en el hígado, es posible obtener el decapeptido angiotensina I, mediante la acción de la enzima proteolítica renina. La enzima convertidora de angiotensina (ACE), la cual se encuentra principalmente en tejido pulmonar, elimina el dipéptido terminal C (His-Leu) de la angiotensina I y da lugar al octapéptido angiotensina II, que es la especie activa más importante (Williams, 2001; Ruiz-Ortega *et al.*, 2006). Por último, a través de la acción de las aminopeptidasas se forma la angiotensina III de siete aminoácidos.

La angiotensina II (AngII) es una hormona que juega un papel crucial en fisiología y fisiopatología mediante la regulación de varios tipos celulares (Touyz y Schiffrin, 2000). Entre las funciones de AngII se pueden destacar su papel vasoconstrictor y su papel, a través de aldosterona, de la regulación del volumen sanguíneo (Gasparo, 2000). Además se ha descrito que actúa como un neuromodulador y un neurotransmisor en el sistema nervioso central y periférico (Yamada *et al.*, 2002). AngII genera una gran variedad de señales intracelulares a través de la activación de los receptores de angiotensina tipo I (AT1) y tipo (AT2) (Ji *et al.*, 1998). Miura *et al.* (2003) señalan que la mayor parte de las acciones asociadas a la hormona AngII son, principalmente, a partir de la activación del receptor AT1.

2.2.1 Receptor de angiotensina AT-1.

El receptor AT1 es responsable de la mayoría de las acciones clásicas asociadas con AngII, como el aumento de la resistencia vascular periférica y la absorción de agua y sodio. Este receptor pertenece a la familia de receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteína G (GPCR) (Ji *et al.*, 1998; Touyz y Schiffrin, 2000). En particular, este receptor se encuentra asociado a G_q. AT1 se encuentra expresado en diversos sistemas tales como el cardiovascular, renal, neuronal y endocrino donde participa en la regulación de la presión arterial, en el balance hídrico y electrolítico y, en la secreción hormonal (Gasparo, 2000).

La activación del receptor AT1, por estar unido a la proteína G_q, está ligada a la activación de fosfolipasa C (PLC) y a la posterior producción de inositol trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), los cuales a su vez activan las isoformas clásicas de la proteína kinasa C (PKC). De forma paralela a la activación de PKC, la activación de PLC provoca un descenso de los niveles de fosfoinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) en la membrana y la producción de DAG induce un aumento de los niveles de ácido araquidónico (AA) a través de la acción de la DAG lipasa (DAGL). Curiosamente, reportes recientes muestran que tanto la reducción de PIP₂ (Suh *et al.*, 2010) o la producción de AA dependiente de DAGL (Liu *et al.*, 2008) son capaces de regular los canales de calcio tipo L, mientras que el papel de PKC en la regulación del canal de calcio tipo L no ha sido totalmente demostrado (Conforti *et al.*, 1995; Ichiyanagi *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2004; Bkaily *et al.*, 2005).

2.2.2 Internalización del receptor de angiotensina AT-1.

Estudios previos han demostrado que el receptor AT1, una vez que es activado por AngII, se internaliza rápidamente (Thomas, 1999; Hunyady *et al.*, 2000). La internalización de GPCRs se lleva a cabo a través de la endocitosis de vesículas revestidas de clatrina, caveolas o vesículas no revestidas (Drake *et al.*, 2006), siendo las vesículas recubiertas de clatrina el mecanismo predominante en la internalización de GPCRs (Wolfe y Trejo, 2007). En efecto, Thomas y Qian (2003) demostraron que la inhibición de la formación de la vesícula inhibía completamente la internalización del receptor AT1.

El receptor AT1 es un GPCR clase b, caracterizados por unirse a β -arrestina 1 y 2 con igual afinidad (Sanni *et al.*, 2010). Como estas proteínas tienen un dominio de unión a clatrina (Wolfe y Trejo, 2007), la unión a AT1 permite la formación de la abertura de las vesículas recubiertas de clatrina y la posterior endocitosis del receptor.

La internalización del receptor AT-1 ocurre minutos después de la estimulación por AngII, con una tasa constante que depende de la concentración de la hormona (Gaborik y Hunyady, 2004) y a través de endosomas tempranos Rab5 (Seachrist *et al.*, 2002). Luego, algunos de los receptores internalizados son llevados a endosomas tardíos (Rab7) donde la acidificación vesicular promueve la disociación del ligando y el reciclaje del receptor. Como consecuencia, algunos receptores internalizados son blanco de lisosomas o de vesículas perinucleares de reciclaje (Seachrist *et al.*, 2002; Dale *et al.*, 2004; Gaborik y Hunyady, 2004; Drake *et al.*, 2006).

2.3 Canales de Ca^{2+} dependientes de potencial y receptores acoplados a proteína G.

La formación de macro-complejos entre diversos canales iónicos y GPCRs ha sido estudiada de forma extensa. Por ejemplo, Lee *et al.* (2002) han demostrado que el receptor de dopamina (D1_R) es capaz de regular al receptor de NMDA por medio de interacción directa. Shukla *et al.* (2010) demostraron que el receptor AT1 coimmunoprecipita con el canal TRPV4 . De igual forma, se ha demostrado que los canales de Ca^{2+} dependientes de potencial interactúan con diferentes GPCRs, entre los cuales, se ha descrito que los canales de Ca^{2+} tipo N tienen la capacidad de interactuar con los receptores D1_R (Kisilevsky *et al.*, 2008), D2_R (Kisilevsky y Zamponi, 2008), receptor de GABA_b (Tomblor *et al.*, 2006) y ORL1 (Beedle *et al.*, 2004). Igualmente, se sabe que los canales de Ca^{2+} tipo L pueden interactuar con el receptor β_2 -adrenérgico (Davare *et al.*, 2001) y el receptor de GABA_b (Park *et al.*, 2010). Curiosamente, muchas de estas interacciones llevan a una endocitosis del canal luego de la activación del receptor (Altier *et al.*, 2006; Kisilevsky *et al.*, 2008; Shukla *et al.*, 2010).

Por otro lado, en la membrana celular, la activación de los receptores produce modificaciones en la cinética de activación de los canales de calcio. Por ejemplo, la activación de receptores adrenérgicos por adrenalina activa la enzima adenilil ciclasa, aumentando la actividad de PKA que finalmente conlleva a la activación del canal de Ca^{2+} , aumentando el ingreso de Ca^{2+} a la célula y facilitando la generación y/o propagación de cascadas de activación intracelular, o en el caso de células musculares esqueléticas o cardíacas, aumentando la fuerza y el tiempo de contracción (Catterall, 2000).

Finalmente, resultados obtenidos en nuestro laboratorio demostraron la formación de un macro-complejo que tiene como protagonistas al receptor AT1 y a la subunidad $\text{Ca}_v1.2$ del canal de calcio tipo L. Esto fue probado en extractos de cardiomiocitos, cerebro de rata, y en células HEK Tsa-293 transfectadas con el receptor de angiotensina AT-1 más las subunidades del canal de calcio tipo L ($\text{Ca}_v1.2$, $\text{Ca}_v\alpha_2\delta_1$, $\text{Ca}_v\beta_{1b}$) (figura 2).

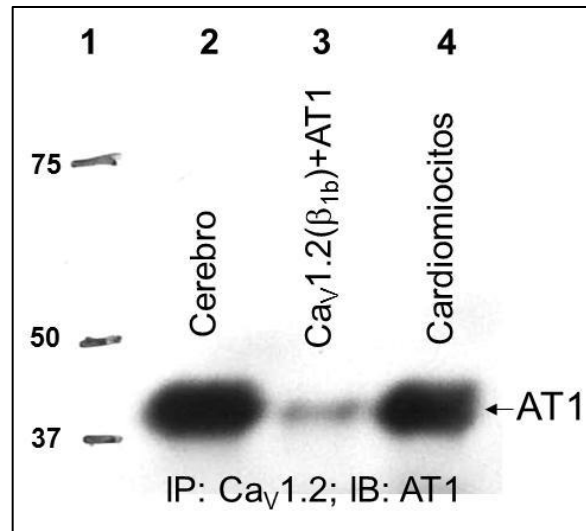


Figura 2. Interacción de la subunidad $Ca_v1.2$ y el receptor AT-1. Extractos de cerebro de rata (carril 2), de células HEK Tsa-293 (carril 3) transfectadas con el receptor de angiotensina AT-1 más las subunidades del canal de calcio tipo-L ($Ca_v1.2$, $Ca_v\alpha_2\delta_1$, $Ca_v\beta_{1b}$) y de cardiomiocitos de ratas neonatas (carril 4) fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo policlonal de conejo contra la subunidad $Ca_v1.2$ del canal de calcio tipo L. Los tres precipitados fueron inmunoelectrotransferidos en un gel 10% poliacrilamida y posteriormente, el receptor AT1 fue detectado en el inmunoprecipitado con un anticuerpo policlonal de conejo anti-AT1 (n=6). Fuente: Datos no publicados Hermosilla, T.

2.3.1 Angiotensina II y su efecto sobre las corrientes de Ca^{2+} tipo L.

Se ha observado que la estimulación de los receptores AT1 por AngII induce modificaciones en las corrientes de Ca^{+2} en las células. Estas modificaciones inducidas por AngII varían dependiendo del tejido en estudio. Por ejemplo, en las células de la musculatura lisa arterial, AngII produce la activación de los canales de Ca^{+2} tipo L, con el consiguiente aumento del ingreso de Ca^{+2} (Hayabuchi *et al.*, 2001) mientras que, tanto en las células glomerulosas (Maturana *et al.*, 1999) como en neuronas del ganglio submandibular (Yamada *et al.*, 2002), AngII disminuye las corrientes de Ca^{+2} , ya sea de canales de alto como de bajo potencial de activación (Yamada *et al.*, 2002).

En datos obtenidos en nuestro laboratorio, se ha observado que las corrientes de Ca^{+2} en cardiomiocitos de rata disminuyen al ser tratados con AngII (Hermosilla *et al.*, 2011). Dado que las corrientes de ingreso de Ca^{+2} son dependientes de 3 factores: 1) la probabilidad de estado abierto del canal (P_o), 2) la corriente unitaria del canal (i) y 3) el número total de canales (n), siendo la corriente total (I) igual a: $I = P_o i n$, una disminución en la corriente puede ser producto de la disminución de uno o varios de los factores mencionados.

Diversos trabajos científicos han documentado la internalización de canales de Ca^{+2} asociados a receptores de membrana, como es el caso de la internalización de la subunidad $\text{Ca}_v1.2$ en neuronas debido a la estimulación de glutamato (Green *et al.*, 2007; Tsuruta *et al.*, 2009). Otros trabajos además han reportado la internalización de canales Ca^{+2} tipo N en neuronas del ganglio de la raíz dorsal al estimularse con opioides (Walwyn *et al.*, 2007). A partir de los antecedentes mencionados, nuestro laboratorio se encargó de dilucidar si AngII favorece la internalización de la subunidad $\text{Ca}_v1.2$ de los canales de calcio tipo L.

La tesis de magíster de Cristian Moreno (2012), llevada a cabo con anterioridad en nuestro laboratorio, demostró que el receptor AT1, al ser activado por AngII, provoca la internalización de la subunidad $\text{Ca}_v1.2$ de los canales de calcio tipo L, esto dependiendo de la subunidad accesoria $\text{Ca}_v\beta$ que se exprese. En cardiomiocitos, existen cinco variantes de inicio alternativo de la transcripción de la subunidad $\text{Ca}_v\beta_2$. Este trabajo se enfocó en dos de ellas: $\text{Ca}_v\beta_{2a}$, capaz de impedir la internalización del canal gracias a la presencia de los ácidos palmíticos asociados a dos cisteínas, y la subunidad $\text{Ca}_v\beta_{2b}$, la cual permite la internalización de la subunidad $\text{Ca}_v1.2$ de los canales de calcio tipo L (Figura 3).

Adicionalmente, resultados en nuestro laboratorio evidenciaron que la formación del macro-complejo entre el receptor AT1 y la subunidad $\text{Ca}_v1.2$ de los canales de calcio tipo L (Figura 3), no depende de la subunidad accesoria $\text{Ca}_v\beta$ expresada (Figura 4). Estos datos sugieren que la modulación de las corrientes de calcio del canal $\text{Ca}_v1.2$ por angiotensina II posiblemente se deba a la formación de este macro-complejo, el cual provocaría la inhibición de la subunidad

Ca_v1.2 mediante la interacción directa con el receptor AT-1. De esta manera, encontrar la región específica de la subunidad Ca_v1.2 que interactúa con el receptor AT1 es de vital importancia, ya que permitirá realizar estudios que podrán demostrar el efecto que produciría una interrupción de esta interacción sobre la modulación de las corrientes de calcio, así como también, el efecto que ésta pueda provocar en la generación de la hipertrofia cardíaca y en los procesos fisiológicos descritos.

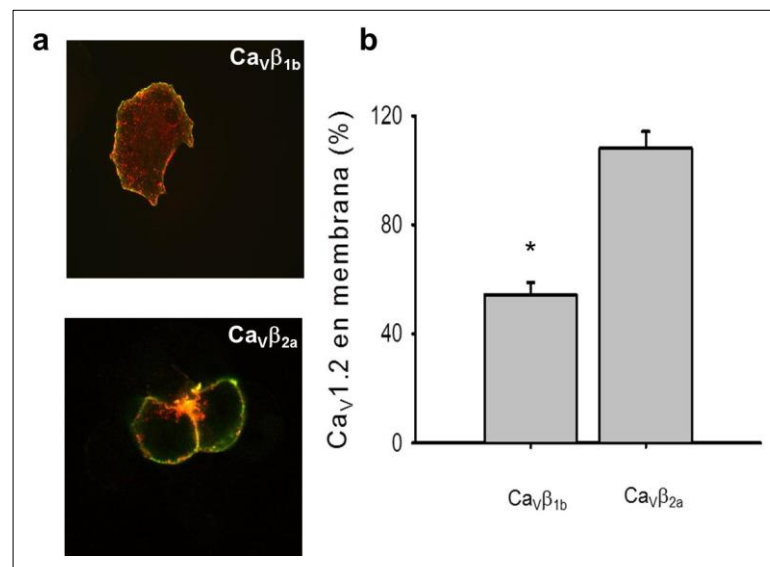


Figura 3. La internalización de la subunidad Ca_v1.2 en células estimuladas con AngII depende de la subunidad Ca_vβ. (a) Imagen representativa de la distribución de Ca_v1.2-HA, expresado en células HEK estimuladas con 1 μM de AngII (37°C, 30 min.) que sobre-expresan el receptor AT1 y Ca_v1.2-HA (+ Ca_vα₂δ₁) más Ca_vβ_{1b} (arriba) o Ca_vβ_{2a} (abajo). (b) Gráfico resumen del promedio (± sem) del porcentaje de Ca_v1.2 en la membrana, en células HEK incubadas con 1 mM de AngII (37°C, 30 min.) (n>12). El gráfico se obtuvo a partir de la normalización de los datos de internalización del grupo control (s/AngII). *, p<0.05 ANOVA. Fuente: Ambas imágenes y el gráfico son adaptados de Moreno (2012).

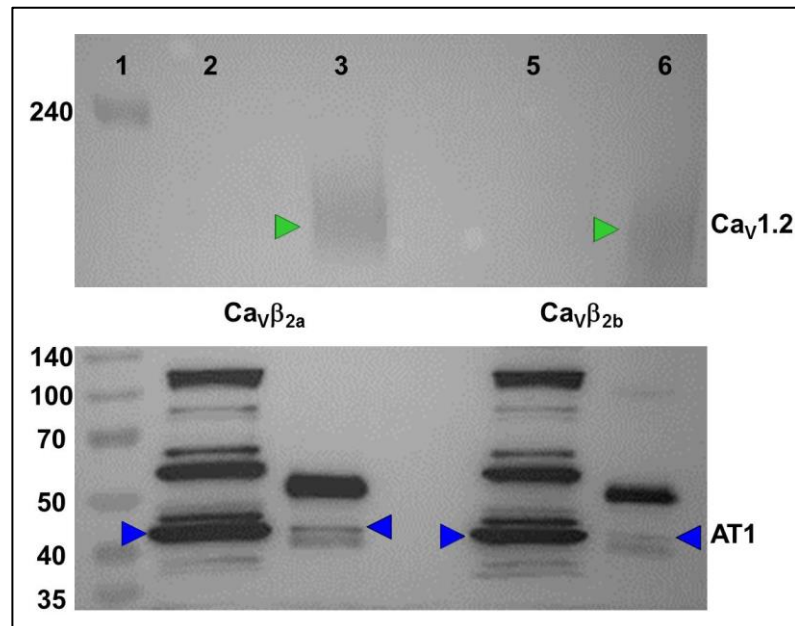


Figura 4. El macro-complejo $Ca_v1.2/AT1$ no depende de la subunidad auxiliar $Ca_v\beta$. Extractos de cardiomiocitos de rata neonata infectados con adenovirus recombinantes conteniendo el ADN de la subunidad $Ca_v\beta_{2a}$ (carril 2) o $Ca_v\beta_{2b}$ (carril 5) fueron inmunoprecipitados con un anticuerpo policlonal contra la subunidad $Ca_v1.2$ del canal de calcio tipo L (carril 3, subunidad $Ca_v\beta_{2a}$ y carril 6, subunidad $Ca_v\beta_{2b}$). Los precipitados fueron inmunoelctrotransferidos en un gel 10% poliacrilamida; la membrana resultante fue cortada y la parte superior tratada con un anticuerpo policlonal contra $Ca_v1.2$ (arriba) mientras que la parte inferior fue tratada con un anticuerpo policlonal contra AT1 (abajo) (n=3). Los triángulos señalan las bandas esperadas para la subunidad $Ca_v1.2$ (verde) o el receptor AT1 (azul). Fuente: Resultados no publicados Hermosilla, T.

HIPÓTESIS

A partir de los antecedentes expuestos anteriormente surgió la hipótesis de este trabajo, la cual propone que **el receptor de angiotensina tipo 1, AT1, interactúa directamente con algún lazo(s) intracelular y/o región terminal de la subunidad $Ca_v\alpha_1$ de los canales de calcio tipo L cardiaco, $Ca_v1.2$, formando así un macro-complejo proteico.**

OBJETIVOS

Objetivo general.

Determinar si existe una interacción directa entre el receptor AT1 y la subunidad $Ca_v1.2$.

Objetivo específico.

- 1.- Amplificar los lazos que unen los dominios de la subunidad $Ca_v\alpha_1$ como sus regiones N terminal y C terminal.
- 2.- Generar proteínas de fusión con GST y los lazos y regiones terminales de la subunidad $Ca_v\alpha_1$.
- 3.- Extraer y purificar las proteínas de fusión.
- 4.- Realizar la precipitación por afinidad (*pull-down*) con AT1.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos que se describirán a continuación fueron realizados en el laboratorio de Fisiopatología Molecular, que pertenece a la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

3.1 Constructos.

Los estudios se realizaron con cDNA del canal de calcio tipo L, $Ca_v1.2$, de corazón de *Oryctolagus cuniculus*, dona dos por el Dr. Snutch. El cDNA que codifica al receptor de angiotensina 1, AT1, se obtuvo de la Universidad de Misuri-Rolla. El plasmido pGEM-T easy se obtuvo de Promega. El vector pGEX-2TKG fue donado por la Dra. Marcelain.

3.2 Predicción de los lazos intracelulares del canal de calcio tipo L $Ca_v1.2$.

Los lazos se obtuvieron mediante el análisis de los perfiles de hidrofobicidad del canal de calcio tipo L, $Ca_v1.2$, de *Oryctolagus cuniculus*. La secuencia del canal se extrajo desde GenBank NCBI (número de acceso X15539). Para obtener los perfiles de hidrofobicidad se realizó un análisis web (<http://www.ch.embnet.org>) de las regiones transmembranales con la secuencia completa del canal (ver anexo 3). La predicción de los lazos intracelulares se llevó a cabo calculando los aminoácidos que permiten la unión entre los dominios I al IV (ver figura 5a) del canal y de las regiones terminales (N terminal, I-II, II-III, III-IV, C terminal), siguiendo la dirección y orden de los aminoácidos obtenidos del análisis web. Luego, mediante el uso del software Vector NTI, se tradujo la secuencia nucleotídica del canal y se marcó cada lazo intracelular en el mapa proteico del canal (Figura 5a).

Para obtener las secuencias nucleotídicas de los lazos intracelulares, se buscó cada lazo en el mapa nucleotídico del canal (Figura 5b) según el orden de cada aminoácido y número de nucleótidos.

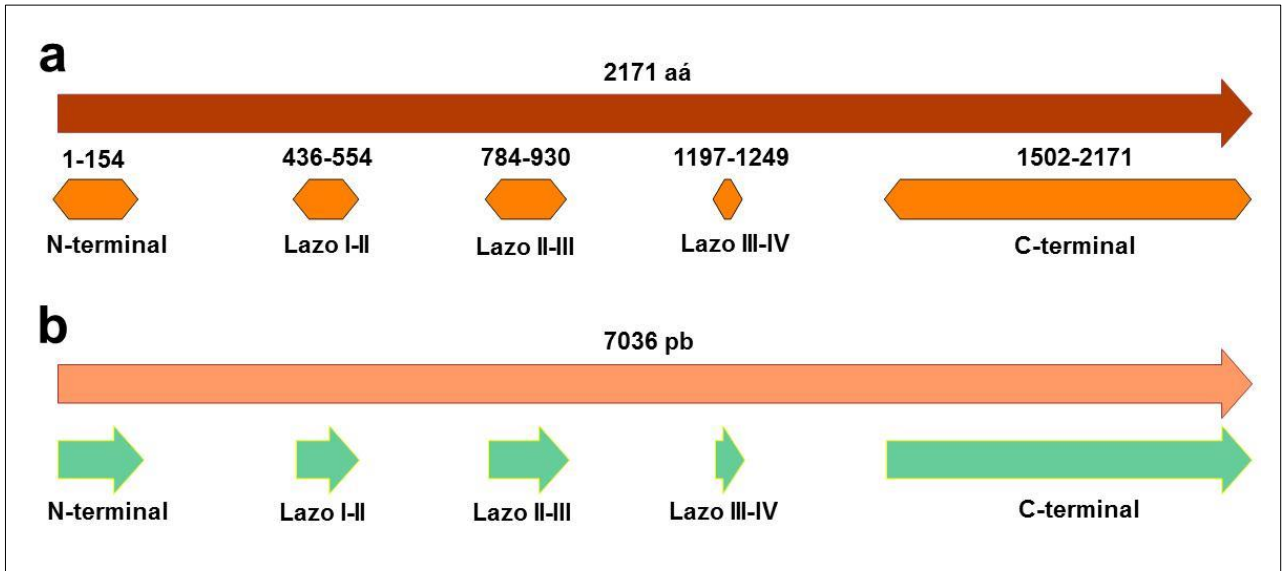


Figura 5. (a) Mapa proteico y (b) mapa nucleotídico del canal de calcio tipo L, Ca_v1.2, de *Oryctolagus cuniculus*.

3.3 Diseño de partidores de cada lazo intracelular.

Antes de realizar el diseño de los partidores mediante el uso del software Vector NTI se adicionaron sitios de restricción en las regiones 5' y 3' de cada lazo intracelular. Los sitios base que se utilizaron fueron EcoRI y HindIII; en el caso de las secuencias que presentan estos sitios en su región codificante se utilizó XbaI o SalI (todas obtenidas de NEB). (Figura 6).

Se diseñaron cebadores sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*) para cada uno de los lazos, los cuales incluyeron aproximadamente 20 nucleótidos de la secuencia codificante más los sitios de restricción adicionales (Cuadro 1)

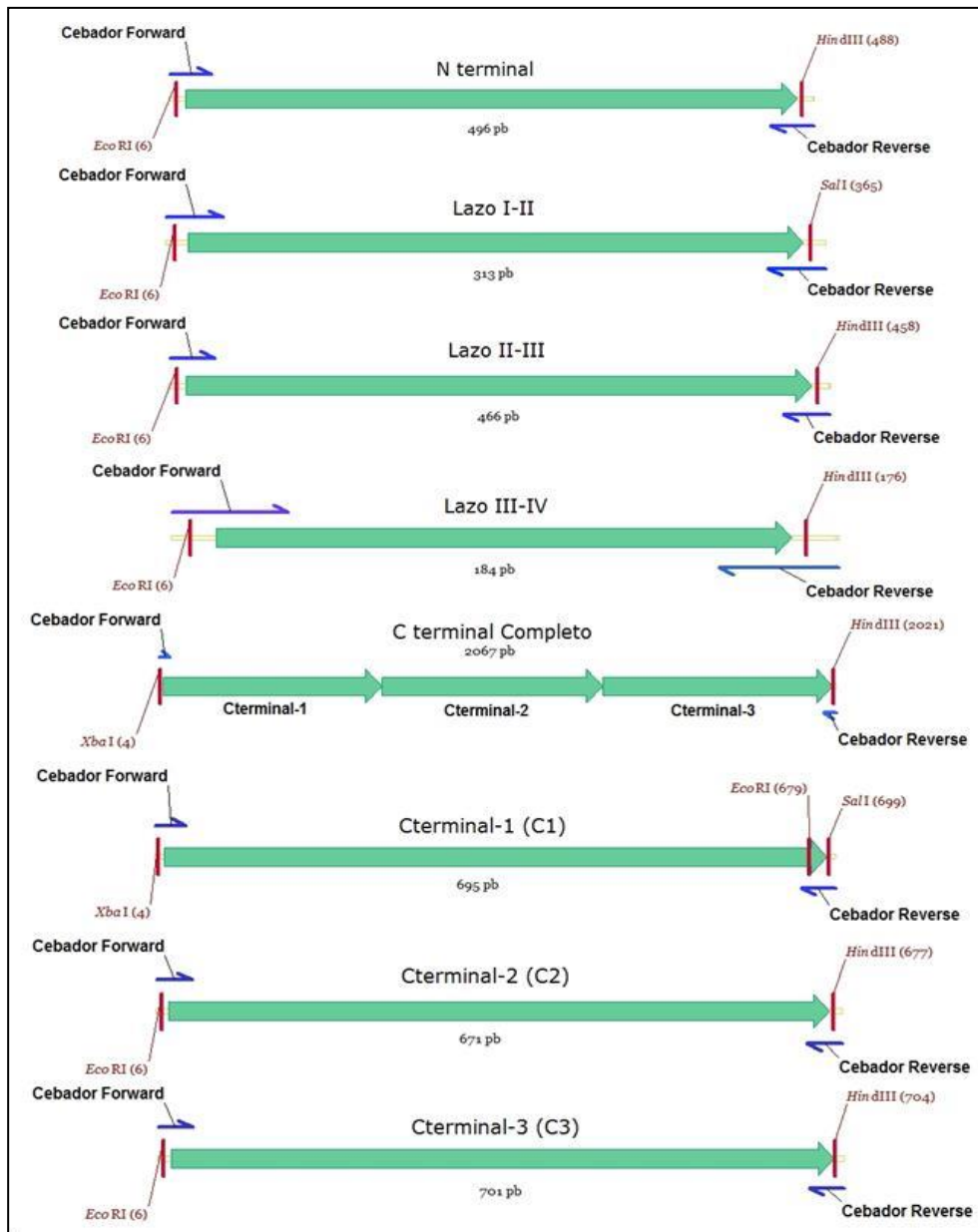


Figura 6. Mapa de cada lazo y regiones terminales con los sitios de restricción y partidores.

Cuadro 1. Secuencia de los partidores diseñados para la amplificación de los lazos intracelulares

Lazos	Partidor	Secuencia (5'-3')	Largo bs
N terminal	Fw	ATATGAATTCGCATGCTTCGAGCCCTTGTTCA	32 nt
	Rv	TCGAGTGGAAACCATTTGAATGAAAGCTTGCGC	33 nt
I-II	Fw	ATATGAATTCGCTTGAGCGGAGAGTTTTCCAA	32 nt
	Rv	GCAGGAGAAAGTGCCGCGCATGAGTCGACGCGC	33 nt
II-III	Fw	ATATGAATTCGCGACAACCTGGCTGATGCTGA	32 nt
	Rv	ACCGTATCGTCAACGACACGTGAAAGCTTGCGC	33 nt
III-IV	Fw	ATATGAATTCGCGTCACCTTCCAGGAGCAGGG	32 nt
	Rv	GGTACGTGGTCAACTCCACCTGAAAGCTTGCGC	33 nt
C terminal	Fw	CGTCTAGACGTAGCTGTTATCATGGACAACCTT	32 nt
	Rv	ACCGCAGGGCCGGCGTCAGCAGCCTGAAGCTTGCGC	36 nt
Cterminal- 1	Fw	CGTCTAGACGTAGCTGTTATCATGGACAACCTT	32 nt
	Rv	TCACTAGTGAATTCGCGGCCCGCCTGCAGGTCGACTC	36 nt
Cterminal- 2	Fw	ATATGAATTCGCGAAGACGACATCTTCAGGAGGGC	35 nt
	Rv	TAAAGCGACAAAAGGATCAAGGGTGAAAGCTTGCGC	36 nt
Cterminal- 3	Fw	ATATGAATTCGCGGAGACATCTCTCAGAAGACAGT	35 nt
	Rv	ACCGCAGGGCCGGCGTCAGCAGCCTGAAGCTTGCGC	36 nt

***nt**: nucleótidos ***Fw**: partidor *forward* ***Rv**: partidor *reverse*

3.4 Amplificación.

La amplificación de los lazos se realizó mediante una PCR convencional. Se utilizó en cada reacción 5 µl de cDNA (10 ng/µl) del canal de calcio tipo L, Ca_v1.2, como templado, en un volumen total de 25 µl que contenían 2.5 µl Buffer *Taq* con KCl (10x), 1.5 µl de MgCl₂ (25mM), 0,5 dNTPS (10mM), 1 µl del partidor *forward* (10mM), 1 µl del partidor *reverse* (10mM) y 0.5 µl de *Taq* DNA polimerasa (5U/ µl) obtenida de Promega. Se realizaron dos protocolos de amplificación distintos. Para los lazos más pequeños (N-terminal, I-II, II-III, III-IV) se realizó un protocolo con una desnaturalización inicial a 95°C por 2 minutos (min.), seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos (seg.), hibridación a 52°C durante 30 seg. y una extensión a 72°C durante 30 seg. Para la región C-terminal se realizó una PCR con una desnaturalización inicial a 95°C por 2 min., seguida por 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 seg., hibridación a 55°C durante 1 min. y una extensión a 72°C durante 1 min. Los productos de PCR fueron identificados por electroforesis en gel de agarosa 0.8%.

3.5 Ligación a pGEM T-Easy, transformación y extracción DNA plasmidial.

Los productos de PCR se ligaron a pGEM T-Easy (ver anexo 1) siguiendo el manual del vector. La cantidad de inserto que se ligó se calculó según la siguiente formula:

$$\frac{\text{ng de vector} \times \text{kb tamaño inserto}}{\text{kb tamaño vector}} \times \text{inserto:vector (proporción molar)} = \text{ng de inserto}$$

La cantidad aproximada de producto de PCR se determinó por comparación visual entre la señal en el gel de agarosa con el estándar GeneRuler 1kb (Fermenta). La proporción molar que se utilizó fue de 3:1 (inserto:vector). El volumen total de la reacción fue de 10 μ l, que incluía 5 μ l de buffer Rapid Ligation (2x), 1 μ l de enzima T4 DNA ligasa (3U/ μ l), 1 μ l de pGEMT-easy (50 ng/ μ l), y el volumen de inserto que corresponde a la proporción mencionada. La ligación se dejó 15 min. a temperatura ambiente, luego se incubó a 4°C por 16 hrs (O/N).

Para la transformación se utilizaron bacterias quimiocompetentes Max Efficiency DH5 α (Life Technologies), utilizándose una modificación del protocolo original. Debido a que el volumen del producto de ligación no debe superar el 10% del volumen de las bacterias que serán transformadas, se transformaron 20 μ l de bacterias quimiocompetentes con 2 μ l de producto de ligación, las cuales se agregaron a tubos falcon de 15 ml que se incubaron en hielo por 20 min. Posteriormente se expusieron en un baño termoregulado a 42°C por 45 seg., se adicionó 450 μ l de medio Luria-Bertoni (LB) (10 g triptona, 5 g extracto levadura, 5 g NaCl para 1 L), y se incubaron a 37°C por 90 min. para permitir la recuperación de las bacterias. Luego se sembraron en placas de LB agar con ampicilina (100 μ g/ml) y se incubaron a 37°C por 16 horas. Se tomaron colonias al azar y se inocularon en tubos falcon con 4 ml de medio LB con ampicilina los que se incubaron en agitación (300 rpm) a 37°C por 16 horas.

Para la extracción del DNA plasmidial clonado se realizó un protocolo sin columnas. Los tubos con bacterias con 4 ml de cultivo se centrifugaron a aproximadamente 2.700 rcf por 15 min., las bacterias fueron resuspendidas en 300 μ l de buffer de resuspensión (50mM de Tris-HCl pH 7.5, 10mM EDTA y 200 μ g/ml de RNAsa) y traspasadas a tubos eppendorf de 1.5 ml. Luego se les agregó 300 μ l buffer de lisis (0,2mM NaOH y SDS 1%), se invirtió el contenido de cada tubo 5-6 veces cuidadosamente y se dejaron a temperatura ambiente por 5 min. Pasado este tiempo se adicionaron 300 μ l de buffer de neutralización (KCH₃COOH pH 5.0) y se invirtieron nuevamente los tubos 5-6 veces para luego ser centrifugados a aproximadamente 15.000 rcf por 10 min. Los sobrenadantes se rescataron y se les adicionó 600 μ l de isopropanol, incubándose la

mezcla a -20°C por 10 min. Luego los tubos se centrifugaron a 20.817 rcf por 18 min. Se descartaron los sobrenadantes, los pellets se dejaron secar unos minutos y luego, se les adicionó 100 μl de alcohol etílico al 70%, para luego, centrifugarlos a aproximadamente 7.000 rcf por 8 minutos. Nuevamente los sobrenadantes se descartaron y se dejaron secar los tubos a 37°C por 15 min. Cada pellet se resuspendió en 20 μl H_2O , calidad HPLC.

Se cortó 1 μl de cada DNA extraído con 0,5 μl de EcoRI, 1,5 μl de buffer específico de la enzima, en un volumen total de 15 μl , la mezcla se incubó en un baño termoregulado a 37°C por 90 min. De esta forma, se verificó la presencia del inserto en cada constructo. Los cortes se identificaron mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa al 0,8%.

3.6 Ligación a pGEX-2TKG, electroporación y secuenciación.

Se utilizaron 2 μl de los DNAs extraídos para ser cortados con 0,3 μl de enzimas correspondientes a los sitios de restricción agregados que flanquean a la secuencia de cada uno de los lazos. En esta reacción se utilizó 1,5 μl del buffer que permitiera que las dos enzimas actuaran con una eficiencia mayor al 75%, 1 μl de BSA (10 mg/ml) si la reacción lo requería, en un volumen total de 15 μl . Se incubó en un baño termoregulado a 37°C por 90 min. Este mismo proceso se realizó con el vector pGEX-2TKG (ver anexo 2) con cada una de las combinaciones de enzimas. Los cortes fueron identificados mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa al 0,8%. Para obtener el vector cortado y los insertos desde el gel, se cortó la banda del gel y el DNA fue purificado con el kit “QIAquick Gel Extracción” (QIAGEN).

Se procedió a ligar el vector pGEX-2TKG con cada uno de los cortes purificados del gel correspondientes a los distintos lazos intracelulares. La ligación se llevo a cabo de la forma descrita anteriormente, en una proporción 3:1 (inserto:vector).

La electroporación se realizó en un electroporador GenePulser Xcell (BioRad). Las bacterias que se utilizaron para la transformación fueron *E. coli* BL-21 (DE3), las cuales fueron donadas por el laboratorio del Dr. Edio Maldonado. Estas bacterias se transformaron con 2.5 μ l del producto de ligación, se les aplicó un pulso de 2.5 kV, el cual venía configurado previamente para la electroporación de *E. coli* en cubetas de 2 mm, con una capacitancia de 25 μ F y una resistencia de 200 ohm. Luego del pulso, rápidamente se agregó 1 ml de medio LB, y se traspasó las bacterias a un tubo falcon de 15 ml, los cuales se incubaron a 37°C por 90 min. en agitación (300 rpm). Luego se sembraron en placas de LB agar con Ampicilina y se incubaron a 37°C por 16 horas. Se tomaron colonias al azar y se inocularon en tubos falcon con 5 ml de medio LB con ampicilina, las que se incubaron en agitación (300 rpm) a 37°C por 16 horas. Se realizaron stock de glicerol para cada constructo, tomando 500 μ l de las bacterias transformadas y se les adicionó 500 μ l de glicerol 50% y se guardó a -80°C. La extracción del DNA plasmidial se realizó siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito. El DNA plasmidial extraído se digirió con las enzimas que flanquean a cada secuencia de los lazos, para verificar si la ligación y transformación fue exitosa. El corte se identificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

Para confirmar si el marco de lectura estaba correcto, las muestras se enviaron a los laboratorios de Macrogen en Corea para la secuenciación de cada uno de los lazos ligados al vector pGEX-2TKG, en el cual se utilizaron los partidores para secuenciación 5' pGEX y 3' pGEX (partidores universales abastecidos por Macrogen). Una vez secuenciados, se realizó la lectura de las secuencias mediante el programa Chromas Lite, y luego, a través del uso del software AlignX, fueron comparadas, mediante un alineamiento múltiple, con las secuencias de las regiones intracelulares y GST obtenidas de la base de datos (anteriormente mencionada). Obtenido el marco de lectura, se verificó, mediante el programa Vector NTI, si el marco era el correcto para codificar la proteína de fusión.

3.7 Producción y extracción de las proteínas de fusión GST.

La producción de las proteínas de fusión GST se basó en una versión a escala del protocolo utilizado en el laboratorio del Dr. Naguchi (<http://eishinoguchi.com/GSTfusion.pdf>). Con un haza de siembra se tomó una pequeña alícuota de cada uno de los stocks de glicerol de constructos, anteriormente mencionados, y se realizó una siembra en estrías en placas de LB con ampicilina. Se dejaron a 37°C por 16 horas. De cada placa se tomó una sola colonia y se inoculó en un tubo falcon de 15 ml con 2 ml de LB con ampicilina el que se incubó a 25°C en agitación (300 rpm) O/N. Se tomaron 200 µl del cultivo y se diluyeron en 20 ml de LB con ampicilina, se incubaron a 30°C en agitación (300 rpm) hasta que alcanzó una densidad óptica (OD) a 600 nanómetros (nm) de aproximadamente 0.5-0.6. Luego, para realizar la inducción, se adicionó a cada cultivo Isopropil-β-D-tiogalactosidasa (IPTG, obtenido en Life Technologies) para una concentración final de 670 µM, y se incubó a 30°C en agitación (300 rpm) por 2 horas. Posteriormente, se centrifugaron los cultivos a aproximadamente 1.900 rcf por 30 min. a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes y se realizó un lavado resuspendiendo las bacterias en 4 ml de TBS (1x) y se centrifugó nuevamente a aproximadamente 2,700 rcf por 15 min. Este paso se repitió dos veces. Finalmente las bacterias se resuspendieron en 4 ml buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glicerol, 0,25% tween 20, 1 mM DTT, 0.2 mM pAPMSF) enfriado a 4°C.

Para lisar las bacterias se realizó una sonicación con el equipo Sonic Ruptor 250. Se les aplicó 5 pulsos de 5 segundos de potencia al 40%. Los 4 ml lisados se distribuyen en 4 tubos eppendorff con 1 ml del lisado. Los tubos se centrifugaron a aproximadamente 18.000 rcf por 5 min. Se rescató el sobrenadante que se guardaron a -80°C.

3.8 Análisis de interacción entre lazos intracelulares y AT1 (*pull-down*) y detección.

Para purificar la proteína de fusión GST se utilizaron perlas Glutation Sefarosa 4B (concentración de 75%) obtenidas de General Electric (GE) (n° catálogo 17-0757-01), las cuales se lavaron con PBS frío (1x), y se dejaron a una concentración de 50%. A cada tubo con 1 ml de muestra de proteína (total) se les adicionó 40 μ l de las perlas, previamente lavadas y diluidas. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente, en rotación por 30 min. Posteriormente, se centrifugaron a 500g por 5 min. y se les eliminó el sobrenadante. Luego se realizaron dos lavados con 200 μ l de PBS (1X) y se centrifugó a 500g por 5 min. Los sobrenadantes se descartaron.

Para realizar el análisis de interacción entre los lazos y AT1, a las proteínas unidas a las perlas se les adicionó 60 μ l (100 μ g) de extracto celular de cardiomiocitos extraídos de ratas neonatas de 2 días (proporcionadas por el Bioterio de la Facultad de química y Farmacia de la Universidad de Chile, los extractos fueron fabricados en nuestro laboratorio, de acuerdo a las indicaciones de la comisión de bioética local) y 500 μ l de buffer de lisis. La mezcla se incubó a 4°C en rotación O/N y luego, se centrifugaron a aproximadamente 3.900 rcf por 1 min. Los sobrenadantes se descartaron, los pellets se lavaron tres veces con 500 μ l de PBS (1X), y nuevamente se centrifugaron a 3.900 rcf por 1 min. Los sobrenadantes se eliminaron y las perlas se resuspendieron en 50 μ l de buffer de carga 1X (con β -mercaptoetanol) y se hirvieron a 100°C por 5 min. Posteriormente, se realizó un ensayo de electroforesis en gel de poliacrilamida para detectar las proteínas GST y AT1, de forma paralela, utilizando como control positivo extractos de cardiomiocitos y como control negativo, GST (sin lazos). Para ello, se hicieron dos geles de bis-acrilamida a una concentración de 10%, las muestras se cargaron en los respectivos carriles y se corrieron a 60 Volts (V) inicialmente, aumentándose el voltaje a 100V al traspasar el frente desde la zona del gel concentrador hacia la zona del gel separador. Luego, se realizó la transferencia de las proteínas de los geles a membranas de nitrocelulosa a 100V por 75 min. y a 4°C. Terminada la transferencia, las membranas se tiñeron con una solución de rojo ponceau al 0.5% por 5 min. para visualizar las proteínas fijadas. Luego, se realizaron lavados con PBS 1X para retirar la solución de rojo ponceau, y se incubaron con buffer de bloqueo al 5% (leche 5%, PBS 1X, tween 20 0,1%) a 4°C toda la noche. Posteriormente, una de las membranas se incubó

con un anticuerpo anti-GST monoclonal de ratón, obtenido en AbCAM (n° catálogo 21283) diluido en buffer de bloqueo en una proporción de 1:5000, mientras que la otra membrana se incubó con un anticuerpo anti-AT1 policlonal de conejo, obtenido en Pierce (n° catálogo PA5-20812), diluido en una proporción de 1:500. Ambas incubaciones se realizaron a temperatura ambiente por 60 min. en agitador horizontal. Terminada la incubación se realizaron 3 lavados con PBS-Tween (0.1 %), y luego, ambos fragmentos de membrana se incubaron a temperatura ambiente por 60 min. con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rabanito, en el caso de GST, anti-ratón obtenido en BIO-RAD (n° catalogo 170-6516), y para AT1, anti-conejo obtenido también en BIO-RAD (n° catalogo 170-6515), ambos fueron diluidos en una proporción de 1:3000. Al finalizar, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,1%. Para detectar ambas proteínas, los fragmentos de membrana se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. con 1 ml de sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (500 µl de solución estable de peroxidasa, 500 µl de luminol) adquirido en Thermo Scientific (n° catalogo 34080). Para realizar la detección, parte de las membranas obtenidas se colocaron en un Fotodocumentador CliNX y otras se expusieron a películas sensibles a quimioluminiscencia, por distintos tiempos de exposición.

4. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Amplificación.

Los lazos intracelulares inter dominios y las regiones terminales del canal de calcio tipo L, $Ca_v1.2$, se amplificaron utilizando cebadores diseñados específicamente para cada región mencionada (los detalles de las temperaturas usadas y los partidores se encuentran en la sección de métodos). Debido a que la región C terminal tiene un tamaño de 2029 pb, la cual es considerablemente más larga que las demás regiones en estudio, se diseñaron cebadores para dividir en tres partes (aproximadamente iguales) la región C terminal, y de esta forma, estudiar de mejor manera la interacción con el receptor de angiotensina AT-1, a través de la identificación de la zona específica en la cual éste se une. Los resultados de las amplificaciones de los lazos y regiones terminales se pueden observar en las corridas electroforéticas mostradas en la Figura 7. Al comparar el tamaño de los productos de PCR (obtenidos comparando el peso molecular con el estándar) con el tamaño de las secuencias de cada uno de las regiones intracelulares (Cuadro 2), es posible afirmar que los productos obtenidos de la amplificación corresponden a las regiones intracelulares predichas. Los productos C1 y C2 presentaron productos no específicos, por lo que las bandas fueron purificadas antes de realizar la posterior ligación al vector de clonamiento.

Cuadro 2. Largo de la secuencia de nucleótidos de las regiones amplificadas y predicción del peso molecular de las proteínas de fusión (regiones + GST). El largo de las secuencias de nucleótidos obtenidas de la secuenciación de los lazos clonados al vector de expresión pGEX-2TKG, exceptuando la región C terminal completa la cual no fue secuenciada. El peso molecular de las proteínas de fusión se obtuvo mediante la creación de los constructos en el software Vector NTI, la predicción se obtuvo a través del uso de un algoritmo incorporado en el programa.

Lazos	Largo Secuencia	PM Proteína de Fusión
GST	-	26.0 kD
N terminal	496 pb	43.9 kD
I-II	373 pb	40.8 kD
II-III	466 pb	43.7 kD
III-IV	184 pb	33.7 kD
C terminal	2067 pb*	101.1 kD
Cterminal-1	695 pb	52.0 kD
Cterminal-2	671 pb	51.3 kD
Cterminal-3	701 pb	52 .0kD

pb: pares de base **kD:** kilodaltons **PM:** peso molecular *****: no secuenciado

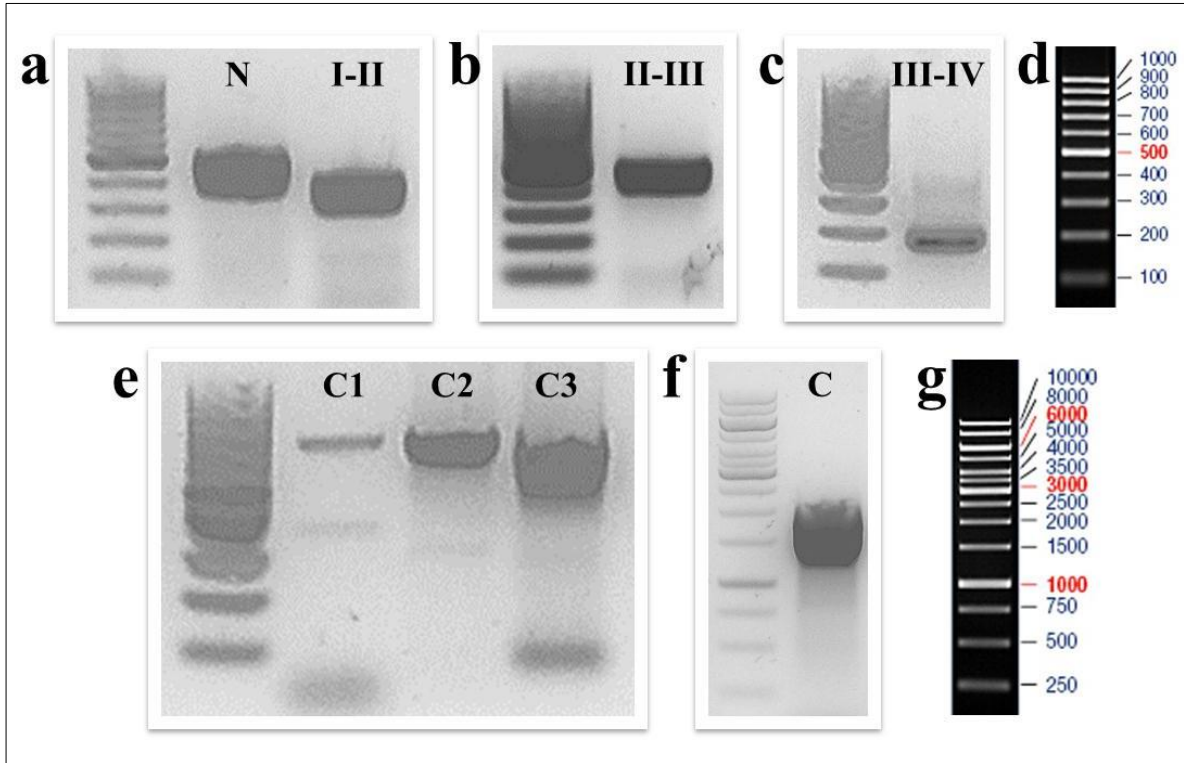


Figura 7. Productos de PCR de los lazos y regiones terminales de la subunidad alfa del canal de calcio tipo L, corridos en un gel 0.8% agarosa. (a) Carril 1 corresponde al estándar de 100 pb, carril 2 corresponde a la amplificación de la región N terminal y carril 3 a la amplificación del lazo I-II. (b) Carril 1 corresponde al estándar de 100 pb y carril 2 a la amplificación del lazo II-III. (c) Carril 1 corresponde al estándar 100 pb y carril 2 a el lazo III-IV. (d) Estándar de 100 pb GeneRuler. (e) Carril 1 corresponde a estándar de 100 pb, carril 2 región C terminal sección 1 (C1), carril 3 región C terminal sección 2 (C2) y carril 4 región C terminal sección 3 (C3). (f) Carril uno corresponde a estándar de 1 kb y carril 2 a la región C terminal completa. (g) Estándar de 1 kb GeneRuler.

4.2 Clonación a pGEM T-Easy.

Previo a la clonación de las regiones en estudio en el vector de expresión pGEX-2TKG para generar las proteínas de fusión, cada región intracelular fue clonada en pGEM T-Easy. Esta estrategia se utilizó para contar con suficiente material a estudiar. Una vez que la transformación en bacterias fue hecha, se procedió a cortar con la enzima EcoRI, cuyo sitio flanquea la región que fue insertada, para verificar las colonias positivas que presentaban el vector con las regiones de interés. Una vez obtenidas las colonias positivas se procedió a cortar el DNA extraído con enzimas específicas para los sitios de restricción adicionados a los extremos de las regiones (terminales y lazos), generando entonces las regiones para la ligación al vector de expresión. Como se observan en la Figura 8, la intensidad de las bandas es alta debido a la abundante concentración de DNA cortado. Las bandas presentan una forma de “U”, lo cual puede deberse, principalmente, a problemas de polimerización del gel de agarosa como también, a su concentración; la gran cantidad de DNA cortado también puede afectar en la corrida, provocando dificultad para definir el tamaño correcto de los fragmentos. Para precisar los tamaños de cada banda tomamos como base la parte superior, que corresponde a las punta de la figura “U”, de esta manera, al comparar las bandas con el estándar fuimos capaces de determinar si presentaban, aproximadamente, el tamaño correspondiente. En el caso de pGEM T-Easy (ver anexo 1), se puede observar claramente que el fragmento tiene un tamaño aproximadamente de 3000 pb, tamaño que corresponde al vector mencionado.

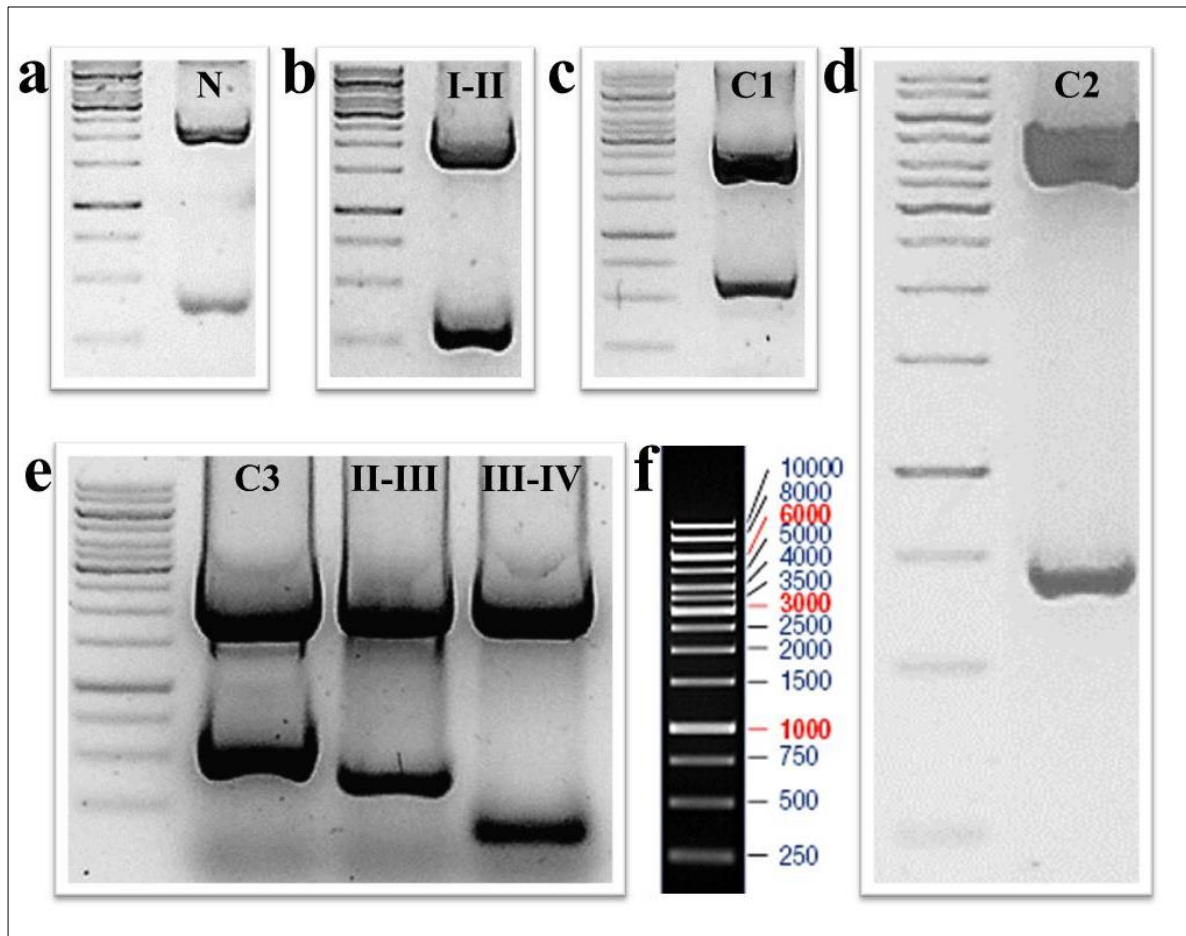


Figura 8. Digestión de los constructos formados por la ligación del vector pGemT-easy y los distintos lazos y regiones de $Ca_v1.2$. Los constructos fueron digeridos enzimáticamente y el ADN resultante fue corrido en un gel 0.8% agarosa. Para generar los lazos II-III, III-IV y las regiones N terminal, C2 y C3 una combinación de las enzimas EcoRI-HindIII fue usada, mientras que para el lazo I-II y la región C1 la digestión fue hecha con las enzimas EcoRI-SalI y XbaI-SalI, respectivamente. El tamaño de cada fragmento fue determinado comparando con un estándar de 1 kb. La digestión de C terminal completo no se muestra en la imagen.

4.3 Clonación a pGEX-2TKG.

Bacterias DH5 α fueron transformadas con los constructos formados por el vector pGEX-2TKG con los lazos intracelulares y las regiones terminales, de esta forma obtener las colonias positivas que presentaran el constructo insertado las regiones anteriormente mencionadas. Esta estrategia se utilizó debido a que las bacterias DH5 α son bacterias que se utilizan comúnmente para la clonación de plasmidos o vectores, las cuales tienen la característica de ser metilasas positivas (*dam+*) (Agilent Technologies, 2010), enzimas que permiten que el DNA sufra un proceso de metilación el cual impide que el DNA sea degradado por endonucleasas, ayudando a que éste se mantenga estable en las bacterias de expresión que se utilizaron posteriormente. Asociado a esto, las bacterias DH5 α presentan mutada la región que codifica para la endonucleasa A1 (*endA1*) (Taylor *et al.*, 1993) de esta forma, al extraer el DNA podemos evidenciar claramente los insertos, ya que impide la degradación que puede sufrir durante la extracción. Una vez que fueron secuenciados y verificados los marcos de lectura, se utilizaron bacterias BL-21(DE3) las cuales fueron transformadas con los constructos verificados. Estas bacterias son utilizadas comúnmente para expresión de proteínas debido a que son proteasas negativas, con ausencia de las proteasas Ion y *ompT*, las cuales pueden degradar proteínas durante la purificación (Grodberg y Dunn, 1988). Antes de la inducción proteica se verificaron y se seleccionaron aquellos cultivos que presentaban el constructo. Esto fue realizado mediante digestión con las enzimas correspondientes para los sitios adicionados a cada lazo y región terminal. Como se evidencia en la Figura 9, las bandas presentaron el mismo patrón en forma de “U” que se obtuvo en la Figura 8, debido a esto, para determinar el tamaño de las bandas se tomó como base el mismo patrón utilizado anteriormente.

En el caso del vector pGEX-2TKG (ver anexo 2), se nota claramente en cada constructo cortado, que el fragmento tiene un tamaño de aproximadamente 5000 pb, tamaño que corresponde al vector mencionado. Las bandas que se encuentran bajo la banda superior (vector), corresponden a los lazos (I-II, II-III y III-IV) y a las regiones terminales (N, C, C1, C2 y C3). Al

hacer la comparación de los tamaños observados en la figura 3 con el tamaño de las regiones intracelulares del canal que se predijeron con anterioridad (Cuadro 2), podemos concluir que la transformación del constructo a las bacterias BL-21(DE3) fue exitosa. El único caso que nos mereció dudas fue el vector con la región C terminal completa, pues de acuerdo a la Figura 9, las bandas que representan al vector y al inserto no están en el tamaño correcto, lo cual pudo deberse a fallas en el gel usado para hacer la corrida electroforética. También cabe destacar que en todas las imágenes (Figura 9) se observa un cierto grado de degradación, que principalmente se visualiza entre la banda superior e inferior. Este efecto no se observa en la purificación del constructo pGEM T-Easy y las regiones terminales o lazos. Es posible que la degradación observada en los otros casos haya sido provocada por la maquinaria interna de la bacteria, a través de DNAasas propias que provocaron la degradación del constructo clonado, debido a que los bacteria BL-21(DE3) utilizadas en la expresión son proteasas negativas como también metilasas negativas, promoviendo la protección de las proteínas, pero no del DNA, provocando su degradación. Los constructos en las bacterias BL-21(D3E) fueron secuenciados (exceptuando la región C terminal completa). Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron comparadas con la predicción de los constructos (pGEX-2TKG/regiones intracelulares) mediante un alineamiento múltiple con el software AlignX (ver anexo 4-10). Los resultados de los alineamientos presentaron una alta de similitud, exceptuando algunos aminoácidos que eran distintos a la predicción o que no se encontraban. Estos errores se verificaron utilizando el software Chromas Lite, comprobándose que estas excepciones eran causa de una mala lectura de la secuenciación automática, de esta forma, las alineaciones demostraron que los constructos presentaban la región intracelular correspondiente, con un marco de lectura adecuado para la producción de las proteínas de fusión.

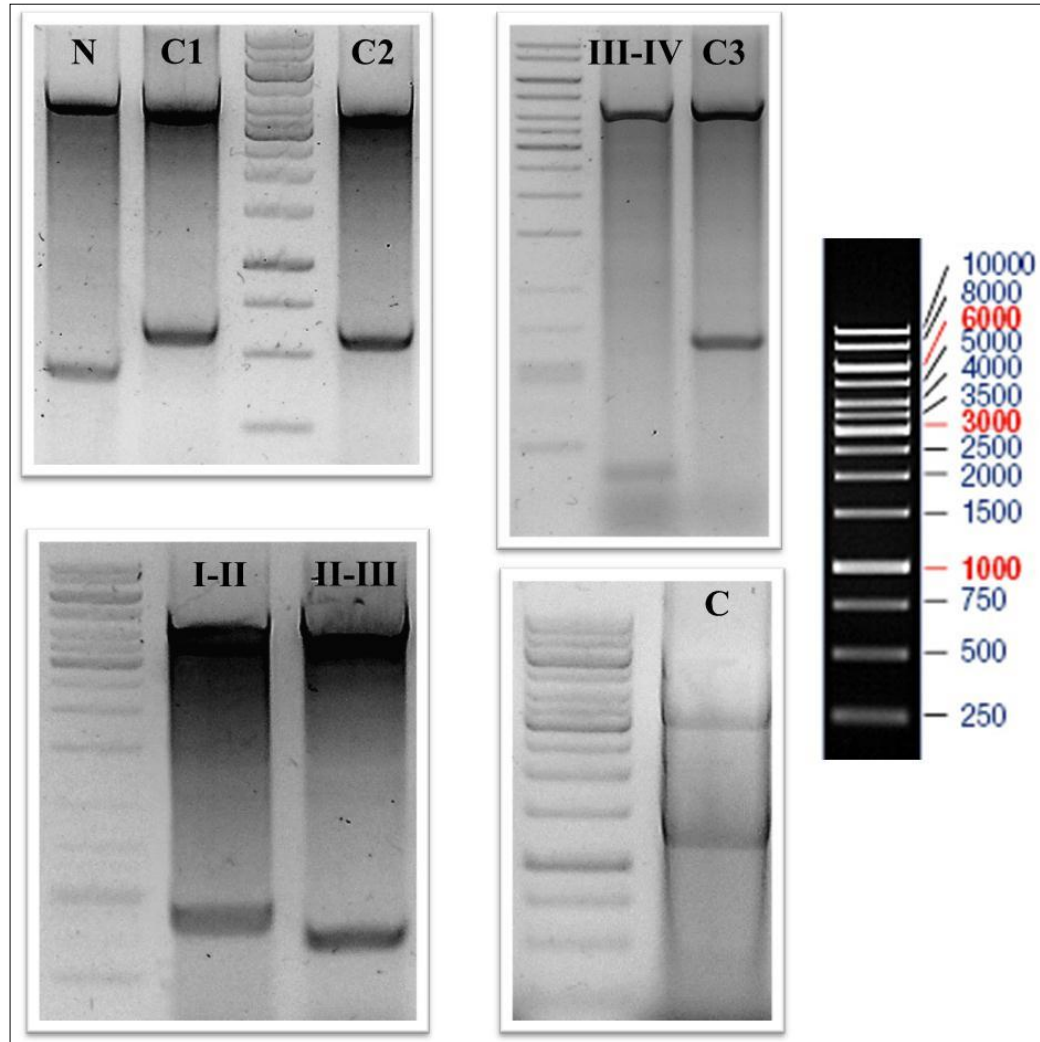


Figura 9. Constructos generados mediante ligación del vector pGEX-2TKG y los lazos o regiones terminales del canal $Ca_v1.2$. Los vectores con los lazos II-III, III-IV y las regiones N terminal, C2 y C3 fueron digeridos con las enzimas EcoRI-HindIII. Los vectores que presentaban el lazo I-II y la región C1 fueron digeridos con las enzimas EcoRI-SalI y XbaI-SalI, respectivamente. La verificación de la presencia de la región C terminal completa fue hecha con una digestión con las enzimas XbaI-HindIII. Los ADNs digeridos fueron corridos en un gel 0.8% agarosa y para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos se utilizó un estándar de 1 kb.

4.4 Producción de proteínas de fusión e interacción de los lazos con el receptor AT-1.

Las bacterias BL-21(DE3) que incorporaron al vector de expresión con los correspondientes lazos o regiones terminales fueron incubadas con IPTG para la inducción de las proteínas de fusión. Debido a los resultados obtenidos de la transformación del vector de expresión pGEX-2TKG y la región C terminal completa (Figura 10.), se decidió realizar la purificación de esta proteína de fusión para determinar si había sido expresada correctamente. Como se muestra en la Figura 10, se presentan tres bandas muy notorias de un peso inferior a los 50 kD, esto sugiere que la proteína fue degradada puesto que la proteína de fusión (GST/Cterminal) tiene un peso de 101 kD aproximadamente (Cuadro 2). Esto puede haber sido provocado por mecanismos internos de la bacteria. Lo más probable es que, producto de la incubación de las proteínas a temperatura ambiente con las perlas de sefarosa, las proteínas pueden haber sufrido alguna desnaturalización. Debido a este problema y al poco tiempo que se dispone para realizar los ensayos, se decidió dejar de utilizar la proteína de fusión con C terminal completo, y solo utilizar las secciones de esta región, C1, C2 y C3. Otra explicación puede deberse a procesos de ubiquitinización, que habrían provocado la degradación de la proteína de fusión dentro de la bacteria dejando restos de proteínas con GST, aunque es poco probable debido a que las bacterias BL-21(DE3) están diseñadas para la expresión de proteínas, minimizando al máximo la degradación (Einarson *et al.*, 2007).

Es preciso destacar que la utilización del vector pGEX y la inducción de proteínas mediante el uso de IPTG han sido ampliamente empleados en la producción de proteínas de fusión (Frangioni y Neel, 1993; Einarson *et al.*, 2007; Sugantha priya *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

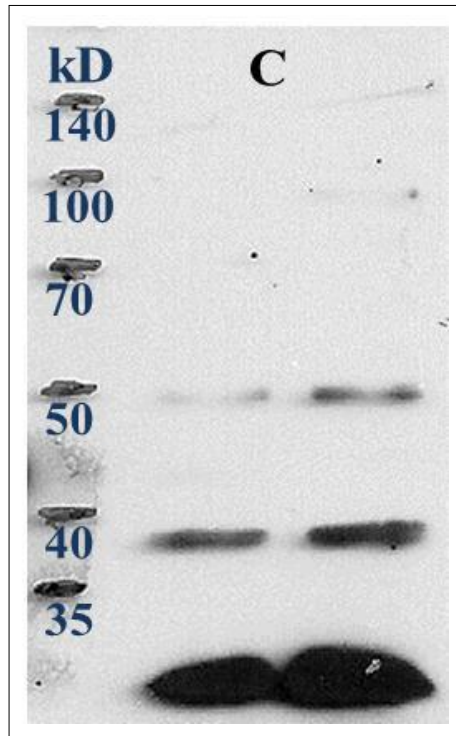


Figura 10. Detección de la proteína de fusión región C terminal completa. La proteína de fusión fue corrida en un gel 10% poliacrilamida y la membrana resultante fue tratada con un anticuerpo monoclonal de ratón contra GST. Los dos carriles corresponden a la misma de proteína.

El ensayo de precipitación por afinidad (*pull-down*) se realizó con cada una de las proteínas de fusión inducidas, excepto con la región C terminal completa. Cabe destacar que este ensayo ha sido utilizado con anterioridad en varios estudios de interacción entre canales y receptores (Beedle *et al.*, 2004; Altier *et al.*, 2006). Para llevar a cabo el ensayo, las proteínas de fusión fueron incubadas con perlas de glutatión-sefarosa 4B y extractos de cardiomiocitos de ratas neonatas (proteínas totales) para evaluar si alguno de los lazos o regiones terminales interactuaban con el receptor de angiotensina AT-1. La elección de proteínas totales de cardiomiocitos en vez del receptor purificado fue en base a que no teníamos claro si la interacción era directa o indirecta, mediante intermediarios, es decir, otras proteínas que ayudaban en la interacción. Como el objetivo del estudio era detectar si la interacción entre ambos se producía, nos inclinamos por el uso de proteínas totales.

En la Figura 11a se presentan cada una de las proteínas de fusión cuya expresión fue inducida con IPTG. Todas ellas presentan un cierto grado de degradación (corresponde a bandas de peso molecular inferior a la proteína en cuestión (Einarson *et al.*, 2007), sin embargo, las bandas con un mayor peso molecular de cada carril corresponden, aproximadamente, al peso molecular predicho para cada proteína de fusión (Cuadro 2). La sección C2 presentó un peso molecular levemente superior al predicho, probablemente por una predicción poco precisa. Para evaluar la interacción de cada proteína con el receptor AT-1, la misma membrana de nitrocelulosa utilizada para ver la presencia de GST fue tratada para remover los anticuerpos unidos a ella, mediante lavados con una solución SDS/ β -mercaptoetanol, y luego, se incubó con un anticuerpo dirigido contra AT-1 para ver la presencia de este receptor (Figura 11b.). En esta figura es posible observar una banda con un peso molecular aproximado de 45 kD en el carril de la proteína de fusión C2, peso que corresponde al receptor AT-1. Este ensayo fue repetido 6 veces obteniéndose el mismo resultado. En el carril correspondiente a la proteína de fusión del lazo II-III se observa una banda muy tenue cerca de 50 kD que se encuentra tanto en la incubación con el anticuerpo contra GST y contra AT1. Esto podría corresponder a una forma glicosilada de AT1 o a una unión inespecífica de ambos anticuerpos. Estos resultados nos dieron el primer indicio de una posible unión del receptor AT-1 a la región C terminal, específicamente, a la zona central de éste que corresponde a la sección C2.

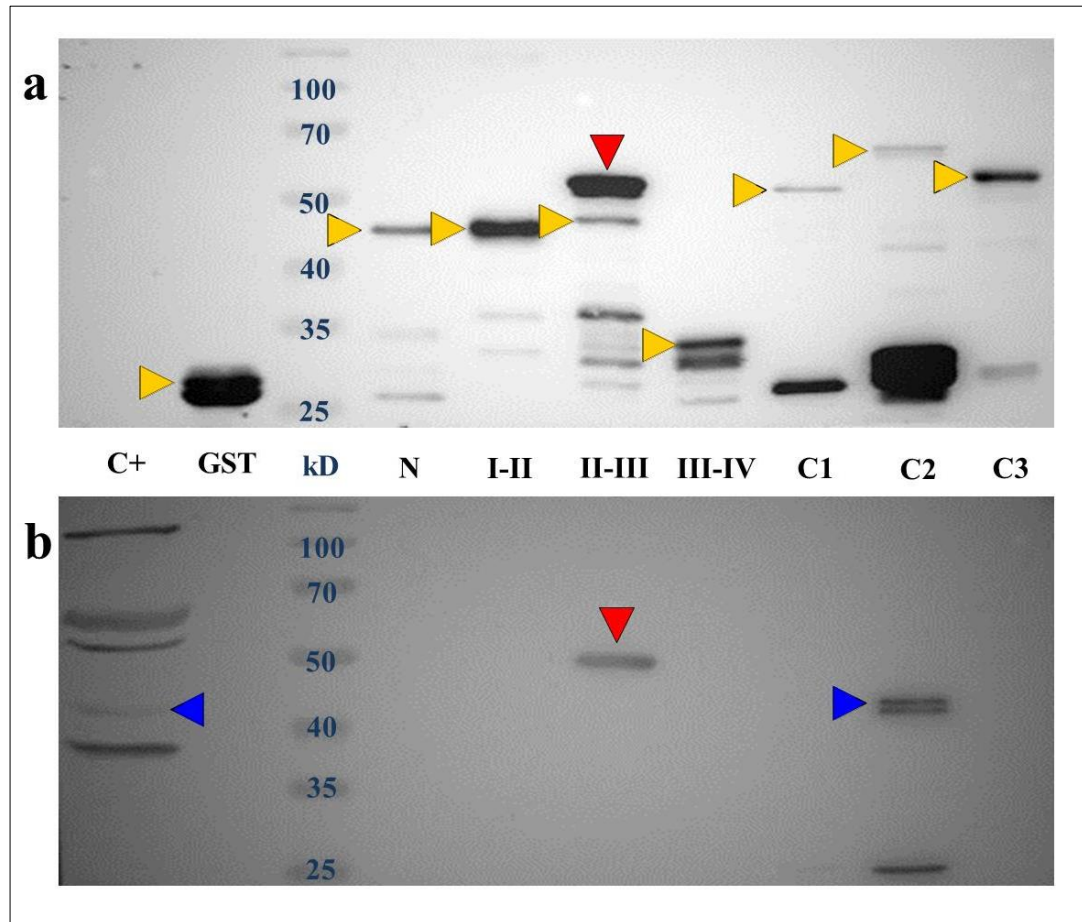


Figura 11. Ensayo de precipitación por afinidad (*pull-down*). Las proteínas de fusión de GST con los lazos intracelulares y las regiones terminales de la subunidad Ca_v1.2 del canal de calcio tipo L fueron incubadas con perlas de agarosa-sefarosa y posteriormente, con extractos de cardiomiocitos de rata neonata. Los precipitados fueron inmunoelectrotransferidos en un gel 10% bis-acrilamida y subsecuentemente, la membrana fue incubada con un anticuerpo policlonal contra AT1 (a); la misma membrana fue incubada con SDS+β-mercaptoetanol para remover los anticuerpos contra AT1 y finalmente incubada con un anticuerpo monoclonal de ratón contra GST (b) (n=6). Los carriles en orden consecutivo son: Extracto de cardiomiocitos (C+), GST solo, estándar de peso molecular de proteínas, N-Terminal, lazo I-II, lazo II-III, lazo III-IV, C1, C2 y C3. Los triángulos señalan las bandas esperadas para las proteínas de fusión (amarillo), el receptor AT1 (azul) o bandas inespecíficas (rojo).

Para determinar si la banda de 50 kD obtenida en el lazo II-III (Figura 11) corresponde a una forma glicosilada de AT1 o una unión inespecífica de los anticuerpos, se llevo a cabo una prueba control en el cual las proteínas de fusión con las regiones terminales C1, C2, C3 y el lazo II-III, sin realizar un ensayo de precipitación por afinidad, fueron inmunoelectrotransferidos directamente en un gel de bisacrilamida. Luego la membrana de nitrocelulosa se incubó con el anticuerpo contra AT1 y posteriormente, los anticuerpos contra AT1 fueron removidos mediante un lavado con una solución SDS/ β -mercaptoetanol, la membrana fue incubada con el anticuerpo anti GST. De esta manera, al no existir unión de estas regiones intracelulares a AT1, podríamos determinar las bandas inespecíficas. Como se muestra en la figura 12, al incubar la membrana con el anticuerpo contra GST, las bandas correspondientes a las regiones intracelulares utilizadas en esta prueba control se encuentran expresadas (figura 12a). En la incubación con el anticuerpo contra AT1 (Figura 12b) se observa una banda con un peso aproximado de 50 kD, la cual también se encuentra en la incubación con el anticuerpo contra GST (Figura 12a). Estos resultados nos demuestran que la banda de 50 kD en el lazo II-III obtenida en los ensayos *pull-down* (Figura 11) corresponde a uniones inespecíficas de ambos anticuerpos, descartando que la interacción del receptor AT1 se realice con el lazo II-III, y adicionalmente, se confirma que la interacción del receptor AT1 se lleva a cabo mediante a una fuerte unión a la zona central de la región C terminal.

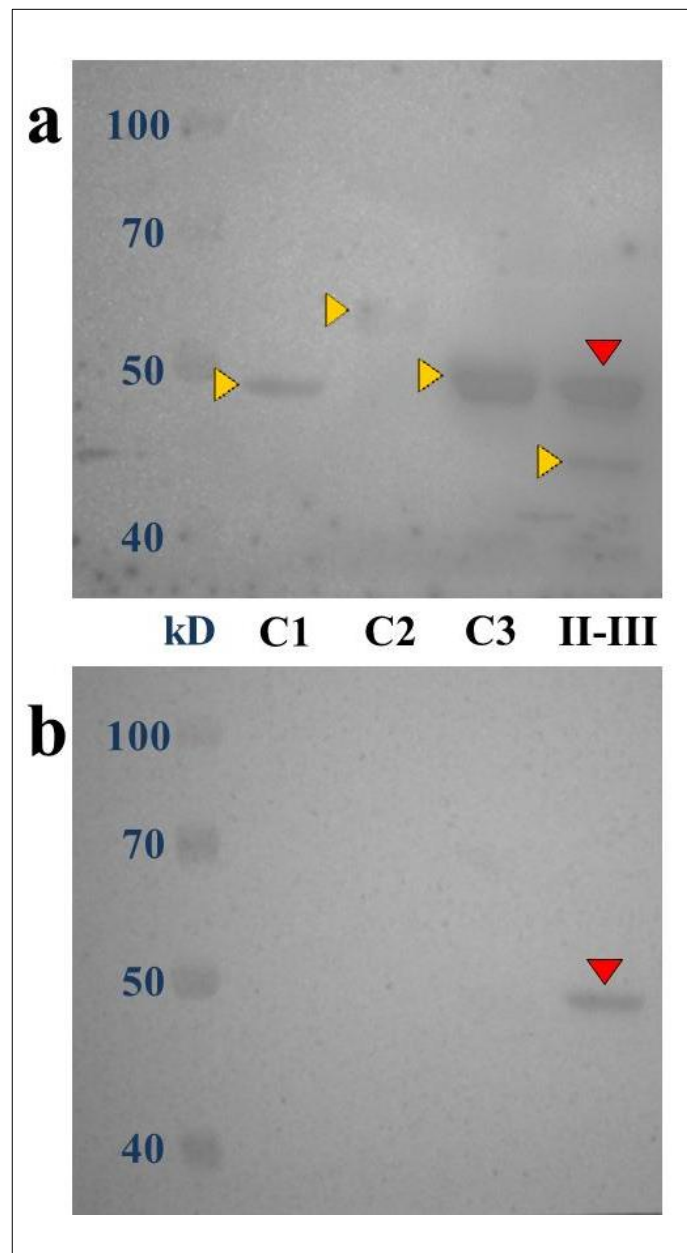


Figura 12. Prueba para detectar uniones inespecíficas. Las proteínas de fusión de GST con las regiones terminales C1, C2 y C3, y el lazo II-III de la subunidad $Ca_v1.2$ del canal de calcio tipo L fueron inmunoelectrotransferidos directamente en un gel 10% bis-acrilamida y subsecuentemente la membrana fue incubada con un anticuerpo policlonal contra AT1 (a); la misma membrana fue incubada con SDS+ β -mercaptoetanol para remover los anticuerpos contra AT1 y finalmente, incubada con un anticuerpo monoclonal de ratón contra GST (b) (n=5). Los carriles en orden consecutivo son: estándar de peso molecular de proteínas, C1, C2, C3 y lazo II-III. Los triángulos señalan las bandas esperadas para las proteínas de fusión (amarillo) o banda inespecífica (rojo).

Para confirmar si la interacción del receptor al canal es en la región C terminal se realizaron ensayos *pull-down* usando sólo las regiones C1, C2 y C3. En estos ensayos, las electroforesis se hicieron por un tiempo mayor para permitir una mejor separación de las bandas inferiores, cercanas a un peso molecular de 42 kD. La membrana, a la cual se transfirieron las proteínas corridas en el gel de electroforesis, fue cortada en dos: una sección fue incubada con el anticuerpo para GST (Figura 13a.) mientras que la otra sección fue tratada con un anticuerpo contra AT-1 (Figura 13b.). De esta forma, fue posible obtener ambos resultados en el mismo gel. El control positivo para AT1 usado fue extracto de cardiomiocitos de rata neonata, el mismo utilizado para hacer los ensayos de pulldown.

En la Figura 13a podemos observar la presencia de las bandas correspondientes a las regiones C1, C2 y C3 unidas a GST. En este caso, las bandas se ven claras pero de mayor grosor, como es el caso de C2 y C3, esto debido principalmente a la cantidad de proteína presente y a la corrida electroforética de mayor duración. De todas formas, esto nos permitió saber que la expresión de la proteína de fusión se llevó a cabo. La Figura 13b nos muestra el resultado de la incubación con el anticuerpo contra AT1, lo cual, nuevamente dio como resultado la presencia del receptor AT-1 en el carril de la región C2. Al comparar el resultado con el control positivo (extracto de cardiomiocitos de rata), podemos ver que presenta el mismo peso molecular, lo cual sugiere que la banda de 42 kD presente en el carril de C2 es el receptor AT1 y que esta sección de la región C terminal es la que interactúa con el receptor.

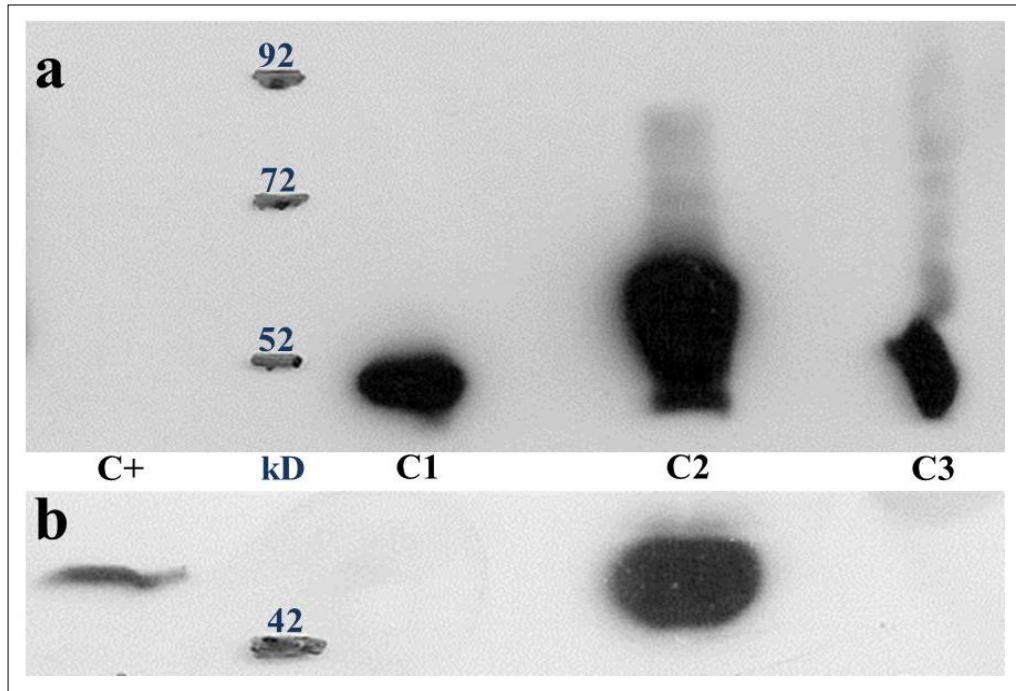


Figura 13. Ensayo *pull-down* de las regiones C1, C2 y C3. Las proteínas de fusión GST y las regiones C1, C2 y C3 fueron incubadas con perlas de glutation-sefarosa 4B y extractos de cardiomiocitos de ratas neonatas. Los precipitados resultantes fueron corridos en un gel 10% bis-acrilamida el cual fue transferido a una membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con un anticuerpo contra GST (a) y contra AT-1 (b). C+ corresponde al control positivo, (extractos de cardiomiocitos de ratas neonatas).

5. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que el macro-complejo formado por el receptor de angiotensina tipo 1 y la subunidad $Ca_v1.2$ del canal de calcio tipo L, se debe a un fuerte interacción del receptor AT1 con la zona media de la región C terminal de la subunidad $Ca_v1.2$.

Estos resultados nos sugieren que la modulación de las corrientes de calcio del canal $Ca_v1.2$ generado por la hormona angiotensina II, posiblemente se debe a la formación de este macro-complejo, el cual provocaría la inhibición del subunidad $Ca_v1.2$ mediante la interacción directa con el receptor AT-1.

Adicionalmente, es posible que al formarse este complejo, tanto el receptor AT-1 como la subunidad $Ca_v1.2$, se produzca la internalización de ambos pero manteniendo esta interacción, lo cual podría llevar a un posterior reciclado, volviendo a la membrana, o a una proteólisis.

Los resultados expuestos en este estudio darán pie a nuevos estudios, los cuales se centrarán en los efectos celulares y moleculares que pueda ocasionar la interrupción de esta interacción entre estas dos moléculas.

6. RESUMEN

En cardiomiocitos, se ha demostrado que la hormona angiotensina II (AngII) modula las corrientes de calcio tipo L a través de la activación del receptor AT1. Experimentos previos de nuestro laboratorio han mostrado que la estimulación con esta hormona induce, no sólo la internalización del receptor AT1, sino que también, la de la subunidad $Ca_v\alpha_1$ del canal de calcio tipo L ($Ca_v1.2$), este último proceso en forma dependiente de la subunidad accesoria $Ca_v\beta$ expresada. Además, se demostró la existencia de un macro-complejo proteico que incluye al receptor AT1 y la subunidad $Ca_v1.2$ del canal de calcio tipo L. En este trabajo determinamos la región intracelular de la subunidad $Ca_v1.2$ responsable de esta interacción. Mediante la creación de proteínas de fusión de los lazos, las regiones N-terminal y C-terminal de $Ca_v1.2$ con la proteína glutathion-S-transferasa (GST), se realizaron ensayos de precipitación por afinidad (*pull-down*) con el receptor AT1, donde se observó que la zona central de la región C terminal de $Ca_v1.2$ es la región que interactúa con el receptor AT1.

7. SUMMARY

In cardiomyocytes, has been demonstrated that the hormone angiotensin II (AngII) modulates the L-type calcium currents through the activation of AT1 receptor. Previous experiments from our laboratory have shown that this hormone stimulation induces not only the AT1 receptor internalization, but also the $Ca_v\alpha_1$ subunit of the L-type calcium channel ($Ca_v1.2$), this latter process dependent on the beta subunit expressed. Furthermore, in our laboratory was demonstrated the existence of a protein macro-complex which includes the AT1 receptor and the $Ca_v1.2$ subunit of the L-type calcium channel. In this work, we determine the intracellular region of the $Ca_v1.2$ subunit responsible of this interaction. By the creation of fusion proteins of the intracellular loops, N-terminal and C-terminal regions with the proteins glutathione-s-transferase (GST), we performed Pull-down assays with de AT1 receptor. We observed that the central zone of the C-terminal region is the region $Ca_v1.2$ that interacts with the AT1 receptor.

8. LITERATURA CITADA

- Agilent Technologies, i.**, 2010. QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit. pp. 3-4.
- Altier, C., Khosravani, H., Evans, R.M., Hameed, S., Peloquin, J.B., Vartian, B.A., Chen, L., Beedle, A.M., Ferguson, S.S., Mezghrani, A., Dubel, S.J., Bourinet, E., McRory, J.E., Zamponi, G.W.**, 2006. ORL1 receptor-mediated internalization of N-type calcium channels. *Nature neuroscience* 9, 31-40.
- Arikkath, J., Campbell, K.P.**, 2003. Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex. *Current opinion in neurobiology* 13, 298-307.
- Beedle, A.M., McRory, J.E., Poirot, O., Doering, C.J., Altier, C., Barrere, C., Hamid, J., Nargeot, J., Bourinet, E., Zamponi, G.W.**, 2004. Agonist-independent modulation of N-type calcium channels by ORL1 receptors. *Nature neuroscience* 7, 118-125.
- Birnbaumer, L., Qin, N., Olcese, R., Tareilus, E., Platano, D., Costantin, J., Stefani, E.**, 1998. Structures and functions of calcium channel beta subunits. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 30, 357-375.
- Bkaily, G., Sculptoreanu, A., Wang, S., Nader, M., Hazzouri, K.M., Jacques, D., Regoli, D., D'Orleans-Juste, P., Avedanian, L.**, 2005. Angiotensin II-induced increase of T-type Ca²⁺ current and decrease of L-type Ca²⁺ current in heart cells. *Peptides* 26, 1410-1417.
- Bodi, I., Mikala, G., Koch, S.E., Akhter, S.A., Schwartz, A.**, 2005. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *The Journal of clinical investigation* 115, 3306-3317.
- Buraei, Z., Yang, J.**, 2010. The ss subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Physiological reviews* 90, 1461-1506.
- Calin-Jageman, I., Lee, A.**, 2008. **Ca(v)1 L-type Ca²⁺ channel signaling complexes in neurons.** *Journal of neurochemistry* 105, 573-583.
- Catterall, W.A.**, 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annual review of cell and developmental biology* 16, 521-555.
- Conforti, L., Sumii, K., Sperelakis, N.**, 1995. Dioctanoyl-glycerol inhibits L-type calcium current in embryonic chick cardiomyocytes independent of protein kinase C activation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 27, 1219-1224.
- Chen-Izu, Y.**, 2010. Multiple levels of the single L-type Ca²⁺ channel conductance in adult mammalian ventricular myocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 391, 604-608.

- Dale, L.B., Seachrist, J.L., Babwah, A.V., Ferguson, S.S.,** 2004. Regulation of angiotensin II type 1A receptor intracellular retention, degradation, and recycling by Rab5, Rab7, and Rab11 GTPases. *The Journal of biological chemistry* 279, 13110-13118.
- Davare, M.A., Avdonin, V., Hall, D.D., Peden, E.M., Burette, A., Weinberg, R.J., Horne, M.C., Hoshi, T., Hell, J.W.,** 2001. A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca²⁺ channel Ca_v1.2. *Science* 293, 98-101.
- Drake, M.T., Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J.,** 2006. Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circulation research* 99, 570-582.
- Einarson, M.B., Pugacheva, E.N., Orlick, J.R.,** 2007. Preparation of GST Fusion Proteins. *CSH protocols* 2007, pdb prot4738.
- Frangioni, J.V., Neel, B.G.,** 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Analytical biochemistry* 210, 179-187.
- Gaborik, Z., Hunyady, L.,** 2004. Intracellular trafficking of hormone receptors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 15, 286-293.
- Gasparo, M., Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W. & Unger, T.,** 2000. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacological reviews* 52, 415-472.
- Gomez-Ospina, N., Tsuruta, F., Barreto-Chang, O., Hu, L., Dolmetsch, R.,** 2006. The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel Ca(V)1.2 encodes a transcription factor. *Cell* 127, 591-606.
- Green, E.M., Barrett, C.F., Bultynck, G., Shamah, S.M., Dolmetsch, R.E.,** 2007. The tumor suppressor eIF3e mediates calcium-dependent internalization of the L-type calcium channel Ca_v1.2. *Neuron* 55, 615-632.
- Grodberg, J., Dunn, J.J.,** 1988. ompT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *Journal of bacteriology* 170, 1245-1253.
- Hayabuchi, Y., Davies, N.W., Standen, N.B.,** 2001. Angiotensin II inhibits rat arterial KATP channels by inhibiting steady-state protein kinase A activity and activating protein kinase Ce. *The Journal of physiology* 530, 193-205.
- Hermosilla, T., Moreno, C., Itfinca, M., Altier, C., Armisen, R., Stutzin, A., Zamponi, G.W., Varela, D.,** 2011. L-type calcium channel beta subunit modulates angiotensin II responses in cardiomyocytes. *Channels (Austin)* 5, 280-286.
- Hunyady, L., Catt, K.J., Clark, A.J., Gaborik, Z.,** 2000. Mechanisms and functions of AT(1) angiotensin receptor internalization. *Regulatory peptides* 91, 29-44.

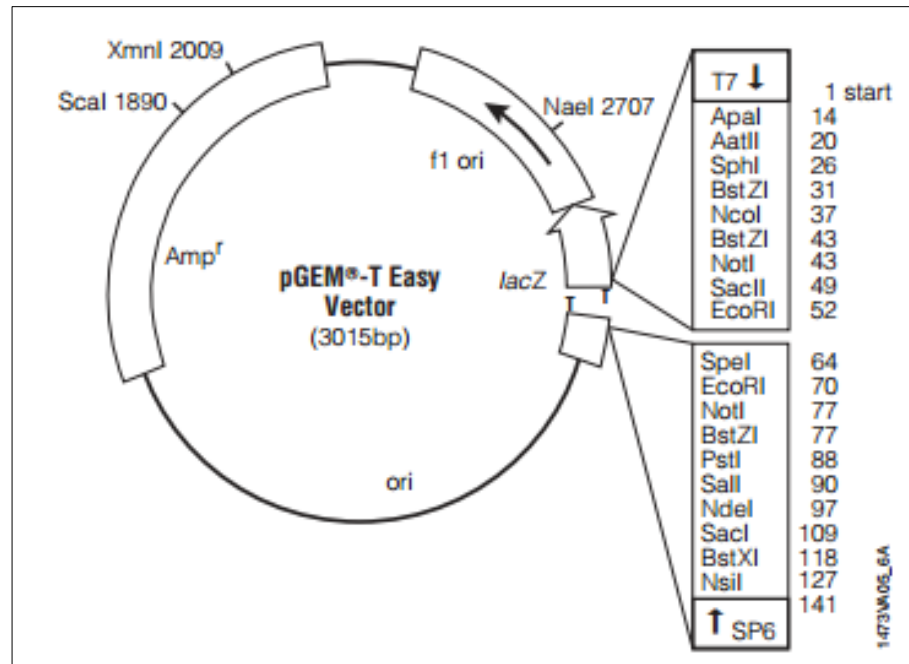
- Ichiyanagi, O., Ishii, K., Endoh, M., 2002.** Angiotensin II increases L-type Ca²⁺ current in gramicidin D-perforated adult rabbit ventricular myocytes: comparison with conventional patch-clamp method. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 444, 107-116.
- Ji, T.H., Grossmann, M., Ji, L., 1998.** G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *The Journal of biological chemistry* 273, 17299-17302.
- Keja, J.A., Kits, K.S., 1994.** Single-channel properties of high- and low-voltage-activated calcium channels in rat pituitary melanotropic cells. *Journal of neurophysiology* 71, 840-855.
- Kisilevsky, A.E., Mulligan, S.J., Altier, C., Iftinca, M.C., Varela, D., Tai, C., Chen, L., Hameed, S., Hamid, J., Macvicar, B.A., Zamponi, G.W., 2008.** D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron* 58, 557-570.
- Kisilevsky, A.E., Zamponi, G.W., 2008.** D2 dopamine receptors interact directly with N-type calcium channels and regulate channel surface expression levels. *Channels (Austin)* 2, 269-277.
- Latorre, R., 1996.** Biofísica y fisiología celular.
- Lee, F.J., Xue, S., Pei, L., Vukusic, B., Chery, N., Wang, Y., Wang, Y.T., Niznik, H.B., Yu, X.M., Liu, F., 2002.** Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* 111, 219-230.
- Lehmann-Horn, F., Jurkat-Rott, K., 1999.** Voltage-gated ion channels and hereditary disease. *Physiological reviews* 79, 1317-1372.
- Liu, L., Heneghan, J.F., Michael, G.J., Stanish, L.F., Egertová, M., Rittenhouse, A.R., 2008.** L- and N-current but not M-current inhibition by M1 muscarinic receptors requires DAG lipase activity. *Journal of Cellular Physiology* 216, 91-100.
- Maturana, A.D., Casal, A.J., Demaurex, N., Vallotton, M.B., Capponi, A.M., Rossier, M.F., 1999.** Angiotensin II negatively modulates L-type calcium channels through a pertussis toxin-sensitive G protein in adrenal glomerulosa cells. *The Journal of biological chemistry* 274, 19943-19948.
- Miura, S., Saku, K., Karnik, S.S., 2003.** Molecular analysis of the structure and function of the angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 26, 937-943.
- Molkentin, J.D., Lu, J.R., Antos, C.L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S.R., Olson, E.N., 1998.** A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-228.

- Moreno, C., Varela, D. (Tutor), Hermosilla, T (Co-Tutor),** 2012. Internalización de la subunidad $Ca_v1.2$ en células estimuladas con AngII. Laboratorio Fisiopatología Molecular. Universidad de Chile.
- Opatowsky, Y., Chomsky-Hecht, O., Kang, M.G., Campbell, K.P., Hirsch, J.A.,** 2003. The voltage-dependent calcium channel beta subunit contains two stable interacting domains. *The Journal of biological chemistry* 278, 52323-52332.
- Park, H.W., Jung, H., Choi, K.H., Baik, J.H., Rhim, H.,** 2010. Direct interaction and functional coupling between voltage-gated $Ca_v1.3$ Ca^{2+} channel and GABAB receptor subunit 2. *FEBS letters* 584, 3317-3322.
- Qin, N., Platano, D., Olcese, R., Costantin, J.L., Stefani, E., Birnbaumer, L.,** 1998. Unique regulatory properties of the type 2a Ca^{2+} channel beta subunit caused by palmitoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4690-4695.
- Ruiz-Ortega, M., Ruperez, M., Esteban, V., Rodriguez-Vita, J., Sanchez-Lopez, E., Carvajal, G., Egido, J.,** 2006. Angiotensin II: a key factor in the inflammatory and fibrotic response in kidney diseases. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 21, 16-20.
- Sanni, S.J., Hansen, J.T., Bonde, M.M., Speerschneider, T., Christensen, G.L., Munk, S., Gammeltoft, S., Hansen, J.L.,** 2010. beta-Arrestin 1 and 2 stabilize the angiotensin II type I receptor in distinct high-affinity conformations. *British journal of pharmacology* 161, 150-161.
- Schultz, D., Mikala, G., Yatani, A., Engle, D.B., Iles, D.E., Segers, B., Sinke, R.J., Weghuis, D.O., Klockner, U., Wakamori, M., et al.,** 1993. Cloning, chromosomal localization, and functional expression of the alpha 1 subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 6228-6232.
- Seachrist, J.L., Laporte, S.A., Dale, L.B., Babwah, A.V., Caron, M.G., Anborgh, P.H., Ferguson, S.S.,** 2002. Rab5 association with the angiotensin II type 1A receptor promotes Rab5 GTP binding and vesicular fusion. *The Journal of biological chemistry* 277, 679-685.
- Shukla, A.K., Kim, J., Ahn, S., Xiao, K., Shenoy, S.K., Liedtke, W., Lefkowitz, R.J.,** 2010. Arresting a transient receptor potential (TRP) channel: beta-arrestin 1 mediates ubiquitination and functional down-regulation of TRPV4. *The Journal of biological chemistry* 285, 30115-30125.

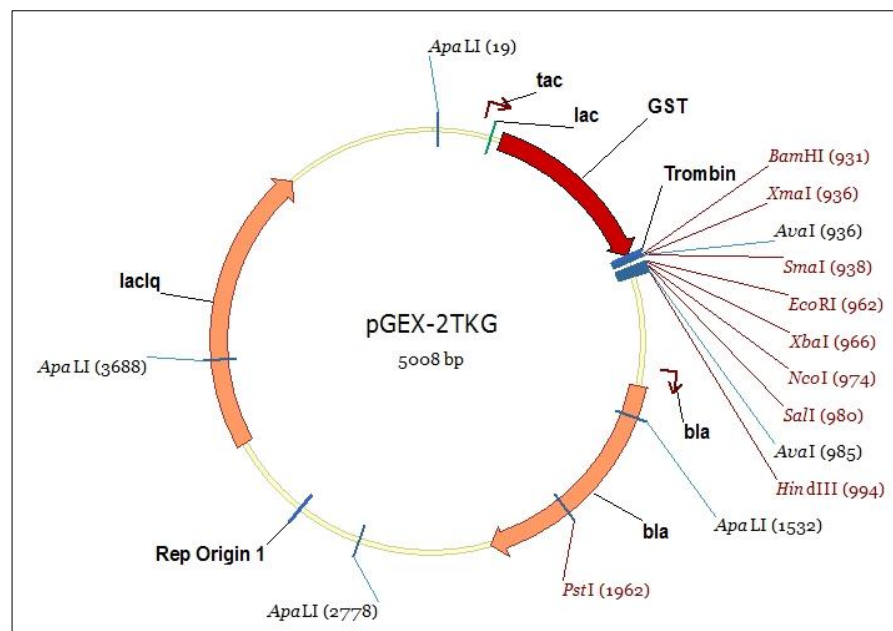
- Sugantha priya, S., Gowri Shankar, J., Thirumalaisamy, R., Kavitha, P., Prakash, B., Arunachalam, G., S.Selvamuthukumar,** 2010. Over Expression of IPTG inducible GST protein in E.coli BL21. *J Biomed Sci and Res* 2, 54-59.
- Suh, B.C., Leal, K., Hille, B.,** 2010. Modulation of high-voltage activated Ca(2+) channels by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Neuron* 67, 224-238.
- Taylor, R.G., Walker, D.C., McInnes, R.R.,** 1993. E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic acids research* 21, 1677-1678.
- Thomas, W.G.,** 1999. Regulation of angiotensin II type 1 (AT1) receptor function. *Regulatory peptides* 79, 9-23.
- Thomas, W.G., Qian, H.,** 2003. Arresting angiotensin type 1 receptors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 14, 130-136.
- Tombler, E., Cabanilla, N.J., Carman, P., Permaul, N., Hall, J.J., Richman, R.W., Lee, J., Rodriguez, J., Felsenfeld, D.P., Hennigan, R.F., Diverse-Pierluissi, M.A.,** 2006. G protein-induced trafficking of voltage-dependent calcium channels. *The Journal of biological chemistry* 281, 1827-1839.
- Touyz, R.M., Schiffrin, E.L.,** 2000. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews* 52, 639-672.
- Tsuruta, F., Green, E.M., Rousset, M., Dolmetsch, R.E.,** 2009. PIKfyve regulates Ca_v1.2 degradation and prevents excitotoxic cell death. *The Journal of cell biology* 187, 279-294.
- Walwyn, W., Evans, C.J., Hales, T.G.,** 2007. Beta-arrestin2 and c-Src regulate the constitutive activity and recycling of mu opioid receptors in dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 5092-5104.
- Wang, M.C., Dolphin, A., Kitmitto, A.,** 2004. L-type voltage-gated calcium channels: understanding function through structure. *FEBS letters* 564, 245-250.
- Weiss, S., Doan, T., Bernstein, K.E., Dascal, N.,** 2004. Modulation of cardiac Ca²⁺ channel by Gq-activating neurotransmitters reconstituted in *Xenopus* oocytes. *The Journal of biological chemistry* 279, 12503-12510.
- Williams, B.,** 2001. Angiotensin II and the pathophysiology of cardiovascular remodeling. *The American journal of cardiology* 87, 10C-17C.
- Wolfe, B.L., Trejo, J.,** 2007. Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic* 8, 462-470.

- Yamada, E., Endoh, T., Suzuki, T.,** 2002. Angiotensin II-induced inhibition of calcium currents via G(q/11)-protein involving protein kinase C in hamster submandibular ganglion neurons. *Neuroscience research* 43, 179-189.
- Yasuda, R., Sabatini, B.L., Svoboda, K.,** 2003. Plasticity of calcium channels in dendritic spines. *Nature neuroscience* 6, 948-955.
- Zhang, N., Li, W.G., Wang, M., Cai, S.F.,** 2012. [Construction and expression of the recombinant plasmid pGEX-Sj14-3-3 of *Schistosoma japonicum* in BL21(DE3)]. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Sichuan University. Medical science edition* 43, 310-313.

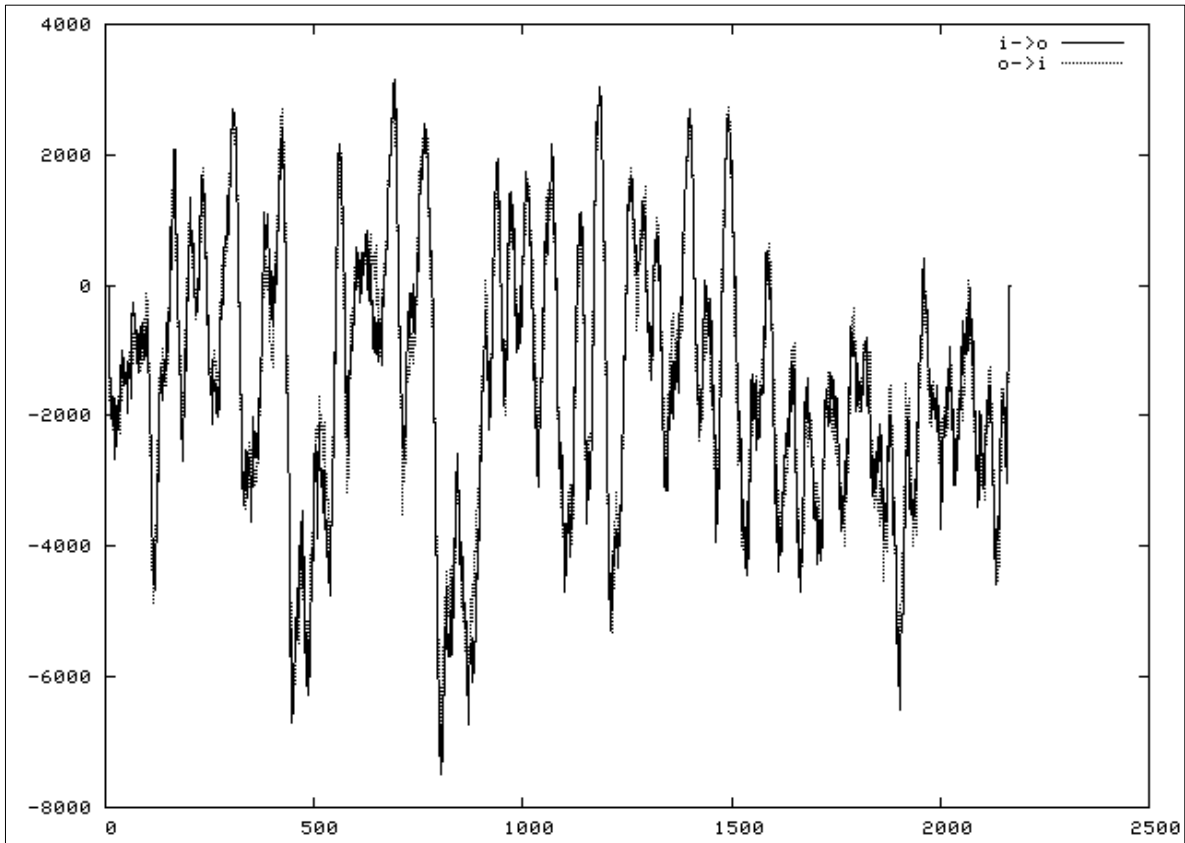
9. ANEXOS



Anexo 1. Mapa y puntos de referencia del vector pGEM-T Easy.



Anexo 2. Mapa y puntos de referencia del vector pGEX-2TKG.



Anexo 3. Gráfico del análisis de hidrofobicidad de las regiones transmembranales de la subunidad $Ca_v1.2$ del canal de calcio tipo L.

		1		50
N+GST_Secuenciado	(1)	-----VQPTRLLEFLEEKYEELHYERDEGDKWRNKKFELGL		
N+GST_Predicción	(1)	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEFLEEKYEELHYERDEGDKWRNKKFELGL		
Consenso	(1)	VQPTRLLEFLEEKYEELHYERDEGDKWRNKKFELGL		
		51		100
N+GST_Secuenciado	(38)	EFPNLPYYIDGDVKLTQSMATIRYIADKHNMLGGCPKERAETSMLEGAVL		
N+GST_Predicción	(51)	EFPNLPYYIDGDVKLTQSMATIRYIADKHNMLGGCPKERAETSMLEGAVL		
Consenso	(51)	EFPNLPYYIDGDVKLTQSMATIRYIADKHNMLGGCPKERAETSMLEGAVL		
		101		150
N+GST_Secuenciado	(88)	DIRYGVSR IAYS KDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH		
N+GST_Predicción	(101)	DIRYGVSR IAYS KDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH		
Consenso	(101)	DIRYGVSR IAYS KDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH		
		151		200
N+GST_Secuenciado	(138)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA		
N+GST_Predicción	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA		
Consenso	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA		
		201		250
N+GST_Secuenciado	(188)	WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGGIRMLRALVQPATPAY		
N+GST_Predicción	(201)	WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGGIRMLRALVQPATPAY		
Consenso	(201)	WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGGIRMLRALVQPATPAY		
		251		300
N+GST_Secuenciado	(238)	QPLPSHLSAETESTCKGTVVHEAQLNHFYISPGGSNYGSRPAHANMNAN		
N+GST_Predicción	(251)	QPLPSHLSAETESTCKGTVVHEAQLNHFYISPGGSNYGSRPAHANMNAN		
Consenso	(251)	QPLPSHLSAETESTCKGTVVHEAQLNHFYISPGGSNYGSRPAHANMNAN		
		301		350
N+GST_Secuenciado	(288)	AAAGLAPEHIPTPGAALSWQAAIDAARQAKLMGSAGNATISTVSSTQRKR		
N+GST_Predicción	(301)	AAAGLAPEHIPTPGAALSWQAAIDAARQAKLMGSAGNATISTVSSTQRKR		
Consenso	(301)	AAAGLAPEHIPTPGAALSWQAAIDAARQAKLMGSAGNATISTVSSTQRKR		
		351		394
N+GST_Secuenciado	(338)	QYQYKPKKQGSTTATRPPRAL LCLTLKNPIRRA-----		
N+GST_Predicción	(351)	QYQYKPKKQGSTTATRPPRAL LCLTLKNPIRRA C I S I V E W K P F E		
Consenso	(351)	QYQYKPKKQGSTTATRPPRAL LCLTLKNPIRRA		

Anexo 4. Alineación múltiple (AlignX) entre el constructo pGEX-2TKG/N-terminal secuenciado y su predicción.

		1		50
I-II_GST_Secuenciado	(1)	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGL		
I-II+GST_Predicción	(1)	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGL		
Consenso	(1)	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGL		
		51		100
I-II_GST_Secuenciado	(51)	EFPNLPYYIDGDVKLTQSMATIRYIADKHNMLGGCPKERAETSMLEGA		
I-II+GST_Predicción	(51)	EFPNLPYYIDGDVKLTQSMATIRYIADKHNMLGGCPKERAETSMLEGA		
Consenso	(51)	EFPNLPYYIDGDVKLTQSMATIRYIADKHNMLGGCPKERAETSMLEGA		
		101		150
I-II_GST_Secuenciado	(101)	DIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH		
I-II+GST_Predicción	(101)	DIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH		
Consenso	(101)	DIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH		
		151		200
I-II_GST_Secuenciado	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA		
I-II+GST_Predicción	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA		
Consenso	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA		
		201		250
I-II_GST_Secuenciado	(201)	WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGGIR--GEFSKEREKAK		
I-II+GST_Predicción	(201)	WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGGIRLSGEFSKEREKAK		
Consenso	(201)	WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGGIR GEFSKEREKAK		
		251		300
I-II_GST_Secuenciado	(249)	ARGDFQKLREKQQLEEDLKG YLDWITQAEDIDPENEDEGMDEEKPRNMSM		
I-II+GST_Predicción	(251)	ARGDFQKLREKQQLEEDLKG YLDWITQAEDIDPENEDEGMDEEKPRNMSM		
Consenso	(251)	ARGDFQKLREKQQLEEDLKG YLDWITQAEDIDPENEDEGMDEEKPRNMSM		
		301		350
I-II_GST_Secuenciado	(299)	PTSETESVNTENVAGGDI EGENCGARLAHRISKSKFSRYWRRWNRFCRRK		
I-II+GST_Predicción	(301)	PTSETESVNTENVAGGDI EGENCGARLAHRISKSKFSRYWRRWNRFCRRK		
Consenso	(301)	PTSETESVNTENVAGGDI EGENCGARLAHRISKSKFSRYWRRWNRFCRRK		
		351		
I-II_GST_Secuenciado	(349)	CRAAVKSN		
I-II+GST_Predicción	(351)	CRA-----		
Consenso	(351)	CRA		

Anexo 5. Alineación múltiple (AlignX) entre el constructo pGEX-2TKG/Lazo I-II secuenciado y su predicción.

		1		50
II-III+GST_Secuenciado	(1)	-----		
II-III+GST_Predicción	(1)	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGL		
Consenso	(1)			
		51		100
II-III+GST_Secuenciado	(1)	-----MAIIRYIADKHNMLGGCPKERA EISMLEGAVL		
II-III+GST_Predicción	(51)	EFPNLPYYIDGDVKLQSM IIRYIADKHNMLGGCPKERA EISMLEGAVL		
Consenso	(51)	MAIIRYIADKHNMLGGCPKERA EISMLEGAVL		
		101		150
II-III+GST_Secuenciado	(33)	DIRYGVSRIAYS KDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH		
II-III+GST_Predicción	(101)	DIRYGVSRIAYS KDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH		
Consenso	(101)	DIRYGVSRIAYS KDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH		
		151		200
II-III+GST_Secuenciado	(83)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA		
II-III+GST_Predicción	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA		
Consenso	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA		
		201		250
II-III+GST_Secuenciado	(133)	WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGGIRDNLADAESL TSAQ		
II-III+GST_Predicción	(201)	WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGGIRDNLADAESL TSAQ		
Consenso	(201)	WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGGIRDNLADAESL TSAQ		
		251		300
II-III+GST_Secuenciado	(183)	KEEEEEKERKKLARTASPEKKQEVVGKPALEEAK EEEKIELKSITADGESP		
II-III+GST_Predicción	(251)	KEEEEEKERKKLARTASPEKKQEVVGKPALEEAK EEEKIELKSITADGESP		
Consenso	(251)	KEEEEEKERKKLARTASPEKKQEVVGKPALEEAK EEEKIELKSITADGESP		
		301		350
II-III+GST_Secuenciado	(233)	PTTKINMDDLQPN ESEDKG PYPNPETTGE EDEEPEMPVGPRRPLSELH		
II-III+GST_Predicción	(301)	PTTKINMDDLQPN ESEDKS PYPNPETTGE EDEEPEMPVGPRRPLSELH		
Consenso	(301)	PTTKINMDDLQPN ESEDK PYPNPETTGE EDEEPEMPVGPRRPLSELH		
		351		384
II-III+GST_Secuenciado	(283)	LKEKAVPMPEASAFFIFSPNNRFR LQCHRIVNDT		
II-III+GST_Predicción	(351)	LKEKAVPMPEASAFFIFSPNNRFR LQCHRIVNDT		
Consenso	(351)	LKEKAVPMPEASAFFIFSPNNRFR LQCHRIVNDT		

Anexo 6. Alineación múltiple (AlignX) entre el constructo pGEX-2TKG/Lazo II-III secuenciado y su predicción.

		1	50
III-IV+GST_Secuenciado	(1)	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGI	
III-IV+GST_Predicción	(1)	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGI	
Consenso	(1)	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGI	
		51	100
III-IV+GST_Secuenciado	(51)	EFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL	
III-IV+GST_Predicción	(51)	EFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL	
Consenso	(51)	EFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL	
		101	150
III-IV+GST_Secuenciado	(101)	DIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH	
III-IV+GST_Predicción	(101)	DIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH	
Consenso	(101)	DIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH	
		151	200
III-IV+GST_Secuenciado	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA	
III-IV+GST_Predicción	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA	
Consenso	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA	
		201	250
III-IV+GST_Secuenciado	(201)	WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGGIRVTFQEQQEQEYKN	
III-IV+GST_Predicción	(201)	WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGGIRVTFQEQQEQEYKN	
Consenso	(201)	WPLQGWQATFGGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGGIRVTFQEQQEQEYKN	
		251	291
III-IV+GST_Secuenciado	(251)	CELDKNQRQCVEYALKARPLRRYIPKNQHQQYKVVVYVNSTY	
III-IV+GST_Predicción	(251)	CELDKNQRQCVEYALKARPLRRYIPKNQHQQYKVVVYVNST-	
Consenso	(251)	CELDKNQRQCVEYALKARPLRRYIPKNQHQQYKVVVYVNST	

Anexo 7. Alineación múltiple (AlignX) entre el constructo pGEX-2TKG/Lazo III-IV secuenciado y su predicción.

		1	50
C1+GST_Secuenciado	(1)	-----	
C1+GST_Predicción	(1)	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGL	
Consenso	(1)		
		51	100
C1+GST_Secuenciado	(1)	-----	
C1+GST_Predicción	(51)	EFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNLGGCPKERAIEISMLEGAVL	
Consenso	(51)		
		101	150
C1+GST_Secuenciado	(1)	-----	
C1+GST_Predicción	(101)	DIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH	
Consenso	(101)		
		151	200
C1+GST_Secuenciado	(1)	-----	
C1+GST_Predicción	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA	
Consenso	(151)		
		201	250
C1+GST_Secuenciado	(1)	-----	
C1+GST_Predicción	(201)	WPLQGWQATFGGGDHPKSDLVPRGSPGISGGGGILDVAVI	MDNFDYLT
Consenso	(201)		MDNFDYLT
		251	300
C1+GST_Secuenciado	(9)	RDWSILGPHHLDEFKRIWAEYDPEAKGRIKHLDVVTLLRRIQPPLGFGKL	
C1+GST_Predicción	(251)	RDWSILGPHHLDEFKRIWAEYDPEAKGRIKHLDVVTLLRRIQPPLGFGKL	
Consenso	(251)	RDWSILGPHHLDEFKRIWAEYDPEAKGRIKHLDVVTLLRRIQPPLGFGKL	
		301	350
C1+GST_Secuenciado	(59)	CPHRVACKRLVSMNPLNSDGTVMFNATLFALVRTALRIKTEGNLEQANE	
C1+GST_Predicción	(301)	CPHRVACKRLVSMNPLNSDGTVMFNATLFALVRTALRIKTEGNLEQANE	
Consenso	(301)	CPHRVACKRLVSMNPLNSDGTVMFNATLFALVRTALRIKTEGNLEQANE	
		351	400
C1+GST_Secuenciado	(109)	ELRAI IKKIWKRTSMKLLDQVVPAGDDEVTVGKIFYATFLIQEYFRKFKK	
C1+GST_Predicción	(351)	ELRAI IKKIWKRTSMKLLDQVVPAGDDEVTVGKIFYATFLIQEYFRKFKK	
Consenso	(351)	ELRAI IKKIWKRTSMKLLDQVVPAGDDEVTVGKIFYATFLIQEYFRKFKK	
		401	450
C1+GST_Secuenciado	(159)	RKEQGLVGKPSQRNALS LQAGLRTLHDIGPEIRRAISGDLTAAEELD KAM	
C1+GST_Predicción	(401)	RKEQGLVGKPSQRNALS LQAGLRTLHDIGPEIRRAISGDLTAAEELD KAM	
Consenso	(401)	RKEQGLVGKPSQRNALS LQAGLRTLHDIGPEIRRAISGDLTAAEELD KAM	
		451	
C1+GST_Secuenciado	(209)	KEAVSAA	
C1+GST_Predicción	(451)	KEAVSAA	
Consenso	(451)	KEAVSAA	

Anexo 8. Alineación múltiple (AlignX) entre el constructo pGEX-2TKG/C1-terminal secuenciado y su predicción. En este caso, el producto de la secuenciación fue mas corto y contenía menos secuencia de GST.

		1		50
C2+GST_Secuenciado	(1)	-----		
C2+GST_Predicción	(1)	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGL		
Consenso	(1)			
		51		100
C2+GST_Secuenciado	(1)	-----		
C2+GST_Predicción	(51)	EFPNLPHYIDGDVKLTQSMATIRYIADKHNMLGGCPKERAEISMLEGAVL		
Consenso	(51)			
		101		150
C2+GST_Secuenciado	(1)	-----		
C2+GST_Predicción	(101)	DIRYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH		
Consenso	(101)			
		151		200
C2+GST_Secuenciado	(1)	-----		
C2+GST_Predicción	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPOIDKYLKSSKYIA		
Consenso	(151)			
		201		250
C2+GST_Secuenciado	(1)	-----VWISREFSGGGGGIREDDIFRRAGGLFG		
C2+GST_Predicción	(201)	WPLQGQWQATFGGDHPPKSDLVPRGSPGISGGGGIREDDIFRRAGGLFG		
Consenso	(201)	S SGGGGGIREDDIFRRAGGLFG		
		251		300
C2+GST_Secuenciado	(29)	NHVSYYQSDRSRFAFPQFTTTQRPLHISKAGNNQGDTESPSHEKLV DSTFT		
C2+GST_Predicción	(251)	NHVSYYQSDRSRFAFPQFTTTQRPLHISKAGNNQGDTESPSHEKLV DSTFT		
Consenso	(251)	NHVSYYQSDRSRFAFPQFTTTQRPLHISKAGNNQGDTESPSHEKLV DSTFT		
		301		350
C2+GST_Secuenciado	(79)	PSSYSSTGSNANINNANNTALGRLPRPAGYPSTVSTVEGHGSPLSPAVRA		
C2+GST_Predicción	(301)	PSSYSSTGSNANINNANNTALGRLPRPAGYPSTVSTVEGHGSPLSPAVRA		
Consenso	(301)	PSSYSSTGSNANINNANNTALGRLPRPAGYPSTVSTVEGHGSPLSPAVRA		
		351		400
C2+GST_Secuenciado	(129)	QEAAWKLSSKRCHSQESQIAMACQEGASQDDNYDVRIGEDAECCEPSP		
C2+GST_Predicción	(351)	QEAAWKLSSKRCHSQESQIAMACQEGASQDDNYDVRIGEDAECCEPSP		
Consenso	(351)	QEAAWKLSSKRCHSQESQIAMACQEGASQDDNYDVRIGEDAECCEPSP		
		401		450
C2+GST_Secuenciado	(179)	STEMLSYQDDENRQLAPPEEEKRDIRLSPKKGFLRSASLGRRASFHLECL		
C2+GST_Predicción	(401)	STEMLSYQDDENRQLAPPEEEKRDIRLSPKKGFLRSASLGRRASFHLECL		
Consenso	(401)	STEMLSYQDDENRQLAPPEEEKRDIRLSPKKGFLRSASLGRRASFHLECL		
		451		
C2+GST_Secuenciado	(229)	KRQKDQG		
C2+GST_Predicción	(451)	KRQKDQG		
Consenso	(451)	KRQKDQG		

Anexo 9. Alineación múltiple (AlignX) entre el constructo pGEX-2TKG/C2-terminal secuenciado y su predicción. En este caso, el producto de la secuenciación fue mas corto y contenía menos secuencia de GST.

		1		50
C3+GST_Secuenciado	(1)	-----		
C3+GST_Predicción	(1)	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEHLRYERDEGDKWRNKKFELGL		
Consenso	(1)			
		51		100
C3+GST_Secuenciado	(1)	-----	MLEGAVL	
C3+GST_Predicción	(51)	EFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAEIS	MLEGAVL	
Consenso	(51)		MLEGAVL	
		101		150
C3+GST_Secuenciado	(8)	DIRYGVSR IAYS KDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH		
C3+GST_Predicción	(101)	DIRYGVSR IAYS KDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH		
Consenso	(101)	DIRYGVSR IAYS KDFETLKVDFLSKLP EMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTH		
		151		200
C3+GST_Secuenciado	(58)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA		
C3+GST_Predicción	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA		
Consenso	(151)	PDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIA		
		201		250
C3+GST_Secuenciado	(108)	WPLQGWQATFGGGDHPKSDLVPRGSPGISGGGGGIRGDISQKTALPLHL		
C3+GST_Predicción	(201)	WPLQGWQATFGGGDHPKSDLVPRGSPGISGGGGGIRGDISQKTALPLHL		
Consenso	(201)	WPLQGWQATFGGGDHPKSDLVPRGSPGISGGGGGIRGDISQKTALPLHL		
		251		300
C3+GST_Secuenciado	(158)	VHHQALAVAGLSPLLQRSHSPTSLPRPCATPPATPGSRGWPPQPIPTLRL		
C3+GST_Predicción	(251)	VHHQALAVAGLSPLLQRSHSPTSLPRPCATPPATPGSRGWPPQPIPTLRL		
Consenso	(251)	VHHQALAVAGLSPLLQRSHSPTSLPRPCATPPATPGSRGWPPQPIPTLRL		
		301		350
C3+GST_Secuenciado	(208)	EGADSSEKLNSSFPSIHCGSWSGENSPCRGDSSAARRARPVSLTVPSQAG		
C3+GST_Predicción	(301)	EGADSSEKLNSSFPSIHCGSWSGENSPCRGDSSAARRARPVSLTVPSQAG		
Consenso	(301)	EGADSSEKLNSSFPSIHCGSWSGENSPCRGDSSAARRARPVSLTVPSQAG		
		351		400
C3+GST_Secuenciado	(258)	AQGRQFHGSASSLVEAVLISEGLGQFAQDPKFIEVTTQELADACDLTIEE		
C3+GST_Predicción	(351)	AQGRQFHGSASSLVEAVLISEGLGQFAQDPKFIEVTTQELADACDLTIEE		
Consenso	(351)	AQGRQFHGSASSLVEAVLISEGLGQFAQDPKFIEVTTQELADACDLTIEE		
		401		450
C3+GST_Secuenciado	(308)	MENAADDILSGGARQSPNGTLLPFVNRDPGRDRAGQNEQDASGACAPGC		
C3+GST_Predicción	(401)	MENAADDILSGGARQSPNGTLLPFVNRDPGRDRAGQNEQDASGACAPGC		
Consenso	(401)	MENAADDILSGGARQSPNGTLLPFVNRDPGRDRAGQNEQDASGACAPGC		
		451	474	
C3+GST_Secuenciado	(358)	GQSEEALADRRSYVSNL-----		
C3+GST_Predicción	(451)	GQSEEALADRRAGVSIKLNSHRD		
Consenso	(451)	GQSEEALADRRASVSL		

Anexo 10. Alineación múltiple (AlignX) entre el constructo pGEX-2TKG/C3-terminal secuenciado y su predicción.