



Universidad de Chile
Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Laboratorio Transducción de Señales



MECANISMOS DE DEGRADACION DEL RECEPTOR DE RYANODINA TIPO 2: PARTICIPACION DE LA AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO
NATALIA BELEN TORREALBA CARDENAS

Profesor Patrocinante

Dr. Sergio Lavandero G.

Directores de Tesis

Dra. Zully Pedrozo C.

Dr. Sergio Lavandero G.

Santiago, Chile

Diciembre 2011

“Son vanas y están plagadas de errores las ciencias que no han nacido del experimento, madre de toda certidumbre”.

Leonardo da Vinci (1452-1519).

FINANCIAMIENTO

Esta memoria de pregrado se realizó en el Laboratorio de Transducción de Señales del Centro Estudios Moleculares de la Célula (CEMC), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile y contó con el financiamiento de los siguientes proyectos:

Proyecto FONDAP 15010006

Proyecto FONDECYT 1040717

Proyecto Post-Doctoral FONDECYT 3110039

AGRADECIMIENTOS

Les agradezco a mis directores de tesis, el Dr. Sergio Lavandero por la inspiración a comenzar mi camino en la ciencia y la Dra. Zully Pedrozo por toda su dedicación, enseñanza y amistad desde mi llegada al laboratorio.

A los miembros de mi comisión, el Dr. Mario Chiong con el cual aprendí algo nuevo por cada conversación, y el Dr. Alfonso Paredes por su buena disposición.

Quiero agradecer especialmente a mi familia por el apoyo incondicional y el inmenso amor. A mi madre M^a Eugenia y a mi padre Jorge, que nos enseñaron y enseñan a mí y a mis hermanos lo más importante, además de dedicarnos la vida día a día. Jorge y Daniela mis apoyos fraternales, que a pesar de ser yo la mayor, ellos me cuidan de igual manera a mí. A mis abuelas Jovita y Marta, mujeres cariñosas y ejemplares que siempre nos hacen sentir especiales.

También a mis amigas del colegio, especialmente Natalia y Marcela, que están conmigo a pesar del tiempo y las circunstancias.

A mis amigos de carrera, Roberta, Valentina, Katherina, Sergio, Mario, Byron y demás ¡colegas!, por todos estos años de buenos momentos, risas, amistad y compañía.

A mis compañeros de laboratorio por las conversaciones que hacen el trabajo, los almuerzos y los días más cortos, especialmente a Zully, Carolina y Damián que me hacen sentir como en casa.

Y por último, pero no menos importante, a Jose por todos estos años de amistad, amor e ilusión.

1. INDICE GENERAL	Páginas
1.- INDICE GENERAL	6
2.- INDICE DE FIGURAS	8
3.- ABREVIATURAS	9
4.- RESUMEN	10
5.- SUMMARY	12
6.- INTRODUCCIÓN	
6.1.- Generalidades	13
6.2.- Receptor de ryanodina tipo 2 (RyR2)	13
6.3.- Mecanismos de degradación proteica	14
6.4.- Degradación de proteínas cardiacas	17
6.5.- Autofagia	18
6.6.- Geldanamicina y autofagia mediada por chaperonas	20
6.7.- Estrés oxidativo	21
6.8.- RyR2 y autofagia mediada por chaperonas	21
7.- HIPOTESIS	23
8.- OBJETIVO GENERAL	23
9.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
10.- MATERIALES Y METODOS	
10.1.- Cultivos primarios	24
10.2.- Extracción de proteínas y análisis del Western blot	26
10.3.- Fraccionamiento subcelular	27
10.4.- Detección de proteínas carboniladas	27
10.5.- Otros procedimientos	28

10.6.- Análisis estadístico	28
11. RESULTADOS	
11.1.- Geldanamicina induce la aparición del RyR2 en la fracción citosólica	29
11.2.- Efectos de geldanamicina en la generación de especies reactivas del oxígeno	22
11.3.- Geldanamicina induce estrés oxidativo y daño a proteínas en los cardiomiocitos	34
11.4.- El aumento de especies reactivas del oxígeno depende de geldanamicina e induce la degradación del RyR2 pero no activa la autofagia mediada por chaperonas	36
11.5.- Las calpaínas no participan en la proteólisis del RyR2 inducida por geldanamicina	38
11.6.- Participación de presenilinas en la proteólisis del RyR2 dependiente de geldanamicina	42
12.- DISCUSION	
12.1.- Presencia del RyR2 en el citoplasma durante la activación de la autofagia mediada por chaperonas por geldanamicina	44
12.2.- Participación de las especies reactivas del oxígeno en autofagia mediada por chaperonas activada por geldanamicina	45
12.3.- Participación de proteasas en la degradación del RyR2 a través de la autofagia mediada por chaperonas activada por geldanamicina	46
12.4.- Autofagia mediada por chaperonas, una vía degradativa alternativa para proteínas de membrana	47
12.5.- Relación entre la disminución de los niveles del RyR2 y las cardiomiopatías	48
13.- CONCLUSIONES	51
14.- REFERENCIAS	52

2. INDICE DE FIGURAS

Figura A.- Estructura del RyR2 en la membrana del retículo sarcoplasmático	14
Figura B.- Estructura de la geldanamicina	20
Figura 1.- Efecto de la geldanamicina en la proteólisis y localización del RyR2 en cardiomiocitos	31
Figura 2.- Efecto de geldanamicina en la generación de especies reactivas del oxígeno en los cardiomiocitos	33
Figura 3.- Efecto de la geldanamicina en la determinación de los niveles de proteínas carboniladas en los cardiomiocitos	35
Figura 4.- Efecto de la producción de especies reactivas del oxígeno dependiente de geldanamicina en la activación de la autofagia mediada por chaperonas	37
Figura 5.- Efecto de la inhibición de cisteína proteasas en la degradación de RyR2	40
Figura 6.- Efecto de la geldanamicina en la proteólisis de α -espectrina	41
Figura 7.- Participación de presenilinas en la proteólisis de RyR2 dependiente de geldanamicina	43
Figura 8.- Modelo	50

3. ABREVIATURAS

AMC	Autofagia mediada por chaperonas
CE	Compuesto E
DHPR	Receptor de dihidropiridinas
DMEM	Medio de cultivo modificado Eagle Dulbecco
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EROs	Especies reactivas del oxígeno
GA	Geldanamicina
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
HCl	Ácido clorhídrico
Hsc70	“Heat shock cognate 71 KDa”, chaperona
Hsp90	“Heat shock protein 90 KDa”, chaperona
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical de humano
I/R	Isquemia/reperfusión
Io	Ionomicina
KO	“Knock-out”
LAMP-2A	Proteína asociada a la membrana lisosomal tipo 2A
LE	Leupeptina
M199	Medio 199
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloruro de sodio
PBS	Amortiguador fosfato salino
PS1 y 2	Presenilina 1 y 2
PVDF	Polivinilideno de difluorido
RIP	Proteólisis intramembrana regulada
RyR2	Receptor de Ryanodina tipo 2
SEM	Error medio estándar

4. RESUMEN

Mecanismos de degradación del receptor de ryanodina tipo 2: Participación de la autofagia mediada por chaperonas.

El receptor de ryanodina tipo 2 (RyR2) desempeña un papel crucial en el corazón ya que permite la salida de calcio desde el retículo sarcoplasmático para activar la contracción, por tanto la regulación de sus niveles es vital para el buen funcionamiento del cardiomiocito. El RyR2 cardiaco se degrada en patologías como la isquemia/reperfusión (I/R), por tanto el balance entre los diferentes sistemas de degradación de proteínas puede ser trascendental en su homeostasis.

Para determinar si el lisosoma, a través de la autofagia mediada por chaperonas (AMC) participa en la degradación del RyR2 se utilizaron cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas estimuladas con geldanamicina (GA). Esta droga es un clásico inductor de esta vía degradativa.

En presencia de GA, el contenido del RyR2 disminuye 50% respecto al control. La prevención del aumento de especies reactivas del oxígeno (EROs) generadas por GA evitó la degradación del RyR2. Sin embargo, esta inhibición de EROs no impidió la activación de la AMC observados previamente en presencia de GA. Por otra parte, la presencia de GA aumentó la aparición de fragmentos del RyR2 en el citosol, lo cual no se observó al inhibir la generación de EROs.

A diferencia de lo observado en el modelo de I/R, las calpaínas no estarían implicadas en la proteólisis del RyR2, dado que no se observó aumento en su activación en presencia de GA. Sin embargo, se determinó la participación de las presenilinas en la proteólisis del RyR2 durante el estímulo con GA.

El conjunto de estos datos sugieren que el aumento de las EROs podrían mediar la oxidación de RyR2. Las presenilinas podrían estar implicadas en la proteólisis intramembrana que permitiría la salida de los fragmentos de RyR2 al citosol para su posterior degradación a través de la autofagia mediada por chaperonas.

5. SUMMARY

Degradative mechanisms of ryanodine receptor type 2: role of chaperone-mediated autophagy.

Ryanodine receptor type 2 (RyR2) has a key role in the heart, releasing calcium from the sarcoplasmic reticulum to activate myocardial contraction. Therefore, RyR2 level and activity are required for the proper cardiomyocyte function and an adequate balance between its synthesis and degradation is important in calcium homeostasis.

Our aim was to determine the involvement of chaperone-mediated autophagy (CMA) on RyR2 degradation. To test this, primary cultured cardiomyocytes were exposed to geldanamycin (GA) to induce CMA.

Our results show that GA decreased in 50% RyR2 level as compared to control. The antioxidant n-acetyl cysteine also prevented RyR2 degradation but no increase in LAMP-2A levels were observed. ROS inhibition also induced a decrease in cytosolic fragments of RyR2.

No increase in calpain activity was detected using α -spectrin as specific substrate. However, the role of presenilin on RyR2 degradation was evidenced using the specific inhibitor compound E.

Taken together, these data suggest that ROS increase could mediate RyR2 oxidation and presenilins could be implicated in RyR2 intramembrane proteolysis which allowed the release of RyR2 fragments to the cytosol and to induce its degradation through CMA.

6. INTRODUCCIÓN

6.1 Generalidades

El corazón es el órgano responsable de bombear la sangre hacia el resto del cuerpo a través de contracciones y relajaciones repetidas (sístoles y diástoles, respectivamente). Las células encargadas de generar dicho movimiento son los cardiomiocitos.

Distintas proteínas están implicadas en la contracción del cardiomiocito, entre ellas se encuentra el canal de calcio inserto en la membrana del retículo sarcoplasmático denominado receptor de ryanodina tipo 2 (RyR2). Este receptor es responsable de la salida del Ca^{+2} desde el interior del retículo hacia el citoplasma, activado por una respuesta del tipo “liberación de calcio inducida por calcio” (1-2).

Variaciones en los niveles proteicos del RyR2 podrían afectar la homeostasis del calcio y consecutivamente la correcta contracción del cardiomiocito (3). Se ha demostrado su vital importancia en el desarrollo embrionario del corazón (4), por lo tanto la disminución en su contenido observado en patologías como la diabetes mellitus (5) y la I/R (6) en modelo animal, deben tener consecuencias importantes aún no estudiadas en profundidad. Por lo tanto, es de vital importancia conocer las vías a través de las cuales el RyR2 es degradado.

6.2 Receptor de ryanodina tipo 2 (RyR2)

Los receptores de ryanodina (RyRs) son tetrámeros, donde cada subunidad tiene una masa aproximada de 560 KDa. Se encuentran insertos en

la membrana del retículo sarcoplasmático (Fig. A) y son responsables de la liberación de calcio desde reservorios intracelulares durante la excitación-contracción en los músculos esquelético y cardíaco (7).

En mamíferos se han descrito tres isoformas del RyR; siendo la isoforma 2 (RyR2) la que se expresa en el corazón (8). Aproximadamente el 90% de la cadena polipeptídica del RyR2 forma un dominio citoplasmático voluminoso. El 10% restante de la secuencia del RyR (región C-terminal) constituye la región transmembrana y el poro del canal (7).

Durante algunas patologías cardíacas como la isquemia/reperfusión, esta proteína es rápidamente degradada, lo que podría traer como consecuencia una disfunción cardíaca y un mayor grado de muerte de los cardiomiocitos posterior a la isquemia/reperfusión (6).

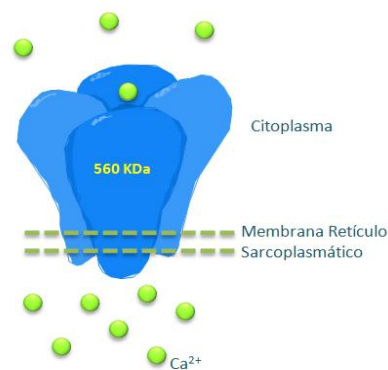


Figura A. Estructura del RyR2 en la membrana del retículo sarcoplasmático. Se observa el gran dominio citoplasmático que conforma la estructura de esta proteína.

6.3 Mecanismos de degradación proteica

Todas las células, incluido los cardiomiocitos deben mantener un equilibrio entre la síntesis y la degradación de todos sus componentes incluyendo proteínas y organelos. Al encontrarse sometidas constantemente a

diferentes tipos de estrés, los cuales pueden ocasionar daño y mal plegamiento de las proteínas, las células deben contar con un sistema de control de calidad. Esta evaluación se lleva a cabo por la acción coordinada de las chaperonas y sistemas proteolíticos, para así mantener la homeostasis celular.

Cuando se detectan conformaciones proteicas anormales o inestables, las chaperonas son las encargadas de inducir un correcto plegamiento. Sin embargo, si el proceso de reparación no es efectivo, las proteínas aberrantes deben ser eliminadas para evitar interacciones que lleven a la formación de complejos tóxicos para la célula. La degradación de estas proteínas o aquellas que han cumplido su ciclo de vida se lleva a cabo a través de 2 vías: el proteosoma y/o el lisosoma. En algunos casos se requiere además la acción de las proteasas como parte de estos sistemas de degradación (9-10).

En el caso de las proteínas del lumen de los organelos, como el lisosoma y las mitocondrias la degradación depende de la actividad de proteasas luminales. En cambio las proteínas del retículo endoplasmático requieren una retrotranslocación hacia el citoplasma para su posterior degradación a través de la vía proteosomal.

Existe gran debate respecto a los mecanismos por los que se degradan las proteínas de membrana, como las presentes en el retículo endoplasmático. Diferentes estudios indican que el proteosoma sería el principal protagonista en la degradación de estas proteínas (11-12). Sin embargo, otras investigaciones han revelado que algunas proteasas son necesarias para la extracción de estas proteínas desde la membrana hacia el citoplasma, donde el proteosoma u otros mecanismos como el lisosoma, podrían degradar los péptidos previamente proteolizados (13). De acuerdo a estos antecedentes, el lisosoma podría

constituir una vía degradativa alternativa para este tipo de proteínas. Sin embargo, existen pocos estudios que hayan indagado tal posibilidad.

La degradación de proteínas a través del lisosoma se denomina autofagia (14). Este proceso participa en la degradación de proteínas de vida media larga y organelos, especialmente en condiciones patológicas, mientras que la vía proteosomal se encarga principalmente de las proteína de vida media corta y proteínas mal plegadas o agregadas (15).

Por otra parte, las proteasas desempeñan un papel clave en la degradación de proteínas. En el caso de las proteínas de membrana del retículo endoplasmático, varias de ellas requieren la acción previa de estas enzimas antes de su degradación proteosomal o lisosomal. Las calpaínas y las caspasas son proteasas que participan en la proteólisis de diversas proteínas (16-17). Como se mencionó anteriormente durante la isquemia/reperfusión cardíaca se genera daño y degradación de diversas proteínas, entre las que se encuentra el RyR2.

Nuestro laboratorio ha mostrado la degradación del RyR2 en los cardiomiocitos sometidos a I/R, ocurre a través de las calpaínas y el proteosoma (6). Datos de nuestro laboratorio indican además, que bajo otros estímulos, el lisosoma podría ser la vía implicada en la degradación de esta proteína.

Por otra parte, existen otras proteasas que realizan cortes intramembrana, llamadas Reguladoras de la Proteólisis Intramembrana (RIP) (18). Las RIP están formadas por cuatro familias de proteasas, cada una denotada por la enzima que tipifica cada grupo: sitio-2 proteasa (S2P) metaloproteasas, γ -secretasa y aspártico proteasas, señal péptido peptidasa (SPP) y las romboide serina proteasas (19).

Las presenilinas (PS) son aspártico proteasas que forman parte del centro catalítico del complejo γ -secretasa (20). Se conocen dos isoformas PS1 y PS2, éstas son proteínas integrales de membrana y en tejido cerebral se localizan predominantemente en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi (21). Las presenilinas se encuentran expresadas en humanos y ratas en diversos tejidos, incluyendo el corazón (22). En la literatura se describe su participación en el acoplamiento de la excitación-contracción por su interacción con el RyR2 en corazón (18). Se ha observado colocalización de ambas proteínas (PS2 y RyR2) en el retículo sarcoplasmático durante la liberación de calcio en neuronas así como la coinmunoprecipitación de la porción N-terminal y C-terminal de PS2 y la porción N-terminal de PS2 con el RyR (23).

En resumen, se conoce que las presenilinas interactúan y regulan la función del RyR2. Sin embargo, se desconoce si su actividad proteasa podría estar implicada en la degradación de este canal de calcio.

6.4 Degradación de proteínas cardíacas

Todos los sistemas de degradación de proteínas mencionados previamente; proteosoma y lisosoma además de distintas proteasas, están presentes en el tejido cardíaco (24-25)

Las calpaínas y las caspasas son proteasas que participan en la proteólisis de distintas proteínas. En la isquemia/reperfusión cardíaca se genera daño y degradación de diversas proteínas, entre las que se cuenta al RyR2. En este modelo, su degradación está mediada por calpaínas y el sistema ubiquitina-

proteosoma (6). Esto podría alterar la señalización de calcio en el corazón y contribuye a los efectos adversos de la remodelación producida por I/R (6).

6.5 Autofagia

La autofagia es una vía catabólica que sirve principalmente como un proceso adaptativo y protector en diferentes tipos de enfermedades, incluyendo las patologías cardíacas. Sin embargo, también puede contribuir a la muerte celular cuando se produce una desmesurada activación (26).

Se encuentran descritos tres tipos de autofagia; la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (AMC). Se define como macroautofagia a la degradación no selectiva de proteínas u organelos a través de la formación *de novo* de vacuolas de doble membrana o autofagosomas. Durante el proceso, esta membrana se elonga envolviendo a las proteínas u organelos que irán a degradación para finalmente fusionarse con el lisosoma, conformando el autofagolisosoma o autolisoma (15).

La microautofagia es constitutiva y se caracteriza porque el propio lisosoma engloba tanto proteínas solubles como organelos completos (27-28)

La AMC es una autofagia inducible y selectiva por la cual proteínas citoplasmáticas son degradadas en el lisosoma (29). Cuando esta vía se activa, las proteínas a ser degradadas, son reconocidas a través de una secuencia de 5 aminoácidos (KFERQ) (30), o una bioquímicamente relacionada, por las chaperonas Hsc70 y las cochaperonas Hsp40. Estas chaperonas las marcan y las conducen a los lisosomas para su posterior degradación (31). El lisosoma posee en su membrana el receptor lisosomal asociado a la membrana tipo 2A (LAMP-2A), el cual reconoce las proteínas a ser degradadas y permite la translocación de las mismas al lumen de este organelo (32). El mecanismo por el cual interaccionan las proteínas sustrato y el receptor lisosomal del AMC es

aún desconocido. Sin embargo, se encuentra descrito que el bloqueo de este transportador por medio de anticuerpos internalizados por endocitosis resulta en la inhibición de la AMC (33).

La AMC puede presentar actividad basal en algunos tejidos, pero su máxima activación ocurre en respuesta a diferentes estresores como la privación prolongada de nutrientes (34), exposición a compuestos tóxicos (35) o estrés oxidativo (36). Esta activación es dependiente del tejido. En el ser humano se activa preferencialmente la AMC en hígado, riñón, bazo y corazón (26).

Un marcador de la activación de esta vía es el aumento en los niveles de Hsc70 y LAMP-2A y su colocalización. Por otra parte, la unión de los sustratos con el receptor LAMP-2A es el paso limitante para la degradación de proteínas a través de esta vía (37).

6.6 Geldanamicina y autofagia mediada por chaperonas

Se ha descrito la activación experimental de la AMC del fibroblasto a través un compuesto exógeno denominado geldanamicina (GA) (38). Esta benzoquinona ansamicina, es un antibiótico que presenta actividad antitumoral y es producido por las bacterias *Streptomyces hygroscopicus* variedad *geldanus* (39).

Tanto la geldanamicina como sus derivados son utilizados como drogas anticancerígenas debido a su acción inhibitoria sobre la actividad ATPasa de las Hsp90 “chaperone heat shock protein”. La disminución en la actividad o la inactivación de esta chaperona induce desplegamiento de las proteínas y exposición de residuos que actúan como señales de degradación reconocidas por chaperonas implicadas en la AMC, la cual bajo estas condiciones es activada (40).

Por otra parte, la GA posee en su estructura un grupo quinona (Fig. B) que genera el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Parte de la citotoxicidad de estas drogas del tipo ansamicina se atribuye a la generación de dichos radicales libres (41).

Hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto a través del cual la geldanamicina activa la AMC.

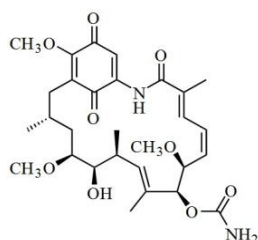


Figura B. Estructura de la geldanamicina.

6.7 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se considera un determinante clave en la fisiopatología de numerosas enfermedades, incluyendo las cardiovasculares.

Con respecto a la autofagia se ha observado que cuando se induce estrés oxidativo existe la participación de los lisosomas en la eliminación de las proteínas oxidadas y una de las vías activadas es la de la AMC. La activación de esta última por estrés oxidativo se logra a través de la regulación de los componentes específicos del complejo de translocación lisosomal, chaperonas y el receptor de la membrana lisosomal (36). Sin embargo, aún se desconoce si dicha activación se debe a la regulación directa de algún componente clave de esta vía o debido al aumento de proteínas oxidadas que constituye un sustrato para la AMC.

6.8 RyR2 y autofagia mediada por chaperonas

Debido a la importancia que conlleva la regulación de los niveles del RyR2 para una apropiada función cardíaca, nuestro Laboratorio está indagando las vías que podrían mediar la degradación de este canal de calcio. Conforme a esto, nuestros datos muestran que cuando los cardiomiocitos presentan aumentada la actividad de la AMC por estímulo con GA, en paralelo existe una disminución de los niveles del RyR2. También sugieren que el lisosoma, a través de la autofagia mediada por chaperonas, sería la vía implicada en la disminución de dichos niveles del RyR2.

Se ha descrito que la AMC interviene sólo en la degradación de proteínas citoplasmáticas (29, 42). En esta tesis se ha planteado como objetivo estudiar

cómo una proteína de membrana como el RyR2 puede ser conducida por la vía de la AMC hasta el lisosoma para su posterior degradación.

En la búsqueda de nuevas vías involucradas en la degradación de proteínas de membrana, nuestro grupo de trabajo investigó sobre la participación de la AMC como vía alternativa al proteosoma para el RyR2. Sin embargo, aún se desconocen cuáles son los mecanismos responsables y cómo esta proteína integral de membrana es conducida hasta el lisosoma para la degradación vía AMC.

7. HIPOTESIS

“La degradación del receptor de ryanodina tipo 2 a través de la autofagia mediada por chaperonas depende de la generación de especies reactivas de oxígeno, activación de las calpaínas y/o proteólisis intramembrana en el cardiomiocito.”

8. OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de las especies reactivas de oxígeno, calpaínas y proteólisis intramembrana en la degradación del receptor de ryanodina tipo 2 a través de la autofagia mediada por chaperonas en cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas.

9. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Estudiar si la generación de especies reactivas de oxígeno se relaciona con la degradación del RyR2 a través de la autofagia mediada por chaperonas.
- Investigar el papel de las calpaínas en la degradación del RyR2 a través de la autofagia mediada por chaperonas.
- Determinar si la proteólisis intramembrana del retículo sarcoplasmático se requiere para la degradación del RyR2 a través de la autofagia mediada por chaperonas.

10. MATERIALES Y METODOS

10.1 Cultivos primarios

Todos los experimentos fueron aprobados por el Comité de Uso y Cuidado animal de la Universidad de Chile y conforme a la Guía de Uso y Cuidado de animales de laboratorio publicado por los Institutos Nacionales de Salud (NIH Publication N° 85–23, 1996).

Los cardiomiocitos se aislaron de corazones de ratas Sprague Dawley neonatas de 1 a 3 días, utilizando pancreatina (1,2 mg/mL) y colagenasa (0,2 mg/mL) como enzimas de digestión (43). Las células obtenidas se preplaquearon para separar los cardiomiocitos de los otros tipos celulares y se sembraron en placas de 35 mm ó 100 mm (Falcon, BD Biosciences, Oxford, UK) precubiertas con gelatina, conteniendo una cantidad de células determinadas, $1,0$ u $8,0 \times 10^6$ células/placa, respectivamente. Las células se mantuvieron por 24 h previas al experimento en medio de cultivo modificado Eagle Dulbecco y medio M199 (DMEM/M199; proporción 4/1), que contienen suero fetal bovino al 10%.

Los cultivos primarios estaban conformados por un 95% de cardiomiocitos, lo cual se evaluó morfológicamente o a través de un anticuerpo contra la cadena pesada de la β -miosina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), descrito anteriormente.(44)

Las células se mantuvieron en un incubador con una atmósfera de 95% O₂ y 5% CO₂.

La pancreatina, DMEM, M199, 123-dihidrorodamina, E64d, N-acetilcisteína, ionomicina se obtuvieron de Sigma-Aldrich Corp St Louis, MO, USA. Geldanamicina se adquirió de Enzo Life Science Inc. Farmingdale, NY, USA. La leupeptina, pepstatina A metil ester y el compuesto E, se adquirieron en Merck & Co. Whitehouse Station, NJ, USA. El kit de detección de proteínas carboniladas, Oxyblot se adquirió de Millipore Corp., Bedford, MA, USA. La colagenasa se adquirió de Invitrogen, Paisley, Scotland, y el suero fetal bovino de Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel.

10.2 Extracción de proteínas y análisis del Western blot

Posterior a los estímulos, las células se sembraron y se lavaron con PBS frío para eliminar restos celulares. Los cardiomiocitos se cosecharon luego de la adición del amortiguador de lisis (en mM): Tris-HCl (75), NaCl (225), EDTA (1,5), Nonidet P-40 (4,5%, w/v), vanadato de sodio (5), fluoruro de sodio (40), fosfato de sodio (10), y un conjunto de inhibidores de proteasas (Complete, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania); pH 7,4 final. El lisado se centrifugó a 4 °C por 10 min a 10,000 x g, recuperándose el sobrenadante. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE en geles en gradiente 3,5-8% para RyR2 y LAMP-2A, geles al 15% para α -espectrina. Luego de la electroforesis, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de PVDF (Millipore Corp., Bedford, MA, USA).

Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-RyR2 (Affinity Bioreagents Inc. Golden, CO, USA y Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA), anti-LAMP-2A (Zymed laboratorios, San Francisco, CA, USA), anti- β -actina (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA), anti- α -espectrina (Millipore Corp., Bedford, MA, USA), anti-DHPR (Receptor de Dihidropiridina, Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA), anti-gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA). Luego de la incubación con el anticuerpo secundario respectivo, la reacción antígeno anticuerpo se detectó por quimioluminiscencia (Amersham, Biosciences, Uppsala, Suecia) y se cuantificó por análisis densitométrico con el programa Quantity One (BioRad, Hercules, CA, USA). Los resultados se normalizaron respecto a la cantidad de β -actina o α -espectrina total.

10.3 Fraccionamiento subcelular

Posterior a los estímulos, las células se lavaron con PBS 1x frío y se cosecharon luego de la adición de amortiguador de lisis MOPS-Sacarosa (MOPS-Tris 20 mM, Sacarosa 0,3 M, pH 7,0) junto al inhibidor de proteasas (Complete, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Las células se homogeneizaron y sonicaron por 2 min. Posteriormente se realizó una centrifugación por 5 min a 2000 x g a 4 °C para eliminar las células no lisadas y restos no solubles. El sobrenadante se centrifugó en una ultracentrífuga a 100.000 x g, por 1 h a 4 °C. El sobrenadante obtenido corresponde a la fracción citosólica y la pella a la porción enriquecida en membrana que se reconstituyó con 100 µl de amortiguador MOPS-Sacarosa con inhibidores de proteasas. Todas las muestras posteriormente fueron analizadas a través de Western blot.

10.4 Detección de proteínas carboniladas

Posterior a los estímulos, las células se lavaron con PBS 1x frío y se cosecharon luego de la adición de amortiguador de lisis (en mM): Tris-HCl (75), NaCl (225), EDTA (1,5), Nonidet P-40 (4,5%, w/v), vanadato de sodio (5), fluoruro de sodio (40), fosfato de sodio (10), y un conjunto de inhibidores de proteasas (Complete, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania); pH 7,4 final. El lisado se centrifugó a 4 °C por 10 min a 10,000 x g, recuperándose el sobrenadante. Posteriormente se utilizó el kit de detección de proteínas carboniladas, Oxyblot (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Este kit permite el reconocimiento inmunológico de los grupos carbonilo a través de la derivatización de estos grupos a 2,4-dinitrofenilhidrazonas al reaccionar con 2,4-dinitrofenilhidrazina, procedimiento que se realizó anterior al Western blot tradicional.

10.5 Otros procedimientos

Las especies reactivas de oxígeno, radicales hidroxilo o superóxido, se detectaron utilizando la sonda 123-dihidrorodamina (Sigma-Aldrich Corp. St Louis, MO, USA). Esta sonda al oxidarse por las especies reactivas del oxígeno es capaz de ser detectada a través de citometría de flujo.

La cuantificación de proteínas se determinó a través del método Lowry descrito previamente (45).

Las incubaciones con GA (2 μM) para la medición de especies reactivas del oxígeno se realizaron por 2 h. El resto de los experimentos se llevaron a cabo por 6 h, los distintos inhibidores: N-acetilcisteína (NAC 3 mM), leupeptina (LE 10 μM), E64d (15 μM), pepstatina A metil ester (PME 28 μM), compuesto E (CE 10 nM) se incubaron por 30 min, anterior a la coincubación con GA (2 μM). El ionóforo ionomicina (0,5 y 1 μM) se incubó por los últimos 30 min de la incubación de 6 h con GA (2 μM).

10.6 Análisis estadístico

Los datos mostrados corresponden al promedio \pm S.E.M. de un determinado número de repeticiones independientes (n). Los datos se analizaron por ANOVA de una vía seguido por un test Tukey. Las diferencias se consideran significativas cuando $P < 0,05$.

11. RESULTADOS

Como se mencionó anteriormente, trabajos previos de nuestro Laboratorio indican que GA activa la AMC en cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas, lo que provoca degradación del RyR2 a través de esta vía.

11.1 Geldanamicina induce la aparición del RyR2 en la fracción citosólica

Siendo la AMC una vía de degradación de proteínas solubles del citoplasma, el primer paso para determinar el mecanismo por el cual una proteína de membrana como el RyR2 puede ser degradado a través de esta vía es averiguar si esta proteína o fragmentos proteolizados de la misma pudieran aparecer en el citoplasma luego del tratamiento con GA (2 μ M) por 6 h. Para ello se realizó centrifugación diferencial de las muestras estimuladas con esta droga.

En las muestras provenientes de una fracción enriquecida en membranas se observó la señal del RyR2 en su tamaño correspondiente a 560 KDa, tanto en los controles como los estimulados con GA. Los niveles del RyR2 en la fracción de membrana proveniente de muestras estimuladas con GA se presentan disminuidos con respecto a la de los controles. Los resultados obtenidos desde la fracción citosólica indican la presencia del RyR2 y al parecer fragmentos proteolizados del mismo, tanto en las muestras controles como en las muestras estimuladas con GA. Sin embargo, las muestras estimuladas con GA presentan un mayor nivel de dichos fragmentos (Figura 1).

Los resultados sugieren que GA podría aumentar la aparición de la proteína completa en citoplasma así como sus fragmentos, encontrándose disponible para ser degradado a través de la AMC. Ésto se llevaría a cabo a través de un posible aumento en la proteólisis del RyR2 a través de proteasas. Por lo tanto los resultados de fraccionamiento celular más que ser determinantes sugirieron el camino a seguir.

Para determinar la pureza de las preparaciones se determinó la presencia de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) presente sólo en citoplasma como marcador de la porción citosólica y la presencia del receptor de dihidropiridinas (DHPR) presente sólo en membrana como marcador de la fracción de membranas (Fig. 1).

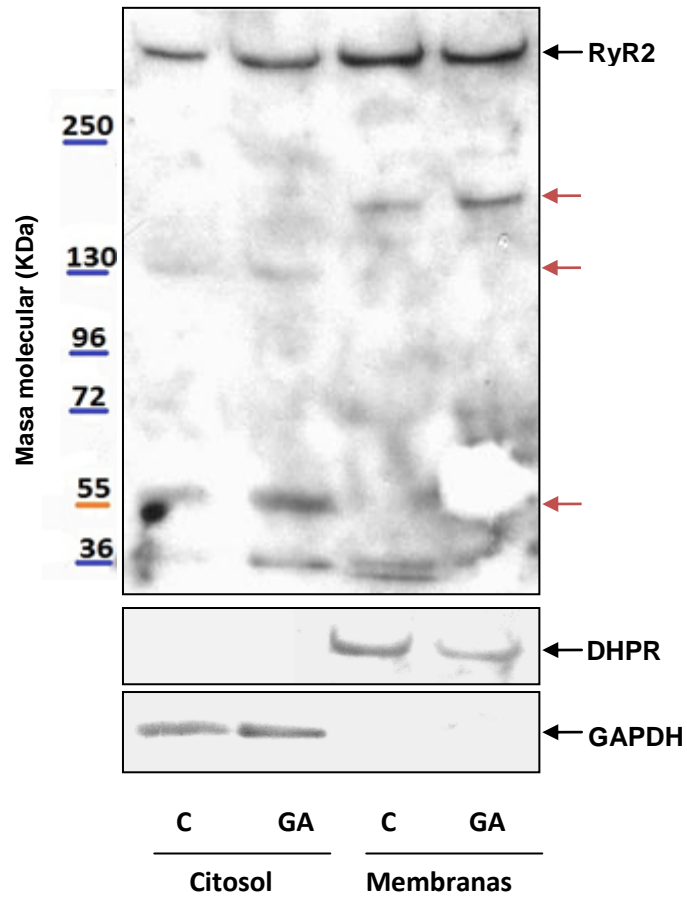


Figura 1. Efecto de la geldanamicina en la proteólisis y localización del RyR2 en cardiomiocitos

Los cardiomiocitos estimulados con Geldanamicina (GA) presentan un aumento de posibles fragmentos (←) del RyR2 en la fracción citosólica con respecto a los controles (C) visualizados a través de Western blot. El receptor de dihidropiridinas (DHPR) y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizaron como marcadores de pureza de la fracción de membranas y citosólica, respectivamente (n=3).

11.2 Efectos de geldanamicina en la generación de especies reactivas del oxígeno

El estrés oxidativo produce daño en la estructura de varias proteínas y, a la vez, activa diversas vías de degradación de proteínas tales como la AMC (36). La GA contiene en su estructura una benzoquinona que puede generar EROs, lo cual fue descrito en células epiteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) (41). Para conocer si este efecto se observa en cardiomiocitos, los cardiomiocitos se estimularon con GA (2 μ M) y posteriormente se midieron los niveles de EROs por citometría de flujo con la sonda 123-dihidrorodamina.

En primer lugar se realizó un estudio temporal de generación de EROs por GA (Figura 2A). Los resultados indican que a partir de las 2 h de incubación con la droga existe un aumento significativo de $1,93 \pm 0,23$ veces, en la producción de EROs respecto al control ($p < 0,05$ vs control).

Para confirmar que la señal obtenida por citometría correspondía a la presencia de EROs, se utilizó el antioxidante NAC para inhibir su aumento. Se evaluaron distintas concentraciones utilizadas en literatura (1, 3 y 5 mM), la adición de NAC se realizó 30 min previos a la coincubación con GA. La NAC en una concentración de 3 mM previno completamente la formación de EROs (Figura 2B) luego de 2 h de incubación de las células con GA (2 μ M). Esta concentración de NAC se utilizó para los experimentos posteriores.

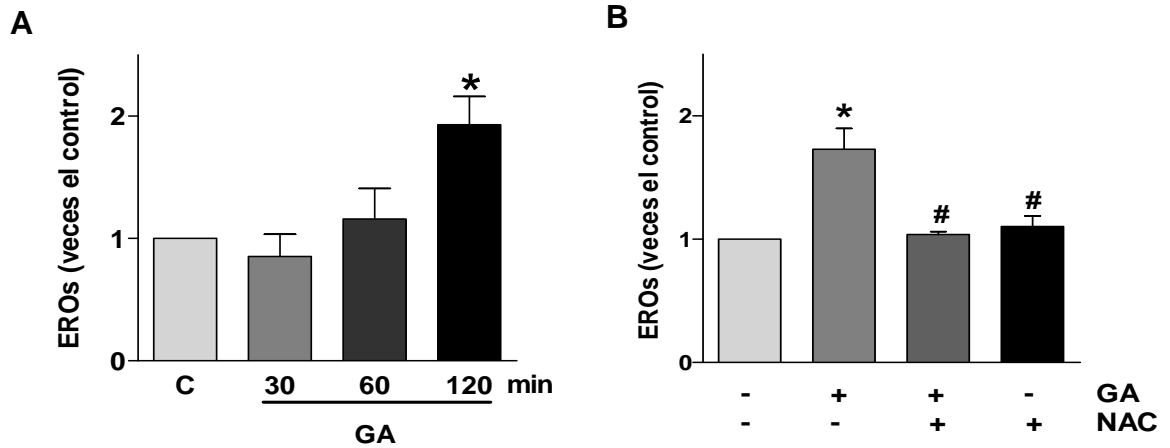


Figura 2. Efecto de la geldanamicina (GA) en la generación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en los cardiomiocitos

(A) Generación de EROs tras diferentes tiempos de incubación de los cardiomiocitos con GA (n=4). Los valores se expresan como promedio \pm SEM. *p<0,05 vs control (C)

(B) Inhibición de la generación de EROs por el antioxidante NAC 3 mM (n \geq 4). Los valores se expresan como promedio \pm SEM. *p<0,001 vs control (- -); #p<0,001 vs GA

Los gráficos de barras muestran los resultados de las mediciones obtenidas normalizados respecto al control.

11.3 Geldanamicina induce estrés oxidativo y daño a proteínas en los cardiomiocitos

Las EROs son normalmente generadas como resultado del metabolismo. Sin embargo, cuando se produce estrés oxidativo es producto de un aumento en la generación o disminución en su degradación por los mecanismos de defensa presentes en la célula. Los efectos de las EROs pueden ser deletéreos, interrumpiendo el normal funcionamiento celular pudiendo llegar a la muerte (46).

Para conocer si la generación de EROs por GA podía relacionarse con un daño proteico directo e irreversible como la carbonilación, se evaluaron los niveles de proteínas totales carboniladas de las células estimuladas con GA.

El experimento se llevó a cabo luego de 6 h de incubación con GA (2 μ M), ya que fue el tiempo en que se describió la activación de la AMC por GA en trabajos previos realizados en nuestro Laboratorio. Este tiempo se estableció también para los experimentos posteriores.

Los resultados indican que las EROs generadas en los cardiomiocitos estimulados previamente con GA produjeron un efecto directo sobre las proteínas celulares, aumentando su carbonilación. Este efecto se previno por la coincubación de la GA con NAC (Figura 3).

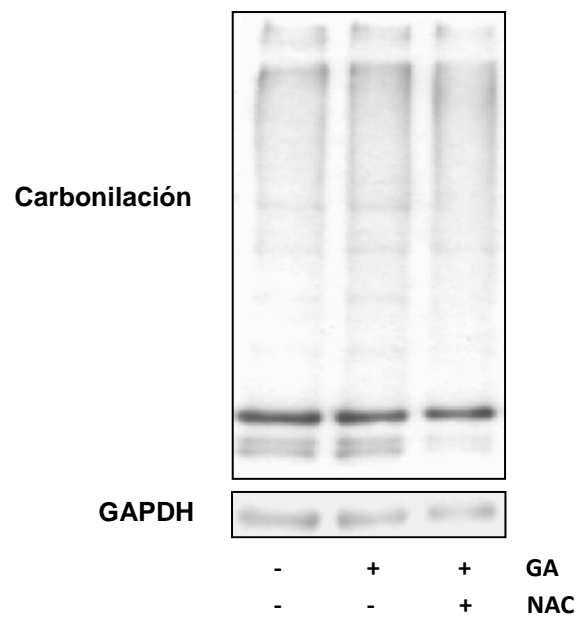


Figura 3. Efecto de la geldanamicina (GA) en la determinación de los niveles de proteínas carboniladas en los cardiomiocitos

Western blot representativo del total de proteínas carboniladas en muestras controles, estimuladas con GA y estimuladas con GA y NAC.

11.4 El aumento de especies reactivas del oxígeno depende de geldanamicina e induce la degradación del RyR2 pero no activa la autofagia mediada por chaperonas

Se había observado previamente la degradación RyR2 a través de la AMC, por activación de esta vía con GA. Para conocer la participación de las EROs en este proceso se incubó por 6 h con GA (2 μ M) en presencia o ausencia del antioxidante NAC (3 mM).

Los resultados muestran que la degradación del RyR2 observada en cardiomiocitos estimulados con GA es totalmente prevenida si dicha incubación se realiza en presencia de NAC (Figura 4A). Este hallazgo indica que la generación de EROs se encuentra directamente involucrada en la degradación del RyR2 dependiente de la presencia de GA.

Como previamente se había indicado, la presencia de EROs puede inducir la AMC directamente por la modulación de proteínas que actúan en la vía. Otra alternativa es por aumento de la oxidación y el daño de las proteínas sustrato para dicho sistema de degradación (36).

Para clarificar si el aumento de las EROs induce directamente la AMC por la regulación de las proteínas que forman parte de esta vía se estudiaron los niveles de LAMP-2A. El LAMP-2A es el receptor lisosomal para las proteínas sustratos de la AMC, y se utiliza como marcador de activación de dicha vía.

En los cardiomiocitos estimulados con GA se observó un aumento de los niveles de LAMP-2A, una evidencia de la activación de esta vía. Por otra parte,

los niveles de LAMP-2A continúan aumentados en muestras provenientes de la estimulación con GA en presencia del antioxidante NAC (Figura 4B).

El conjunto de estos resultados sugieren que la participación de las EROs en la degradación del RyR2 no se debe al aumento de la AMC directamente por regular las proteínas componentes de la vía. Los datos sugieren que su participación podría deberse a la oxidación y daño permanente de las proteínas como el RyR2, generando los sustratos para la AMC.

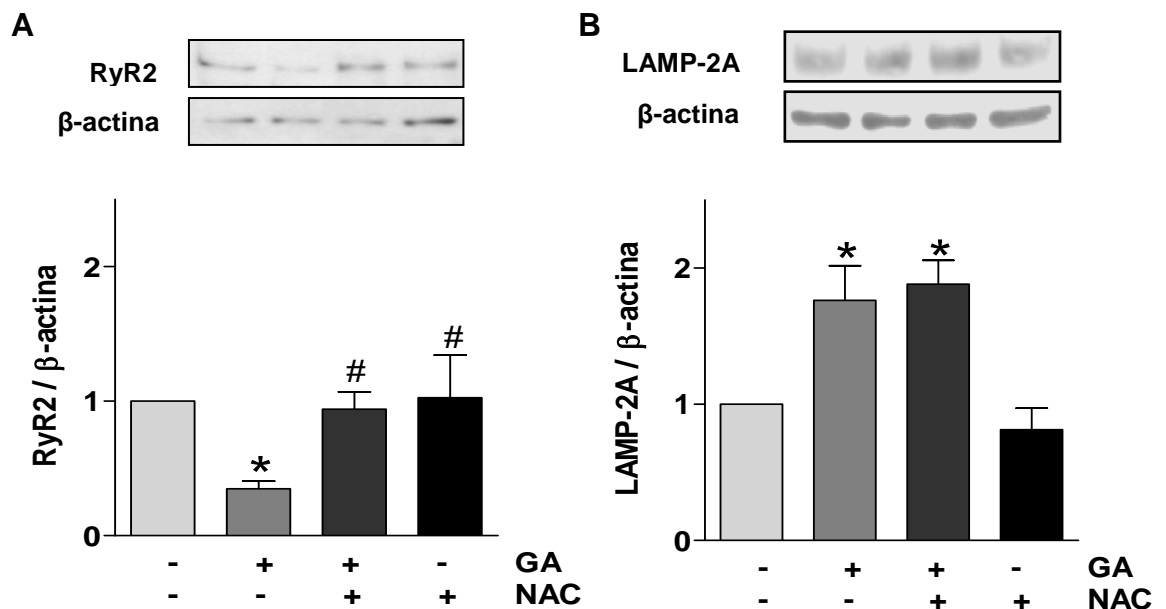


Figura 4. Efecto de la producción de especies reactivas del oxígeno dependiente de la geldanamicina (GA) en la activación de la autofagia mediada por chaperonas

(A) En la parte superior se muestra un Western blot representativo de los niveles del RyR2 y de β -actina. El gráfico de barras representa la densitometría correspondiente a los niveles del RyR2 en presencia de geldanamicina (GA) y N-acetilcisteína (NAC), $n \geq 4$. Los valores se expresan como promedio \pm SEM. * $p < 0,0001$ vs control (- -), # $p < 0,001$ vs GA

(B) En la parte superior se encuentran los Western blot representativos de los niveles de LAMP-2A y β -actina. El gráfico de barras representa la densitometría correspondiente a los niveles del RyR2 en presencia de geldanamicina (GA) y N-acetilcisteína (NAC), $n \geq 5$. Los valores se expresan como promedio \pm SEM. * $p < 0,001$ vs control (- -)

11.5 Las calpaínas no participan en la proteólisis del RyR2 inducida por geldanamicina

El RyR2 es una proteína de membrana del retículo sarcoplasmático. Se desconoce cuál podría ser el mecanismo a través del cual esta proteína estaría presente en el citoplasma para su degradación a través de la AMC. Con este propósito se evaluó la participación de calpaínas en la proteólisis anterior a su transporte hacia el lisosoma.

Existen antecedentes en la literatura que las calpaínas son cisteína proteasas responsables, en parte, de la degradación del RyR2 durante la isquemia/reperfusión de los cardiomiocitos (6). En este trabajo se estudió si estas proteasas son también capaces de proteolizar el RyR2 cuando la AMC se encuentra activada.

Para inhibir la actividad de las calpaínas se utilizaron dos inhibidores de las cisteína proteasas; leupeptina (LE, 10 μ M) y E64d (15 μ M).

Los resultados indican que E64d impidió completamente la degradación del RyR2 inducida por GA. Sin embargo, LE sólo lo hizo parcialmente (Figura 5).

Debido a que estos inhibidores no son específicos para las calpaínas, sino que actúan además inhibiendo otras cisteína proteasas de la célula, incluyendo las del lisosoma. De esta manera los resultados obtenidos podrían deberse a la inhibición de las proteasas lisosomales (47), y no debido a la acción de las calpaínas sobre el RyR2.

Para establecer una participación individual de las calpaínas en la proteólisis de RyR2 promovida por la GA en los cardiomiocitos, se analizó la inducción de la proteólisis de un sustrato específico de las calpaínas, la α -espectrina. Se ha descrito que las calpaínas realizan cortes en esta proteína y la cantidad de los fragmentos de 150 y 145 KDa se relacionan con su activación (48-49).

La activación de las calpaínas requiere un aumento de Ca^{2+} citoplasmático (50). En base a este antecedente se utilizó como control positivo de la activación de estas proteasas ionomicina, un ionóforo que aumenta los niveles intracelulares de Ca^{2+} . Se utilizaron dos concentraciones: 0,5 y 1 μM (51) durante media hora antes de finalizar la incubación con GA.

Los resultados muestran que GA no aumentó la proteólisis de α -espectrina. Estos resultados sugieren que la GA no activa las calpaínas en los cardiomiocitos con respecto al control. Ionomicina (1 μM) produjo un aumento significativo en la actividad de las calpaínas con respecto al control (Figura 6).

El conjunto de estos resultados indican que GA, por sí sola, no activa las calpaínas. Por otra parte, los resultados sugieren que el inhibidor E64d estaría impidiendo la degradación del RyR2 ya sea por su inhibición sobre las proteasas lumbinales del lisosoma o por su inhibición sobre otras proteasas que proteolizan al RyR2.

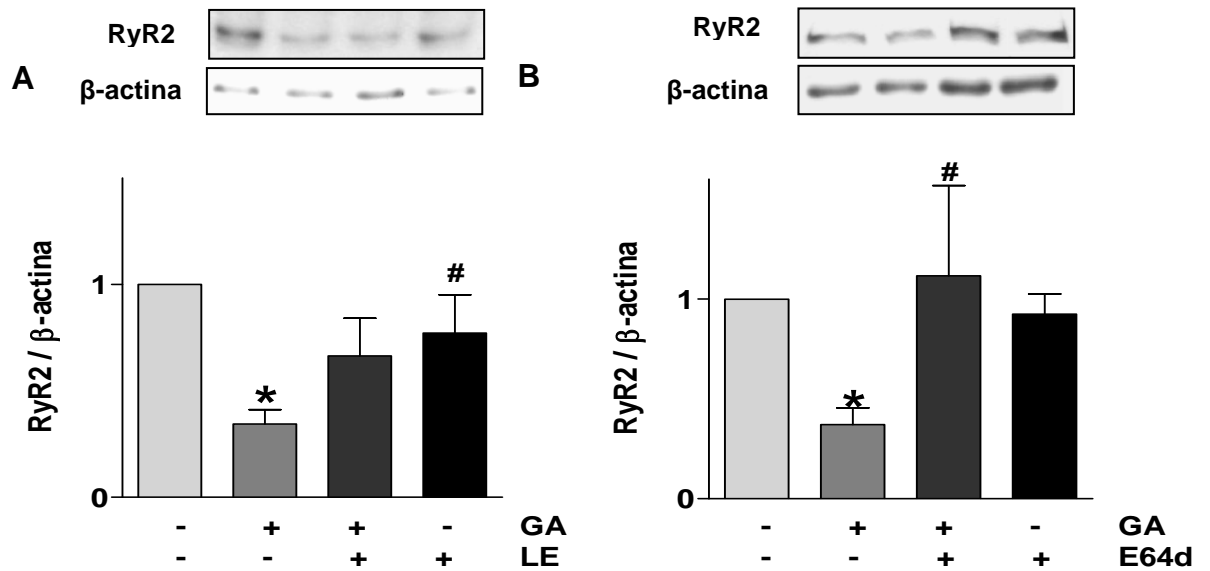


Figura 5. Efecto de la inhibición de la cisteína proteasas en la degradación de RyR2

(A) En la parte superior se muestra el Western blot representativo de los niveles del RyR2 y β -actina. El gráfico de barras representa la densitometría correspondiente a los niveles del RyR2 en presencia de geldanamicina (GA) y Leupeptina (LE), ($n \geq 3$). Los valores se expresan como promedio \pm SEM * $p < 0,001$ vs control (- -), # $p < 0,05$ vs GA.

(B) En la parte superior se muestra el Western blot representativo de los niveles del RyR2 y β -actina. El gráfico de barras representa la densitometría correspondiente a los niveles del RyR2 en presencia de geldanamicina (GA) y E64d, ($n \geq 3$). Los valores se expresan como promedio \pm SEM * $p < 0,05$ vs control (- -), # $p < 0,05$ vs GA.

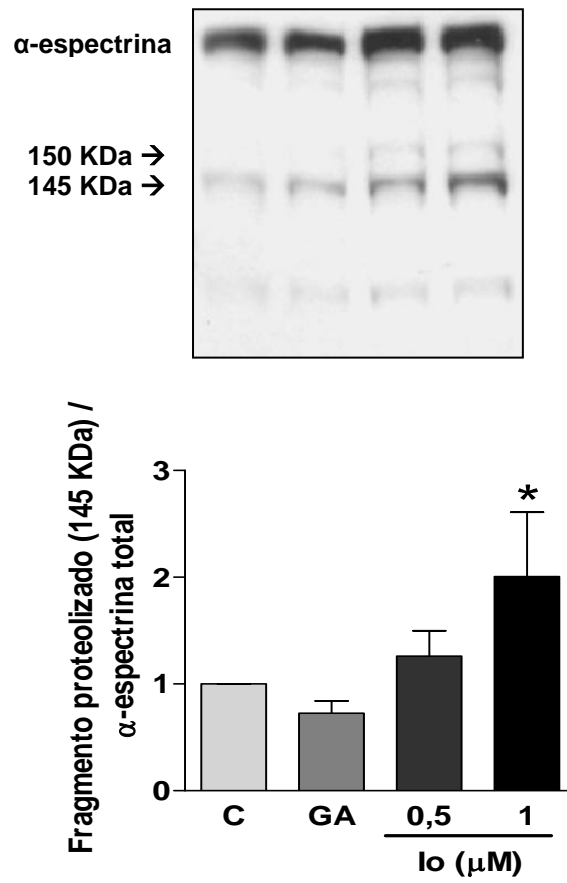


Figura 6. Efecto de la geldanamicina (GA) en la proteólisis de α-espectrina.

En la parte superior se muestra el Western blot representativo de los niveles de α-espectrina proteolizada y de α-espectrina total. El gráfico de barras representa la densitometría correspondiente a los niveles del fragmento proteolizado de 145 KDa de α-espectrina en presencia de GA y de Ionomicina (Io), (n≥4). Los valores se expresan como promedio ± SEM *p<0,001 vs control (C).

11.6 Participación de presenilinas en la proteólisis de RyR2 dependiente de geldanamicina

Al descartar la participación de cisteína proteasas en la proteólisis de RyR2 previa a su degradación por AMC se indagó la participación de aspártico proteasas, presenilinas, las cuales realizan cortes intramembrana.

Para estudiar si esta proteasa se encuentra involucrada en la degradación del RyR2 durante la activación de la AMC con GA se utilizaron 2 inhibidores; la pepstatina A metil ester, derivado permeable a la membrana (28 μM) y el CE (10 nM).

Los resultados sugieren que los cardiomiocitos estimulados con GA en presencia de la pepstatina A metil ester, un inhibidor general de las aspártico proteasas, se impide la degradación del RyR2 (Figura 7A).

Debido a que esta proteasa también inhibe las aspártico proteasas del lisosoma se utilizó a continuación un inhibidor específico de las presenilinas, el CE. Los resultados muestran que la inhibición de las presenilinas por el CE impide totalmente la degradación del RyR2 inducida por la GA (Figura 7B).

En conjunto estos resultados sugieren que el RyR2 se proteoliza por las presenilinas en el retículo sarcoplasmático durante la activación de la AMC en los cardiomiocitos estimulados con GA.

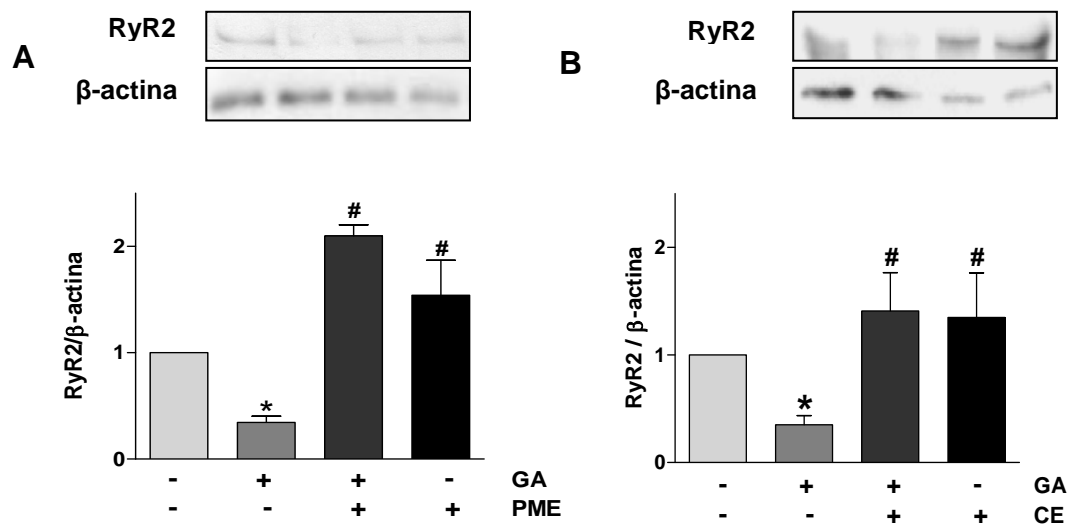


Figura 7. Participación de presenilinas en la proteólisis de RyR2 dependiente de geldanamicina

(A) En la parte superior se muestra un Western blot representativo de los niveles del RyR2 y β -actina. El gráfico de barras representa la densitometría correspondiente a los niveles del RyR2 en presencia de geldanamicina (GA) y pepstatina A metil ester (PME), ($n \geq 3$). Los valores se expresan como la promedio \pm SEM, * $p < 0,001$ vs control (- -), # $p < 0,0001$ vs GA.

(B) En la parte superior se muestra Western blot representativo de los niveles del RyR2 y β -actina. El gráfico de barras representa la densitometría correspondiente a los niveles del RyR2 en presencia de geldanamicina (GA) y compuesto E (CE), ($n \geq 4$). Los valores se expresan como la promedio \pm SEM * $p < 0,05$ vs control (- -), # $p < 0,001$ vs GA.

12. DISCUSION

El RyR2 es un canal de calcio inserto en la membrana del retículo sarcoplasmático esencial para la contracción miocárdica. Conocer los mecanismos de degradación de esta proteína, es fundamental para investigar las posibles consecuencias de su falencia en distintas enfermedades cardiacas, además de diseñar posibles tratamientos.

12.1 Presencia del RyR2 en el citoplasma durante la activación de la autofagia mediada por chaperonas por geldanamicina

Para que una proteína de membrana sea degradada a través de la AMC, es decir reconocida y transportada por chaperonas hacia el lisosoma es necesario que se encuentre disponible en el citoplasma. Los datos obtenidos en esta tesis, a través del fraccionamiento subcelular, muestran que fragmentos proteolíticos del RyR2 se encuentran presentes en la fracción citosólica, y que los niveles de dichos fragmentos aumentan en presencia de GA. Este dato, en conjunto con resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio, donde se demuestra la participación del lisosoma y específicamente de la AMC en la degradación del RyR2 a través de inhibidores como NH_4Cl , cloroquina y RNA interferente para LAMP-2A, muestran que esta vía de degradación de proteínas es una vía potencial de degradación para el RyR2.

Futuros experimentos deberían estar dirigidos a la secuenciación de los fragmentos proteolíticos del RyR2 identificados por Western blot durante el fraccionamiento subcelular para determinar los probables sitios de corte que sufre dicha proteína. Por otra parte, es necesario estudiar si el aumento de dichos fragmentos es revertido en presencia del inhibidor de las presenilinas,

CE, para corroborar los datos encontrados en esta tesis, que indican que las presenilinas están implicadas en la proteólisis del RyR2.

12.2 Participación de las especies reactivas del oxígeno en la autofagia mediada por chaperonas activada por geldanamicina

Se ha informado en otros modelos que GA aumenta los niveles EROs (41). En este trabajo se mostró que esta droga en cardiomiocitos en cultivo también aumenta las EROs, lo cual conduce a un aumento del estrés oxidativo en las células y la consecuente oxidación de las proteínas.

Se encuentra descrito que la oxidación de las proteínas puede producir nuevos sitios de reconocimiento para las Hsc70 o exponer los sitios presentes en la secuencia de las proteínas sustratos para la AMC (52).

En nuestro Laboratorio se determinó previamente que el RyR2 posee seis secuencias de reconocimiento para las Hsc70, las cuales podrían ser expuestas luego de la oxidación de la proteína. Por lo tanto, el aumento de las EROs durante la estimulación de los cardiomiocitos con GA podría contribuir de esta manera a la degradación de RyR2 a través de la AMC.

Queda por dilucidar si las EROs oxidarían directamente al RyR2 y si esta oxidación sería reversible o irreversible. La oxidación irreversible que da paso a la formación de grupos carbonilos en las proteínas, podría ser determinado a través del mismo análisis utilizado en este trabajo para carbonilación de proteínas totales, considerando una inmunoprecipitación previa del RyR2. Además falta determinar si dicha oxidación sería una señal para su proteólisis y degradación a través de la AMC o para la exposición de sus secuencias de

reconocimiento por las Hsc70. Otra posibilidad es que las EROs estarían regulando a otras proteínas de la maquinaria degradativa distintas a LAMP-2A.

12.3 Participación de proteasas en la degradación del RyR2 a través de la autofagia mediada por chaperonas activada por geldanamicina

A diferencia de lo observado previamente sobre la degradación de RyR2 en un modelo de isquemia/reperfusión realizado en nuestro Laboratorio (6), las calpaínas no estarían implicadas en la proteólisis de RyR2. Este hallazgo se puede deber a que en el modelo de isquemia/reperfusión existe un aumento de calcio (53) que facilitaría su activación. En cambio, no se han reportado aumento en el calcio citoplasmático inducido por GA.

En la búsqueda para dilucidar el mecanismo a través del cual el RyR2 puede ser direccionado hasta el lisosoma para su degradación a través de la AMC, en esta tesis se estudió a las presenilinas como probables proteasas implicadas en dicho mecanismo. Las presenilinas han sido estudiadas más profundamente por su importancia en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, pero también se ha estudiado su relación con los RyRs. En neuronas, por ejemplo, se ha descrito que la mutación de presenilina 2 (PS2) interrumpe la normal diferenciación celular, además de aumentar la expresión del RyR lo que provoca una mayor liberación de calcio desde el retículo sarcoplasmático (54). En cardiomiocitos de ratón se ha descrito la colocalización del RyR2 con PS2 y la regulación de la salida de calcio desde el retículo a través del RyR2 por presenilinas, ya que cardiomiocitos knock-out (KO) para PS2 presentan un aumento de la liberación de calcio desde el retículo sarcoplasmático (18).

Si bien existen datos en la literatura, como los expuestos anteriormente, que muestran la regulación del RyR2 por las presenilinas, no se ha demostrado a

cabalidad que tipo de regulación es la ejercida. Así, durante el estado basal las presenilinas podrían estar modulando su apertura, favoreciendo el cierre del canal, pero al sufrir esta proteína daños por ejemplo del tipo oxidativo, podría estar realizando cortes intramembrana que favorezcan su salida hacia el citoplasma para el reconocimiento por chaperonas y transporte hacia el lisosoma.

En este trabajo se reveló la participación de las presenilinas en la degradación de RyR2 a través de la AMC. Sin embargo, no se logró medir su actividad, por ejemplo a través de un sustrato específico conocido, como es realizado en modelos neuronales (55). Tampoco se ha determinado la señal que estaría conduciendo a la proteólisis. Ni se ha investigado si la participación de las presenilinas se asocia a su actividad dentro o fuera del complejo γ -secretasa, del cual forma parte, lo cual podría ser dilucidado a través de compuestos que inhiban a otras proteínas claves del complejo, como nicastrina, sin afectar la actividad de presenilinas.

12.4 Autofagia mediada por chaperonas, una vía degradativa alternativa para proteínas de membrana

Hasta el momento sólo un trabajo ha descrito la degradación de una proteína de membrana, el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) a través de la AMC (56). Por lo cual, las publicaciones aún se refieren a esta vía como exclusiva para la degradación de proteínas citoplasmáticas. El presente trabajo muestra la degradación de otra proteína de membrana, el RyR2, a través de esta vía. Por otra parte en el trabajo sobre la degradación del EGFR no se investigó el mecanismo a través del cual esta proteína podría ser degradada a través de la AMC. Los autores utilizaron oxazolina, un análogo sintético de apratoxina A, para impedir la interacción específica entre Hsp90 y

las proteínas sobre las cuales actúa, induciendo la degradación de las mismas a través de la AMC (56). Por otra parte, en el mismo trabajo comparan los resultados obtenidos con oxazolina y geldanamicina, encontrando resultados positivos sólo con el primer compuesto. La discrepancia en los resultados podría explicarse a que en dicho trabajo sólo se utilizó la mitad de la concentración utilizada para geldanamicina en este trabajo, y utilizada también por los autores que reportaron la activación de la AMC por este compuesto (38).

12.5 Relación entre la disminución de los niveles del RyR2 y las cardiomiopatías

Actualmente se conoce la importancia del RyR2 en el desarrollo embrionario del corazón, se ha demostrado que la carencia del gen codificante para esta proteína es letal (4). Sin embargo, no se ha indagado las consecuencias que conlleva la disminución de los niveles de RyR2 en modelos *in vivo*, específicamente durante la activación de la AMC a través de un compuesto exógeno como la GA, lo cual sería de gran relevancia si resultaran deletéreas por dos razones:

La primera sería la potencial limitación del uso de nuevos fármacos como antineoplásicos, ya que si bien GA no se utiliza en clínica, sí se encuentran en estudio sus derivados. Un ejemplo es el compuesto 17-AAG el cual ha demostrado gran efectividad en líneas celulares de cáncer mamario (57), por lo cual un potencial efecto cardiotoxico por la disminución de los niveles del RyR2 a través de la activación de la AMC, acotaría la utilización de estos nuevos compuestos debido a los efectos adversos que podrían inducir. Estos efectos adversos podrían explicarse en parte a través del mecanismo de degradación del RyR2 que esta tesis describe en los cardiomiocitos en cultivo.

La segunda razón sería considerar la activación de la AMC como un nuevo blanco farmacológico, ya que se conoce la importancia del RyR2 en el correcto funcionamiento del corazón a través de la modulación del calcio (58) y cómo la desestabilización de la actividad de este canal se relaciona con diversas patologías como las arritmias y la disfunción contráctil. Por lo tanto, si existiera relación entre la disminución de los niveles del RyR2 y el desarrollo de patologías cardiacas la inhibición de la AMC podría constituir una buena herramienta para evitar la aparición de dichas patologías.

Hasta el momento no se han realizado investigaciones acerca de la activación de la AMC durante las patologías cardiacas, por tanto, futuros experimentos *in vivo* podrían ir dirigidos a la búsqueda de la inducción de esta vía de degradación y su importancia en la aparición del desarrollo de cardiomiopatías.

Modelo

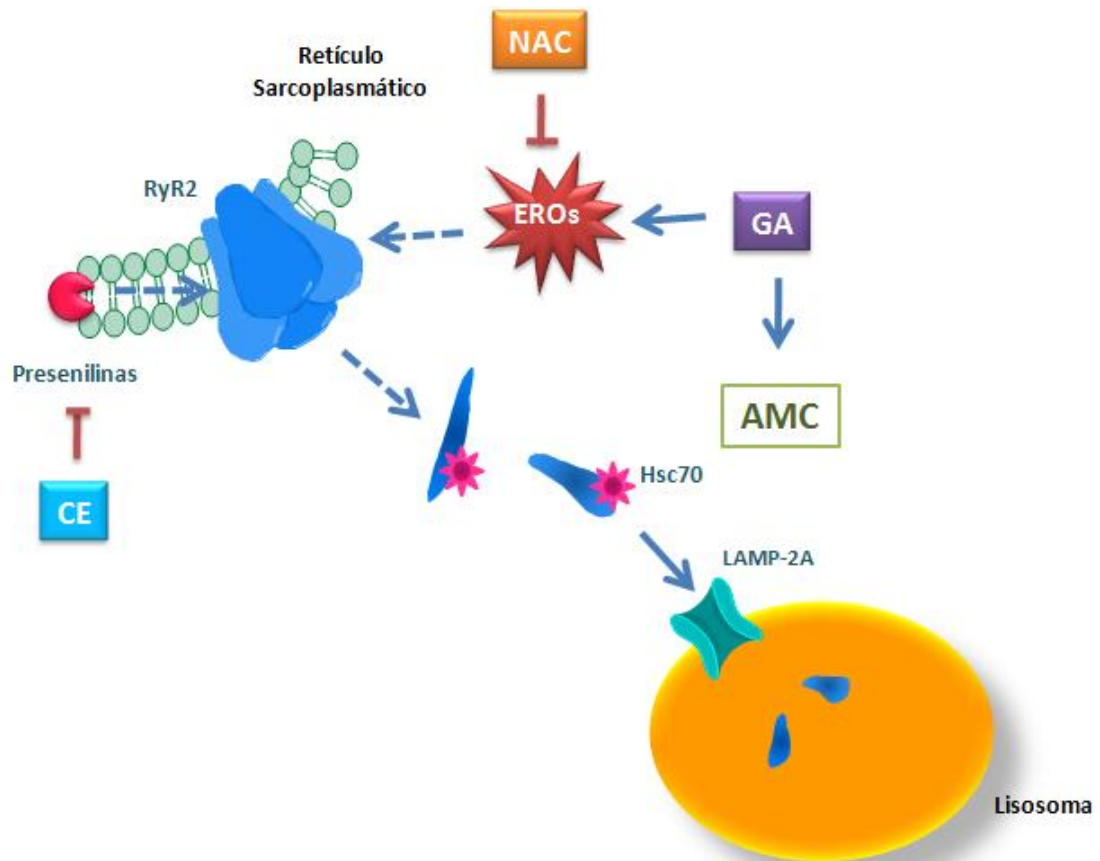


Figura 8. Modelo

La geldanamicina (GA) induce la AMC y genera especies reactivas de oxígeno (EROs), lo cual aumenta la degradación del RyR2 a través de un mecanismo desconocido, esto es prevenido por el antioxidante N-acetilcisteína (NAC). Las presenilinas (proteasas de corte intramembrana) estarían implicadas en la proteólisis del RyR2 lo cual se evita a través de su inhibidor específico el compuesto E (CE). Las chaperonas que forman parte de la AMC (Hsc70) podrían entonces reconocer los fragmentos del RyR2 y conducirlos hacia el lisosoma para su degradación. Se desconoce el mecanismo o estímulo necesario para la activación de las presenilinas.

13. CONCLUSIONES

- La degradación del receptor de ryanodina tipo 2 a través de la autofagia mediada por chaperonas depende de la generación de especies reactivas del oxígeno.
- Las calpaínas no estarían activadas en nuestro modelo celular y, por lo tanto, no participarían en la proteólisis del receptor de ryanodina tipo 2 durante la activación de la autofagia mediada por chaperonas con geldanamicina.
- Las presenilinas facilitarían la degradación de receptor de ryanodina tipo 2 a través de la autofagia mediada por chaperonas, procesándolo previamente.

14. REFERENCIAS

1. Fabiato, A. (1985) Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell, *J Gen Physiol* 85, 247-289.
2. Lukyanenko, V., Gyorke, I., and Gyorke, S. (1996) Regulation of calcium release by calcium inside the sarcoplasmic reticulum in ventricular myocytes, *Pflugers Arch* 432, 1047-1054.
3. Rohman, M. S., Emoto, N., Takeshima, Y., Yokoyama, M., and Matsuo, M. (2003) Decreased mAKAP, ryanodine receptor, and SERCA2a gene expression in mdx hearts, *Biochem Biophys Res Commun* 310, 228-235.
4. Takeshima, H., Komazaki, S., Hirose, K., Nishi, M., Noda, T., and Iino, M. (1998) Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2, *EMBO J* 17, 3309-3316.
5. Yaras, N., Ugur, M., Ozdemir, S., Gurdal, H., Purali, N., Lacampagne, A., Vassort, G., and Turan, B. (2005) Effects of diabetes on ryanodine receptor Ca release channel (RyR2) and Ca²⁺ homeostasis in rat heart, *Diabetes* 54, 3082-3088.
6. Pedrozo, Z., Sanchez, G., Torrealba, N., Valenzuela, R., Fernandez, C., Hidalgo, C., Lavandero, S., and Donoso, P. (2010) Calpains and proteasomes mediate degradation of ryanodine receptors in a model of cardiac ischemic reperfusion, *Biochim Biophys Acta* 1802, 356-362.
7. Lanner, J. T., Georgiou, D. K., Joshi, A. D., and Hamilton, S. L. (2010) Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release, *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, 3996.
8. Otsu, K., Willard, H. F., Khanna, V. K., Zorzato, F., Green, N. M., and MacLennan, D. H. (1990) Molecular cloning of cDNA encoding the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum, *J Biol Chem* 265, 13472-13483.
9. Ciechanover, A. (2005) Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome, *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 79-87.
10. Wang, X., and Robbins, J. (2006) Heart failure and protein quality control, *Circ Res* 99, 1315-1328.
11. Werner, E. D., Brodsky, J. L., and McCracken, A. A. (1996) Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13797-13801.
12. Sommer, T., and Wolf, D. H. (1997) Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return, *FASEB J* 11, 1227-1233.
13. Fujita, E., Kouroku, Y., Isoai, A., Kumagai, H., Misutani, A., Matsuda, C., Hayashi, Y. K., and Momoi, T. (2007) Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II), *Hum Mol Genet* 16, 618-629.

14. Baudhuin, P. (1966) [Lysosomes and cellular autophagy], *Brux Med* 46, 1059-1070.
15. De Meyer, G. R., and Martinet, W. (2009) Autophagy in the cardiovascular system, *Biochim Biophys Acta* 1793, 1485-1495.
16. Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M., and Suzuki, K. (1984) Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein?, *Nature* 312, 566-570.
17. Launay, S., Hermine, O., Fontenay, M., Kroemer, G., Solary, E., and Garrido, C. (2005) Vital functions for lethal caspases, *Oncogene* 24, 5137-5148.
18. Takeda, T., Asahi, M., Yamaguchi, O., Hikoso, S., Nakayama, H., Kusakari, Y., Kawai, M., Hongo, K., Higuchi, Y., Kashiwase, K., Watanabe, T., Taniike, M., Nakai, A., Nishida, K., Kurihara, S., Donoviel, D. B., Bernstein, A., Tomita, T., Iwatsubo, T., Hori, M., and Otsu, K. (2005) Presenilin 2 regulates the systolic function of heart by modulating Ca²⁺ signaling, *FASEB J* 19, 2069-2071.
19. Dries, D. R., and Yu, G. (2009) Rip exposed: how ectodomain shedding regulates the proteolytic processing of transmembrane substrates, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14737-14738.
20. De Strooper, B. (2003) Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex, *Neuron* 38, 9-12.
21. Cook, D. G., Sung, J. C., Golde, T. E., Felsenstein, K. M., Wojczyk, B. S., Tanzi, R. E., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., and Doms, R. W. (1996) Expression and analysis of presenilin 1 in a human neuronal system: localization in cell bodies and dendrites, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9223-9228.
22. Lee, M. K., Slunt, H. H., Martin, L. J., Thinakaran, G., Kim, G., Gandy, S. E., Seeger, M., Koo, E., Price, D. L., and Sisodia, S. S. (1996) Expression of presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in human and murine tissues, *J Neurosci* 16, 7513-7525.
23. Rybalchenko, V., Hwang, S. Y., Rybalchenko, N., and Koulen, P. (2008) The cytosolic N-terminus of presenilin-1 potentiates mouse ryanodine receptor single channel activity, *Int J Biochem Cell Biol* 40, 84-97.
24. Powell, S. R. (2006) The ubiquitin-proteasome system in cardiac physiology and pathology, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H1-H19.
25. Terman, A., and Brunk, U. T. (2005) Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology, *Cardiovasc Res* 68, 355-365.
26. Cuervo, A. M. (2004) Autophagy: many paths to the same end, *Mol Cell Biochem* 263, 55-72.
27. Marzella, L., Ahlberg, J., and Glaumann, H. (1981) Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation, *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 36, 219-234.
28. Ahlberg, J., Marzella, L., and Glaumann, H. (1982) Uptake and degradation of proteins by isolated rat liver lysosomes. Suggestion of a microautophagic pathway of proteolysis, *Lab Invest* 47, 523-532.
29. Massey, A. C., Zhang, C., and Cuervo, A. M. (2006) Chaperone-mediated autophagy in aging and disease, *Curr Top Dev Biol* 73, 205-235.
30. Dice, J. F. (1990) Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis, *Trends Biochem Sci* 15, 305-309.

31. Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., and Dice, J. F. (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins, *Science* 246, 382-385.
32. Cuervo, A. M., and Dice, J. F. (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes, *Science* 273, 501-503.
33. Agarraberes, F. A., and Dice, J. F. (2001) A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation, *J Cell Sci* 114, 2491-2499.
34. Cuervo, A. M., Knecht, E., Terlecky, S. R., and Dice, J. F. (1995) Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation, *Am J Physiol* 269, C1200-1208.
35. Cuervo, A. M., Hildebrand, H., Bomhard, E. M., and Dice, J. F. (1999) Direct lysosomal uptake of alpha 2-microglobulin contributes to chemically induced nephropathy, *Kidney Int* 55, 529-545.
36. Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., and Cuervo, A. M. (2004) Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress, *Mol Biol Cell* 15, 4829-4840.
37. Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., and Cuervo, A. M. (2008) The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane, *Mol Cell Biol* 28, 5747-5763.
38. Finn, P. F., Mesires, N. T., Vine, M., and Dice, J. F. (2005) Effects of small molecules on chaperone-mediated autophagy, *Autophagy* 1, 141-145.
39. BeBoer, C., and Dietz, A. (1976) The description and antibiotic production of *Streptomyces hygrosopicus* var. *Geldanus*, *J Antibiot (Tokyo)* 29, 1182-1188.
40. Dey, A., and Cederbaum, A. I. (2007) Geldanamycin, an inhibitor of Hsp90 increases cytochrome P450 2E1 mediated toxicity in HepG2 cells through sustained activation of the p38MAPK pathway, *Arch Biochem Biophys* 461, 275-286.
41. Dikalov, S., Landmesser, U., and Harrison, D. G. (2002) Geldanamycin leads to superoxide formation by enzymatic and non-enzymatic redox cycling. Implications for studies of Hsp90 and endothelial cell nitric-oxide synthase, *J Biol Chem* 277, 25480-25485.
42. Dice, J. F. (2007) Chaperone-mediated autophagy, *Autophagy* 3, 295-299.
43. Foncea, R., Andersson, M., Ketterman, A., Blakesley, V., Sapag-Hagar, M., Sugden, P. H., LeRoith, D., and Lavandero, S. (1997) Insulin-like growth factor-I rapidly activates multiple signal transduction pathways in cultured rat cardiac myocytes, *J Biol Chem* 272, 19115-19124.
44. Li, R. K., Mickle, D. A., Weisel, R. D., Zhang, J., and Mohabeer, M. K. (1996) In vivo survival and function of transplanted rat cardiomyocytes, *Circ Res* 78, 283-288.
45. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem* 193, 265-275.
46. Berg, D., Youdim, M. B., and Riederer, P. (2004) Redox imbalance, *Cell Tissue Res* 318, 201-213.
47. Klionsky, D. J. (2009) *Autophagy in disease and clinical applications*, Elsevier/Academic Press.
48. Yoshida, K., Inui, M., Harada, K., Saido, T. C., Sorimachi, Y., Ishihara, T., Kawashima, S., and Sobue, K. (1995) Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain, *Circ Res* 77, 603-610.

49. Aki, T., Yoshida, K., and Fujimiya, T. (2002) Phosphoinositide 3-kinase accelerates calpain-dependent proteolysis of fodrin during hypoxic cell death, *J Biochem* 132, 921-926.
50. Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W., and Cong, J. (2003) The calpain system, *Physiol Rev* 83, 731-801.
51. Nakajima, T., Shearer, T. R., and Azuma, M. (2011) Involvement of Calpain 2 in Ionomycin-induced Cell Death in Cultured Mouse Lens Epithelial Cells, *Curr Eye Res* 36, 930-936.
52. Gracy, R. W., Talent, J. M., and Zvaigzne, A. I. (1998) Molecular wear and tear leads to terminal marking and the unstable isoforms of aging, *J Exp Zool* 282, 18-27.
53. Steenbergen, C., Murphy, E., Levy, L., and London, R. E. (1987) Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart, *Circ Res* 60, 700-707.
54. Lee, S. M., Lee, J. W., Song, Y. S., Hwang, D. Y., Kim, Y. K., Nam, S. Y., Kim, D. J., Yun, Y. W., Yoon, D. Y., and Hong, J. T. (2005) Ryanodine receptor-mediated interference of neuronal cell differentiation by presenilin 2 mutation, *J Neurosci Res* 82, 542-550.
55. Wolfe, M. S., Xia, W., Ostaszewski, B. L., Diehl, T. S., Kimberly, W. T., and Selkoe, D. J. (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity, *Nature* 398, 513-517.
56. Shen, S., Zhang, P., Lovchik, M. A., Li, Y., Tang, L., Chen, Z., Zeng, R., Ma, D., Yuan, J., and Yu, Q. (2009) Cyclodepsipeptide toxin promotes the degradation of Hsp90 client proteins through chaperone-mediated autophagy, *J Cell Biol* 185, 629-639.
57. Pimienta, G., Herbert, K. M., and Regan, L. (2011) A Compound That Inhibits the HOP-Hsp90 Complex Formation and Has Unique Killing Effects in Breast Cancer Cell Lines, *Mol Pharm*.
58. Currie, S., Elliott, E. B., Smith, G. L., and Loughrey, C. M. (2011) Two candidates at the heart of dysfunction: The ryanodine receptor and calcium/calmodulin protein kinase II as potential targets for therapeutic intervention-An in vivo perspective, *Pharmacol Ther* 131, 204-220.