

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Nohemi Adriana Camacho Concha
 Angelica Rueda y Sánchez de la Vega
 Correo E: arueda@cinvestav.mx

MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE RIANODINA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO POR IMPERATOXINA A

El ion Ca^{2+} es un segundo mensajero esencial que participa en diversos procesos celulares. Una fuente importante de Ca^{2+} se localiza en el retículo sarco/endoplásmico (RS/RE) de las células que constituyen los músculos esquelético, cardíaco y liso. En el RS/RE hay dos clases principales de canales que participan en la liberación de Ca^{2+} , el canal sensible a inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3R) y el canal sensible a rianodina (RyR). La participación del RyR en el proceso de excitación-contracción del músculo esquelético está bien establecida, en este proceso, la interacción molecular del RyR con el canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje (DHPR) -ambos localizados en las estructuras conocidas como triadas- induce el flujo de Ca^{2+} del RS/RE al citoplasma, dando lugar al proceso de contracción.

En condiciones *in vitro*, la porción citoplasmática del RyR presenta dos sitios de unión a Ca^{2+} : un sitio activador (afinidad en el rango de $\mu\text{mol/L}$) y un sitio inhibidor (afinidad superior a $100 \mu\text{mol/L}$) por lo que la actividad del RyR en función de diferentes concentraciones de Ca^{2+} presenta forma de campana (1), en donde se observan tres fases: la fase de activación, a concentraciones de $1\text{-}10 \mu\text{M}$; una meseta, que es el punto máximo de activación del RyR, a concentraciones de $10\text{-}100 \mu\text{M}$; y una fase de inactivación a concentraciones mayores a $100 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} .

Además de su agonista natural, el Ca^{2+} , se han descrito diferentes moduladores con eficacia positiva y negativa, de la actividad del RyR, tanto endógenos como exógenos. Dentro de los moduladores endógenos además del Ca^{2+} se encuentran varios iones como el Mg^{2+} , pequeñas moléculas como el ATP, y proteínas como la proteína cinasa A (PKA), la proteína de unión a FK506 (FKBP12), la sorcina y la calmodulina, entre otras y dentro de los moduladores exógenos se encuentran la cafeína, el dantroleno y la misma rianodina.

Se ha descrito que imperatoxina A (IpTx_a), un péptido de 33 aminoácidos aislado de veneno del

escorpión africano *Pandinus imperator* es capaz de modular la actividad del RyR de músculo esquelético de forma específica, rápida y reversible (1) características que la convierten en una herramienta farmacológica para estudiar la función fisiológica del RyR. Una forma sencilla para determinar el efecto de IpTx_a como modulador del RyR es a través de ensayos de unión a [^3H]-rianodina en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre, estos ensayos se realizan en tubos con $100 \mu\text{g}$ de proteína de músculo esquelético, con y sin IpTx_a (50 nM).

PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Para determinar el efecto de la IpTx_a en la actividad dependiente de Ca^{2+} del RyR se utilizó una preparación membranar enriquecida con RS ($100,000 \times \text{g}$) de músculo esquelético de rata. En los tubos de unión total, que se hacen por duplicado, en presencia y ausencia de IpTx_a , se agregó la solución amortiguadora ($\text{pH}=7.2$) con diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre indicadas en la Tabla 1, más [^3H]-rianodina 7 nM . Se inició la interacción receptor-ligando al agregar $100 \mu\text{g}$ de proteína microsomal y se incubó por 90 min a 37°C en agitación, para alcanzar el equilibrio. Posteriormente se filtró y se midió la cantidad de [^3H]-rianodina que permaneció unida a los microsomas usando el contador de centelleo líquido.

En los tubos de unión inespecífica se agregó todo lo anterior, más ligando no marcado radiactivamente ($20 \mu\text{M}$ de rianodina) y se procesó de la misma forma que los tubos en donde se determinó la unión total.

La Tabla 1 muestra los datos de radiactividad (en cuentas por minuto o cpm) que se obtuvieron tanto de los tubos de unión total como los de unión inespecífica de microsomas de músculo esquelético con diferentes concentraciones de Ca^{2+} , sin IpTx_a (Control).

La Tabla 2 muestra los datos de radiactividad que se obtuvieron tanto de los tubos de unión total como los de unión inespecífica, en presencia de 50 nM de IpTx_a .

TABLA 1
Radiactividad en ausencia de IpTx_a

[Ca ²⁺]-libre (μ M)	Unión total			Unión específica		
	cpm Serie 1	cpm Serie 2	Promedio	dpm	dpm	pmol/mg pt
0.1	1745.62	1658.66				
1	2071.21	1899.29				
10	2491.23	2455.68				
100	2501.82	2540.03				
1000	1759.92	1817.74				
10000	1920.31	1942.28				
Unión inespecífica						
0.1	1867.27					
1	1516.83					
10	1432.47					
100	1369.20					
1000	1643.09					
10000	1862.39					

TABLA 2
Radiactividad en presencia de 50 nM de IpTx_a

[Ca ²⁺]-libre (μ M)	Unión total			Unión específica		
	cpm Serie 1	cpm Serie 2	Promedio	dpm	dpm	pmol/mg pt
0.1	1700.72	1600.21				
1	2299.90	2291.60				
10	4618.11	4215.82				
100	4157.17	4292.20				
1000	1695.59	1651.10				
10000	1778.17	1828.68				
Unión inespecífica						
0.1	1671.19					
1	1631.12					
10	1421.49					
100	1361.43					
1000	1414.14					
10000	1739.09					

PREGUNTAS

1. Obtenga la unión específica en dpm de la condición control y de la condición con 50 nM de IpTx_a. Para esto realice el promedio de cada punto de la unión total y reste la unión no específica en ambas tablas de datos. Posteriormente convierta el promedio de cpm a desintegraciones por minuto (dpm) sabiendo que se usó un contador de centelleo líquido que tiene una eficiencia del 56.3% y tiene una basal de radiactividad de 18.3 cpm.
2. Sabiendo que un Curie (Ci) es igual a 2.2X10¹² dpm y que la [³H]-rianodina tiene una actividad específica de 56 Ci/mmol. Calcule la unión específica en pmoles de [³H]-rianodina/mg de proteína.
3. Grafique la unión específica con respecto al Ca²⁺ libre (unión específica en pmol/mg de proteína vs. [Ca²⁺] libre en μM) y determine si la IpTx_a está ejerciendo una modulación positiva o negativa sobre el RyR.
4. De acuerdo a la Ecuación 1 (2), que considera dos constantes, una de activación y otra de inactivación, donde X corresponde a la [Ca²⁺] libre, determine qué efecto tiene IpTx_a en: a) la concentración de Ca²⁺ a la cual se alcanza la

mayor actividad del RyR (B_{max}), la constante de activación (K_a), el coeficiente de Hill de activación (n_a), la constante de inactivación (k_i) y el coeficiente de Hill de inactivación (n_i).

$$y = \frac{B_{max}(X^{n_a})}{K_a^{n_a} + X^{n_a}} * \left(1 - \frac{X^{n_i}}{K_i^{n_i} + X^{n_i}}\right) \quad (\text{Ecuación 1})$$

RESPUESTAS AL PROBLEMA BIOQUIMICO

1. Para convertir las cuentas por minuto (cpm) a desintegraciones por minuto tenemos que realizar el promedio de cada punto, y este convertirlo a desintegraciones por minuto (dpm) teniendo en cuenta la eficiencia del contador de centelleo líquido y la basal de radioactividad del mismo.

$$dpm = \frac{(cpm \text{ totales} - \text{basal de radioactividad})}{0.563}$$

(Ecuación 2)

La unión específica para cada punto se obtiene de la resta de la unión total menos la unión inespecífica.

$$\text{unión específica} = \text{unión total} - \text{unión inespecífica}$$

(Ecuación 3)

TABLA 3

Radiactividad en ausencia de IpTx_a

[Ca ²⁺]-libre (μM)	Unión total				Unión específica	
	cpm Serie 1	cpm Serie 2	Promedio	dpm	dpm	pmol/mg pt
0.1	1745.62	1658.66	1702.14	2990.83	-293.30	-0.02
1	2071.21	1899.29	1985.25	3493.69	832.01	0.06
10	2491.23	2455.68	2473.46	4360.84	1849.00	0.15
100	2501.82	2540.03	2520.93	4445.16	2045.69	0.16
1000	1759.92	1817.74	1788.83	3144.81	258.86	0.02
10000	1920.31	1942.28	1931.30	3397.86	122.39	0.01
Unión inespecífica						
0.1	1867.27			3284.14		
1	1516.83			2661.69		
10	1432.47			2511.85		
100	1369.20			2399.47		
1000	1643.09			2885.95		
10000	1862.39			3275.47		

TABLA 4
Radiactividad en presencia de 50 nM de IpTx_a

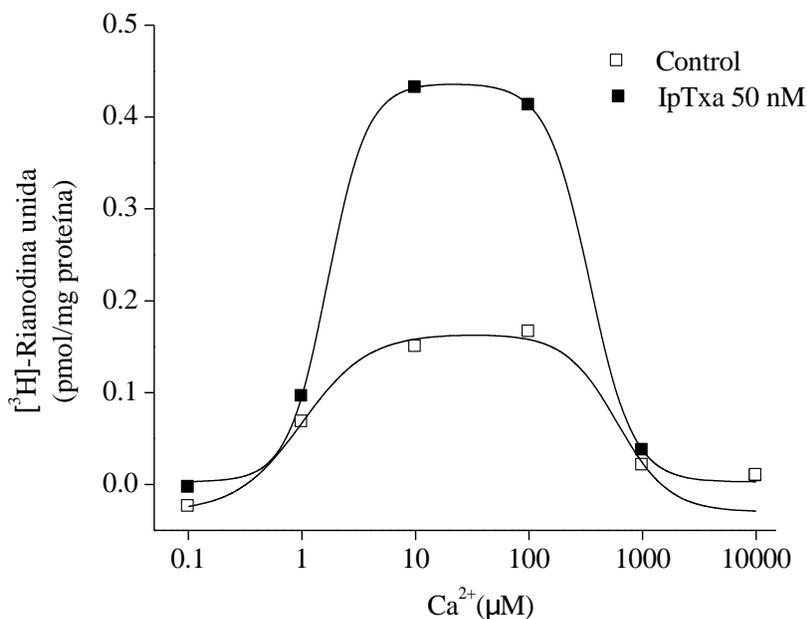
		Unión total			Unión específica	
[Ca ²⁺]-libre (μM)	cpm Serie 1	cpm Serie 2	Promedio	dpm	dpm	pmol/mg pt
0.1	1700.72	1600.21	1650.47	2899.05	-36.81	0.00
1	2299.90	2291.60	2295.75	4045.20	1180.52	0.10
10	4618.11	4215.82	4416.97	7812.90	5320.56	0.43
100	4157.17	4292.20	4224.69	7471.38	5085.71	0.41
1000	1695.59	1651.10	1673.35	2939.69	460.40	0.04
10000	1778.17	1828.68	1803.43	3170.74	114.27	0.01
Unión inespecífica						
0.1	1671.19			2935.86		
1	1631.12			2864.69		
10	1421.49			2492.34		
100	1361.43			2385.67		
1000	1414.14			2479.29		
10000	1739.09			3056.47		

Los valores quedaron como se muestran en las Tablas 3 y 4.

teína microsomal por tubo. Los valores obtenidos se muestran en las Tablas 3 y 4.

2. Teniendo la unión específica en dpm se debe convertir a pmol/mg de proteína considerando que un pmol de [³H]-rianodina (56 nCi) equivale a 123,200 dpm y que se usaron 100 μg de pro-

3. La gráfica de unión específica en pmol/mg de proteína vs [Ca²⁺] libre en μM, control y con IpTx_a, queda de la siguiente manera:



En cuadros blancos se observa la actividad del RyR en función de diferentes concentraciones de Ca^{2+} (Control), con forma de campana, apreciándose la fase de activación, donde la unión de ^3H -rianodina va en incremento, a concentraciones de $\sim 1 \mu\text{M}$; la meseta, en donde la unión de ^3H -rianodina alcanza un máximo, a concentraciones de $10\text{-}100 \mu\text{M}$ y la fase de inactivación, en donde la unión de ^3H -rianodina disminuye, a concentraciones mayores de $100 \mu\text{M}$. Cuando se agrega IpTx_a (cuadros negros) la curva de unión también presenta la forma de campana, sin embargo se observa un aumento en la unión máxima de ^3H -rianodina de aproximadamente 3 veces con respecto al control, la fase de activación e inactivación no se ven afectadas por la presencia de IpTx_a , por lo que la IpTx_a incrementa la actividad del RyR sin cambiar aparentemente su dependencia a Ca^{2+} .

4. Al realizar el ajuste a la Ecuación 1 se obtienen los siguientes valores:

Donde: B_{max} es el valor máximo que alcanza la unión de ^3H -rianodina; K_a y K_i son las constantes de activación e inactivación; n_a y n_i son los coeficientes de Hill de activación e inactivación. Entonces, IpTx_a aumenta la unión máxima de ^3H -rianodina (B_{max}), lo que indica que hay un mayor número de RyR activos. Sin embargo, IpTx_a no altera las constantes de activación e inactivación ni los coeficientes de Hill. Esto sugiere que IpTx_a ejerce un efecto estimulante permitiendo que se activen más RyR a una misma concentración de Ca^{2+} libre.

REFERENCIAS

1. El-Hayek R, Lokuta A, Arevalo C, Valdivia H. (1995) Peptide probe of ryanodine receptor function. *J Biol Chem* 270:28696-28704.
2. Fernández-Velasco M, Rueda A, Rizzi N, Benitah JP, Colombi B, Napolitano C, Priori SG, Richard S, Gómez AM (2009) Increased Ca^{2+} sensitivity of the ryanodine receptor mutant RyR2R4496C underlies catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ Res* 104:201-9.

TABLA 5

VARIABLE	CONTROL	IpTx_a
B_{max} (pmol/mg proteína)	0.19 ± 0.02	0.43 ± 0.01
K_a (μM)	1.24 ± 0.50	1.68 ± 0.09
n_a	1.5	2.5
K_i (μM)	598.46 ± 199.97	343.28 ± 46.89
n_i	1.9	2.3