



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFEECTO DE LA TAQUICARDIA ELÉCTRICA SOBRE LA
FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS DEL RETÍCULO
SARCOPLASMÁTICO DE CORAZÓN DE PERRO.**

AGUSTÍN PATRICIO ALVARADO OSORIO

**Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario**
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

Profesor guía: Dra. Paulina Donoso Laurent

SANTIAGO – CHILE
2008

Esta memoria se la dedico como homenaje
a mis padres, Alicia y Sergio

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a la Dra. Paulina Donoso, por todos los conocimientos que me entregó, además de su inagotable comprensión y paciencia, ya que no solamente fue mi profesora guía sino que además un gran apoyo en momentos difíciles.

A la Dra. Gina Sánchez por todo el tiempo que le entregó a este estudiante algo porfiado y desordenado. Sin su ayuda no podría haber llegado a buen puerto esta memoria.

A la Dra. Cecilia Hidalgo, gran persona y excelente investigadora.

A mis compañeros de laboratorio: Luis, Genaro, Alexis, Paola, Lidia, Zully, Matías, Ismael JP, Rodrigo, José Luis, Alejandro, Rafaela y Tatiana, los que me enseñaron una infinidad de conocimientos y me hicieron sentir desde el primer día uno más del laboratorio. Destacar a mis compañeros de carrera Eduardo Gaggero y Jorge Gálvez, con los que sentí que mi facultad no estaba tan lejos. A Soledad y Fernando, por su ayuda y cariño.

A mi familia: Sergio, Paulina, Margarita y Fernanda, ya que si bien somos pocos, todos han sido un soporte fundamental para mi y me han levantado cada vez que la vida me ha hecho tropezar. Los amo con toda mi alma. Muchas gracias a Kevin (tú sabes que también eres parte de este núcleo).

A Mónica, por devolverme la energía para terminar este proceso cuando pensaba que ya no quedaban fuerzas.

A todos mis amigos, que si bien por espacio no nombro a cada uno, saben que los llevo en mi corazón y que también son parte de este logro.

Finalmente agradecer a mis padres, que si bien no están de cuerpo presente, saben que si llegué a esta instancia es gracias a ellos. Los amo y los extraño.

INDICE

INTRODUCCION	9
REVISION BIBLIOGRÁFICA	
1-Canal de calcio/receptor de ryanodina tipo 2 (RyR2)	12
2-Bomba de Ca ⁺² del retículo sarcoplásmico (SERCA2a)	13
3-Fosfolambano (PLB)	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
MATERIALES Y METODOS	
1-Muestras de perros taquicárdicos y controles	16
2-Preparación de vesículas de retículo sarcoplásmico	17
3-Determinación de proteína de la muestra	18
4-Cuantificación de proteínas fosforiladas en geles de poliacrilamida	18
4.1-Delipidación de las muestras de vesículas	18
4.2-Electroforesis	19

4.3-Tinción de las muestras	19
4.4-Captura de la imagen	21
5-Determinación de proteínas fosforiladas en Western blots	21
6-Análisis de los datos	22
RESULTADOS	
1-Evaluación de la Técnica de Tinción fluorescente para fosfoproteínas y proteínas totales.	24
2-Determinación de la fosforilación de RyR2 mediante la técnica de Western blot.	28
3-Determinación de la fosforilación de PLB mediante la técnica de Western blot	30
DISCUSION	33
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37

ABREVIATURAS

- **CaMKII:** Proteína Quinasa Ca^{+2} /Calmodulina-Dependiente
- **DHPR:** Receptores de Dihidropiridinas
- **I_{ca}:** Corriente de Entrada de Ca^{+2}
- **PLB:** Fosfolambano
- **PKA:** Proteína Quinasa A
- **PKC:** Proteína Quinasa C
- **RyR2:** Canales de Ca^{+2} Receptores de Ryanodina del Retículo Sarcoplasmático
- **RS:** Retículo Sarcoplasmático
- **Ser¹⁶:** Serina-16
- **Ser³⁸:** Serina-38
- **Ser²⁸⁰⁸:** Serina-2808
- **Ser²⁸⁰⁹:** Serina-2809
- **Ser²⁸¹⁵:** Serina-2815
- **SERCA 2a:** Bomba de Ca^{+2} dependiente de ATP del Retículo Sarcoplasmático
- **TBS:** Tris Buffer Salino
- **TBS Tween:** Tris Buffer Salino con Tween
- **Thr¹⁷:** Treonina-17

SUMMARY

The sarcoplasmic reticulum is the intracellular compartment responsible for the regulation of cytosolic Ca^{+2} in mammalian heart cells. It contains the proteins that mediate calcium release and calcium uptake, RyR2, SERCA2a y PLB, allowing the contraction and relaxation of cardiac muscle. The activity of these proteins is regulated by phosphorylation-dephosphorylation of some of their aminoacidic residues. Ser²⁸⁰⁹ and Ser²⁸¹⁵ are phosphorylated in RyR2; Ser³⁸ is phosphorylated in SERCA 2a; Ser¹⁶ and Thr¹⁷ are phosphorylated in PLB. A protocol of cardiac preconditioning by electrically induced tachycardia has been developed in this laboratory. Electrically induced tachycardia reduces the size of the infarct area after the prolonged occlusion of a coronary artery. This protocol of tachycardia also increases the activity of calcium handling proteins in the heart, but the molecular basis of this increase is unknown. A change in the phosphorylation level of these proteins may explain this increase in activity. At present, phosphorylation can only be detected with specific antibodies. A staining method to detect total and phosphorylated proteins was evaluated in this work. This method would allow us to know the level of protein phosphorylation without the need to know their specific phosphorylation sites. The results were compared with those obtained by Western blots using commercial antibodies.

It was found that the staining technique for phosphoproteins and total proteins is not sensible enough to detect changes in phosphorylation between controls and tachycardia.

Western blots showed an increase in Ser²⁸⁰⁹ phosphorylation in RyR2 and in Thr¹⁷ in PLB, suggesting that cardiac preconditioning by electric tachycardia increases calcium release and calcium uptake in sarcoplasmic reticulum.

RESUMEN

El RS es el compartimiento intracelular responsable de la regulación del Ca^{+2} en las células cardíacas de los mamíferos. En él se ubican las proteínas RyR2, SERCA2a y PLB, responsables de la regulación de la salida y entrada de Ca^{+2} desde este compartimiento, lo que posibilita la contracción y la relajación del músculo cardíaco. Estas proteínas se regulan mediante fosforilación y desfosforilación de algunos de sus aminoácidos, entre los que se encuentran la Ser²⁸⁰⁹ y la Ser²⁸¹⁵ en el RyR2; la Ser³⁸ en la SERCA 2a y la Ser¹⁶ y la Thr¹⁷ en el PLB. Se ha desarrollado un modelo de preconditionamiento por taquicardia eléctrica que disminuye el tamaño del infarto producido por una isquemia prolongada. La taquicardia eléctrica aumenta la actividad de las proteínas responsables de la regulación del Ca^{+2} . Aunque las bases moleculares de este aumento de actividad no se conocen, estos pueden deberse a cambios en su fosforilación. Hasta el momento, la fosforilación de los aminoácidos mencionados solo puede detectarse con anticuerpos específicos. En este trabajo se evaluó un método de tinción para proteínas fosforiladas y proteínas totales, el cual permitiría conocer la fosforilación de las proteínas en estudio, sin la necesidad de saber específicamente cuales son todos los sitios de fosforilación de cada una de ellas. Los resultados se compararon con los obtenidos mediante la técnica de Western blot con anticuerpos comerciales para los sitios de fosforilación conocidos.

Encontramos que la tinción para proteínas fosforiladas y proteínas totales no tiene la sensibilidad necesaria como para determinar cambios entre las condiciones basales y de taquicardia.

La detección de fosforilación en Western blots con los anticuerpos comerciales disponibles, demostraron un aumento de la fosforilación del RyR2 en la Ser²⁸⁰⁹, así como también en el

PLB en la Thr¹⁷, lo que sugiere que el modelo de preconditionamiento cardíaco, mediado por taquicardia eléctrica, aumentaría tanto la velocidad de liberación Ca⁺² desde el retículo sarcoplasmático a través de los RyR2, como de su recaptación mediante la acción de la SERCA2a.

INTRODUCCIÓN

El retículo sarcoplasmático (RS) es el compartimiento intracelular más importante en la homeostasis del Ca^{+2} en la célula muscular cardíaca de los mamíferos. Durante cada ciclo de excitación y contracción, el Ca^{+2} es liberado y subsecuentemente recaptado al interior del RS (Huke y Periasamy, 2004). El corazón es una bomba que se contrae rítmica e ininterrumpidamente a lo largo de toda la vida. Cada latido es una contracción del músculo cardíaco que se origina en respuesta a un potencial de acción. En cada potencial de acción se abren canales de Ca^{+2} sensibles a voltaje en el sarcolema de la célula cardíaca (canales de tipo L, que son receptores de dihidropiridinas (DHPR)), lo que produce una pequeña entrada de Ca^{+2} a la célula. Esa pequeña corriente de entrada de Ca^{+2} (I_{ca}) activa a los canales de Ca^{+2} /receptores de ryanodina del RS (RyR2) situados justo bajo el sarcolema, los que se abren produciendo la liberación de una cantidad mayor de Ca^{+2} hacia el espacio que baña las miofibrillas, produciéndose la contracción. Este mecanismo, llamado liberación de Ca^{+2} inducida por Ca^{+2} , es el mecanismo de acoplamiento entre la excitación y la contracción del corazón. El Ca^{+2} liberado es reacumulado por acción de la Ca^{+2} ATPasa (SERCA2a) del RS, con lo que queda listo para volver a ser liberado al latido siguiente. Los flujos de Ca^{+2} desde y hacia el RS, que determinan la fuerza de la contracción y la velocidad de relajación, son regulados por la fosforilación de las proteínas involucradas.

La fosforilación de proteínas es un mecanismo fundamental de regulación de su actividad. El estado de fosforilación de una proteína en particular dependerá del balance que exista entre la activación de quinasas y fosfatasa de las que sea sustrato esa proteína. Varias

quinasas, incluidas la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa Ca^{+2} /Calmodulina-dependiente (CaMKII) y la proteína quinasa C (PKC) contribuyen a estos efectos.

La fosforilación por PKA es el evento final en una cascada de señales que comienza con la activación de receptores β -adrenérgicos en la membrana plasmática. Esto permite la activación de la adenilato ciclasa por proteínas G específicas, lo que produce el incremento de los niveles citosólicos de AMP_c y la activación de PKA. Una vez activada, la PKA fosforila directamente importantes proteínas del ciclo del Ca^{+2} , incluyendo los DHPR, RyR2 y el Fosfolambano (PLB) (Wehrens y Marks, 2004).

La CaMKII es modulada por cambios en la concentración de Ca^{+2} (asociado con la frecuencia o cambios en el estado inotrópico del corazón). Poco se sabe cuantitativamente sobre los cambios dinámicos de la activación de la CaMKII durante el ciclo cardíaco (Bers, 2001a).

Existen varios modelos de acondicionamiento cardíaco para disminuir el tamaño del infarto producido por la oclusión prolongada de una arteria coronaria. Uno de ellos es la estimulación a alta frecuencia o taquicardia eléctrica. El protocolo consiste en 5 períodos, de 5 minutos cada uno, de estimulación a 190 ciclos/min, separados por 5 minutos de estimulación a frecuencia cardíaca normal (100 ciclos/min.).

La taquicardia acondicionante aumenta la actividad del RyR2 y de SERCA2a en el RS de las células musculares del corazón. No se sabe como varía el grado de fosforilación de estas

proteínas responsables de la homeostasis del Ca^{+2} en este protocolo de taquicardia. Es posible que los aumentos de actividad de estas proteínas se deban a fosforilación por quinasas asociadas a ellas. El propósito de esta memoria de título es estudiar el grado de fosforilación de las proteínas que participan en la regulación del Ca^{+2} en el corazón de perro, mediante la comparación del estado de fosforilación de estas proteínas entre corazones controles y preconditionados por taquicardia. Para ello se analizarán las proteínas del RS mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y se utilizará un método de tinción para fosfoproteínas, además de pruebas de identificación con anticuerpos específicos en Western blot.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1-Canal de calcio/receptor de ryanodina tipo 2 (RyR2)

Los receptores de ryanodina cardíacos juegan un rol crítico en el acoplamiento excitación-contracción, ya que son la vía para la liberación de Ca^{+2} desde el RS hacia el citosol. Los RyR2 son tetrámeros conformados por subunidades de aproximadamente 565 KDa cada una y existen como complejos macromoleculares asociados a otras proteínas. Cada subunidad tiene asociada una proteína de 12.6 KDa llamada FKBP12.6 y una molécula de Calmodulina. Además el RyR2 tiene asociadas quinasas y fosfatasa, las que se supone que regulan la función del canal por fosforilación y defosforilación (Marx *et al.*, 2000).

El RyR2 tiene varios sitios potenciales de fosforilación. Se ha propuesto que la fosforilación de la serina-2809 (Ser²⁸⁰⁹, o serina 2808 según la especie) produce la disociación de FKBP12.6 desde el canal, lo que aumenta su actividad, desacopla a los RyR2 de sus vecinos y produce *in vitro* (en bicapas planas) estados de subconductancia. La fosforilación por CaMKII en la serina-2815 (Ser²⁸¹⁵) aumenta la probabilidad de apertura del canal incorporado en bicapas planas, pero sin producir la disociación de la FKBP12.6 del complejo o estados de subconductancia (Wehrens y Marks, 2004). Otros autores, sin llegar a identificar el residuo aminoacídico fosforilado han demostrado que, al contrario, la fosforilación inhibe la actividad de liberación de Ca^{+2} de los RyR2 (Terentyev *et al.*, 2003; Valdivia *et al.*, 1995). Además se ha reportado que el RyR2 presenta al menos otros cinco sitios de fosforilación cuyo efecto sobre la actividad se desconoce (Rodríguez *et al.*, 2003).

Tampoco se sabe con certeza el grado de fosforilación de esta proteína *in vivo*, ya que el RyR2 se encuentra asociado, al menos, a dos fosfatasa, PP1 y PP2A, las que podrían mantener al receptor desfosforilado a pesar de la activación de estas dos quinasas.

2-Bomba de Ca^{+2} del retículo sarcoplasmático (SERCA2a)

La bomba de Ca^{+2} del RS de corazón (SERCA2a) juega un rol clave en el secuestro del Ca^{+2} citosólico hacia el RS lo que permite la relajación del músculo y la provisión de Ca^{+2} para la siguiente contracción. Su peso es de alrededor de los 110 KDa. La SERCA2a puede crear una gradiente de calcio de más de 1000 veces a través de la membrana del RS, para lo cual hidroliza 1 molécula de ATP por cada 2 iones de Ca^{+2} transportados al lumen del RS. En el miocardio humano, aproximadamente el 70% del Ca^{+2} necesario para la contracción es reacumulado por la SERCA2a, mientras que el resto es transportado a través del sarcolema por el intercambiador Na^{+} - Ca^{+2} y otros sistemas más lentos de remoción de Ca^{+2} (Bers, 2001a).

Se ha demostrado que la SERCA2a es fosforilada específicamente en la serina-38 (Ser^{38}), por una CaMK asociada a membrana del RS (Xu y Narayanan, 2000), siendo el efecto de esta fosforilación poco estudiado, pero que en teoría estaría ayudando a un aumento de la actividad de la bomba.

3-Fosfolambano (PLB)

La actividad de la SERCA2a es modulada por PLB, el que en su forma monomérica ejerce un efecto inhibitorio sobre la bomba. Su peso es de 6080 Da (52 aminoácidos) y su fosforilación revierte este efecto inhibitorio y permite la activación de la SERCA2a.

Se ha demostrado que la fosforilación en la serina-16 (Ser¹⁶) y/o en la treonina-17 (Thr¹⁷) promueven la formación de pentámeros de PLB, lo que revierte la inhibición sobre la SERCA2a y en consecuencia activa la recaptación de Ca⁺² hacia el RS (Huke *et al.*, 2004).

La fosforilación en Ser¹⁶ es dependiente de PKA y puede ser vista en corazones intactos en respuesta a catecolaminas. Así, la activación y la desactivación de los efectos de aceleración y relajación cardíacas por catecolaminas ocurren en paralelo a la fosforilación y defosforilación del PLB. Por otra parte, el PLB también puede ser fosforilado por CaMKII en la Thr¹⁷, produciendo los mismos efectos que la fosforilación por PKA en la Ser¹⁶ (Bers, 2001b)

Vistos los antecedentes antes descritos, se presenta la siguiente hipótesis y los correspondientes objetivos del trabajo:

HIPÓTESIS

La taquicardia preconditionante produce un aumento de la fosforilación de RyR2, SERCA2a y PLB.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la taquicardia eléctrica sobre la fosforilación de RyR2, SERCA2a y PLB utilizando diferentes métodos de detección.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar un método de tinción y cuantificación de proteínas fosforiladas en geles de poliacrilamida y evaluar su utilidad comparando con los resultados obtenidos mediante otras técnicas como la detección de las formas fosforiladas de estas proteínas en Western blots.
2. Comparar el grado de fosforilación de RyR2, SERCA2a y PLB en preparaciones de RS obtenidas de corazones de animales controles y sometidos a taquicardia preconditionante.

MATERIAL Y MÉTODOS

1- Muestras de perros taquicárdicos y controles

Todos los experimentos fueron hechos con la aprobación del comité de cuidado animal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y en acuerdo con las directrices de la *American Heart Association* en relación con el uso de animales de experimentación.

Se trabajó con perros de alrededor de 25 kilos de peso, a los que se aplicó el protocolo de taquicardia preconditionante. Los perros fueron anestesiados con pentobarbital (30 mg/Kg iv). El tórax fue abierto, la conducción A-V se bloqueó mediante la inyección de 0,2 ml de formaldehído al 37% en el septum interventricular superior y el ritmo cardíaco se controló con estimulación eléctrica. La taquicardia fue inducida con 5 períodos de estimulación a 210 latidos por minuto, seguido por períodos de 5 minutos con estimulación a 90 latidos por minuto. El número total de perros utilizados fue de 9 controles y 9 taquicárdicos.

Los controles fueron estimulados a 90 latidos por minuto durante 50 minutos. Durante la estimulación el electrocardiograma fue continuamente monitoreado y los gases sanguíneos y pH periódicamente chequeados y compensados en los casos que fue necesario.

Al término de este procedimiento cada animal se sacrificó con una sobredosis de anestesia y el corazón se extrajo y fue perfundido con una solución cardiopléjica fría para su posterior transporte hacia el laboratorio. Esta solución contiene: 2 mM de CaCl₂, 16 mM de MgCl₂, 102 mM de NaCl, 20 mM de KCl, 2 mM de ácido tetra acético etilen glicol

(EGTA) y 20 mM de 3-(N-morpholino) ácido propano sulfónico (MOPS) ajustado con Tris-base a pH 6.8. Todo el protocolo se realizó según lo descrito por Domenech *et al* (2003).

En algunos experimentos en los que se probó la tinción para proteínas fosforiladas se utilizó vesículas de RS obtenidas de animales en los que la frecuencia cardíaca elevada se logró mediante ejercicio. Estos animales fueron sometidos a 5 períodos de 5 minutos de carrera a 6 Km/hora en una cinta sin fin, intercalados con períodos de 5 minutos de reposo. Diez minutos después del último periodo de ejercicio los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital y el corazón se extrajo rápidamente. Las vesículas de RS provenientes de estos corazones estaban congeladas a -80°C y correspondieron a 5 animales. Los resultados de estos animales no se analizaron ya que se utilizaron fundamentalmente en la etapa de montaje del método.

2- Preparación de vesículas de retículo sarcoplasmático

Las vesículas se prepararon según el protocolo descrito por Sánchez *et al.* (2003). En resumen, la pared del ventrículo izquierdo se homogeneizó en un tampón que contiene: 20 mM de MOPS, 600 mM de KCl y 300 mM de Sacarosa, con inhibidores de proteasas (leupeptina 0,008 mM, pepstatina A 0,006 mM, benzamidina 1 mM y PMSF 1 mM) utilizando un homogenizador Ultra Turrax y 3 ciclos de homogenización a 24000 rpm por 30 segundos, con descansos de 15 segundos. A partir de este homogenizado se colectó la fracción que sedimenta entre 28.000 y 120.000 g, y que consiste en vesículas enriquecidas

en RS. La preparación se realizó en ausencia de ditioneitol (DTT). Las fracciones obtenidas se guardaron a - 80° C.

3- Determinación de proteína de la muestra

La concentración de proteína de la muestra se determinó mediante el método de Hartree (1972). Este método es una modificación del método de Lowry y se eligió debido a que es lineal hasta concentraciones de proteínas mayores y la interferencia de la sacarosa es menor.

4- Cuantificación de proteínas fosforiladas en geles de poliacrilamida

4.1 Delipidación de las muestras de vesículas

De acuerdo al método recomendado por los fabricantes fue necesario eliminar los lípidos de la muestra, lo que se realizó por solubilización en cloroformo/metanol. Para ello a la preparación de vesículas (150 μ L que contienen 300 μ g de proteína) se le agregó 600 μ L de metanol, 150 μ L de cloroformo y 450 μ L de H₂O Milli Q, agitando entre cada adición. Luego se centrifugó la muestra a 12000 x g por 5 minutos en centrífuga Eppendorf. Después de descartar la fase orgánica se agregó 450 μ L de metanol, se agitó y centrifugó a 12000 x g por 5 min. Se descartó el sobrenadante y las proteínas sedimentadas se secaron bajo corriente de N₂ y se resuspendieron en buffer de electroforesis con 100 mM DTT, un reductor de grupos SH. Las muestras fueron incubadas a 60° C por 30 minutos.

4.2 Electroforesis

Las muestras se separaron en geles de poliacrilamida cuya concentración dependió de la proteína a analizar:

1. Gel en gradiente 3,5-8% Tris-tricina para el RyR2
2. Gel al 10% Tris-glicina para SERCA2
3. Gel al 15% Tris-tricina para PLB

Debido a las diferencias de tamaño de las proteínas a estudiar, los tiempos de las electroforesis variaron según cada una como se indica a continuación:

RyR2: 2 horas

SERCA2a: 1 hora

PLB: 30 minutos

Luego de la separación electroforética, los geles se fijaron con una solución que contiene 50% de metanol y 10% de ácido acético en H₂O Milli Q.

4.3 Tinción de las muestras

Se utilizó una tinción para proteínas fosforiladas llamada Pro-Q® Diamond (Molecular Probes, OR, EE.UU.), que tiñe selectivamente fosfoproteínas en geles de poliacrilamida, las que se visualizaron como bandas fluorescentes en un transiluminador UV. Así, en forma directa se tiñeron los grupos fosfato que se encuentran esterificando residuos de tirosina, serina o treonina. Este procedimiento tiene la ventaja de detectar fosforilaciones de proteínas sin necesidad de utilizar anticuerpos o radioisótopos. La cantidad de proteína necesaria para la detección se reporta en el rango de 1 a 16 ng de fosfoproteína por banda.

El gel debió incubarse en la solución de tinción durante 60 a 90 minutos, agitando constantemente y protegiéndolo de la luz. Luego de la incubación, se debe desteñir el gel para reducir la señal de fondo con una solución acuosa que contiene 20% de acetonitrilo y 50 mM de acetato de sodio en H₂O Milli Q, pH 4.0, agitando y protegiendo de la luz por un periodo de 30 minutos. Se debe repetir este paso 2 veces más, llegando a un total de 90 minutos. Finalmente, el gel se lavó dos veces con agua desionizada por 5 minutos. Cuando la señal de fondo fue intensa, el segundo lavado duró de 20 a 30 minutos.

Después de obtener la imagen de las bandas de proteínas fosforiladas, el mismo gel fue teñido con el colorante para proteínas totales SYPRO[®] Ruby (Molecular Probes, OR, EE.UU.) también visible a la luz UV. Este colorante detecta proteínas con gran sensibilidad (0.25 a 1 ng de proteína por banda). Los resultados se expresan como la relación proteína fosforilada/proteína total. Como el gel fue fijado al principio del proceso, no se necesita repetir este paso. El gel debió incubarse en esta solución de tinción de proteínas totales durante toda la noche, protegiendo de la luz. Para reducir el efecto de la señal de fondo, se lavó en una solución que contuvo 10% de metanol y 7% de ácido acético en H₂O Milli Q por 30 minutos, siempre protegido de la luz. Antes de exponer el gel al transiluminador, se realizaron 2 lavados con agua desionizada de 5 minutos cada uno, para evitar posibles daños en la pantalla del equipo debido a corrosión.

Finalmente los geles fueron secados para su posterior conservación, perdurando la imagen fijada por la tinción de proteínas totales.

Para tener un patrón de referencia con la cual comparar los resultados, las proteínas separadas fueron teñidas con azul de Coomassie, método tradicionalmente usado en este laboratorio para observar proteínas totales.

4.4 Captura de la imagen

Los geles fueron expuestos en un transiluminador de luz UV y las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Kodak DC-260 ®, almacenando luego las fotos en un computador para su posterior análisis.

5- Determinación de proteínas fosforiladas en Western blots

Los resultados obtenidos con la técnica de tinción fueron validados comparando con los resultados obtenidos mediante la técnica de Western blot utilizando anticuerpos comerciales específicos anti proteína total y anti proteína fosforilada, en los casos en que se dispuso de anticuerpos comerciales. Esta técnica consiste en transferir las proteínas separadas electroforéticamente a una membrana para realizar una reacción antígeno-anticuerpo.

Los geles para la transferencia fueron cargados con una cantidad menor de proteína en comparación con un gel que solo se corrió para electroforesis (5 µg de proteína por carril). Luego de la electroforesis, el gel fue transferido a una membrana de PVDF a voltaje constante, variando el tiempo según la proteína a estudiar. Terminada la transferencia, la membrana fue bloqueada con leche al 5% en Tris Buffer Salino (TBS) que contiene 0.05-

0.1% de Tween (llamado en adelante TBS Tween) por 1 hora y posteriormente se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche. Al finalizar la incubación se realizaron tres lavados con TBS Tween (15, 5 y 5 minutos) y se incubó con el anticuerpo secundario por 1 hora. Finalmente se realizó la misma serie de lavados y se reveló.

Para revelar se incubó la membrana con el reactivo ECL (Enhanced chemiluminescence) (Biological Industries, Israel) por tres minutos. Este reactivo contiene luminol el cual emite luz en presencia del anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. El tiempo de exposición de la película dependió de la intensidad de la luz emitida.

Las concentraciones de los anticuerpos primarios comerciales fueron las siguientes:

- PLB total: 1:25000; Badrilla, Leeds, UK. N° de catálogo A010-14
- PLB Thr¹⁷: 1:5000; Badrilla, Leeds, UK. N° de catálogo A010-13
- PLB Ser¹⁶: 1:5000; Badrilla, Leeds, UK. N° de catálogo A010-12
- RyR2: 1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA. N° de catálogo SC-58648
- RyR2 Ser²⁸⁰⁹: 1:2000; Badrilla, Leeds, UK. N° de catálogo A010-30

6- Análisis de los datos

Las proteínas a estudiar se identificaron por su migración de acuerdo a su peso molecular. El área de las bandas de proteína detectadas en el gel se cuantificó con el programa Quantity One ® de Biorad. Las áreas medidas se normalizaron por el promedio de las áreas de las mismas bandas obtenidas en animales controles.

Para saber si existe o no una diferencia significativa entre los controles y los taquicárdicos, se realizó una prueba t de Student para muestras independientes. Se consideró significativo un $p < 0.05$

RESULTADOS

1. Evaluación de la Técnica de Tinción fluorescente para fosfoproteínas y proteínas totales

Un objetivo específico de esta memoria fue estandarizar un método de tinción fluorescente para proteínas fosforiladas y totales con el fin de comparar el grado de fosforilación del RyR2, SERCA2a y PLB en RS de perros taquicárdicos y controles, debido a que los anticuerpos disponibles solamente permiten medir algunos sitios de fosforilación y no todos los posibles que pueden tener un rol en la modificación funcional de estas proteínas. La Figura 1 muestra ejemplos de electroforesis para las proteínas mencionadas. Puede observarse que para cada una de las proteínas investigadas se obtiene bandas nítidas, claramente definidas y con poca señal de fondo. Las bandas oscuras que se muestran contiguas a cada gel, corresponden a las bandas detectadas en Western blots con anticuerpos específicos.

Los resultados obtenidos mediante la tinción comercial se muestran en la Figura 2. Se puede observar que el número de bandas obtenidas en cada carril es menor que los que se observan con Azul de Coomassie (ver Figura 1). Este hecho indica que la sensibilidad de esta técnica es menor que la de la tinción de azul de Coomassie y muchas proteínas no fueron detectadas. Además se puede observar que tanto la tinción para fosfoproteínas (Figura 2B y 2D) como la tinción para proteínas totales (Figura 2A y 2C), producen bandas difusas y una alta señal de fondo. El aumento del número de lavados después de la incubación con el colorante o el aumento del tiempo de lavados no mejoró la calidad de la

imagen obtenida. En la Figura 2A se observa una banda débil en la posición del RyR2 (506 Kda), la que escasamente se puede visualizar en el gel teñido para proteínas fosforiladas. Se puede ver además que la única banda de proteínas visible en el estándar de peso molecular es la proteína de 75 KDa, sin que las otras proteínas que son perfectamente visibles con la tinción de Coomassie se puedan percibir.

Debido a que RyR2, SERCA2a y PLB son proteínas integrales de membrana y por lo tanto son insolubles en agua es posible que durante el proceso de delipidación, estas proteínas permanezcan en la fase lipídica y debido a eso disminuyan tanto su concentración que no son visibles en el gel. Se comparó entonces la tinción de proteínas separadas sin una delipidación previa. Los geles mostrados en la Figura 2C y D, contienen la misma muestra de RS control sin delipidar y delipidada. Pese a que el proceso de delipidación es bastante agresivo, no se observaron diferencias significativas en la tinción, por lo que concluimos que el procedimiento de delipidación no produce una pérdida importante de proteínas. Se realizaron 20 geles con distintas concentraciones de proteínas y con diferentes tiempos de tinción, sin obtener resultados mejores que los mostrados en la Figura 2. No intentamos investigar PLB con esta técnica ya que es una proteína que escasamente se ve en geles teñidos con Azul de Coomassie.

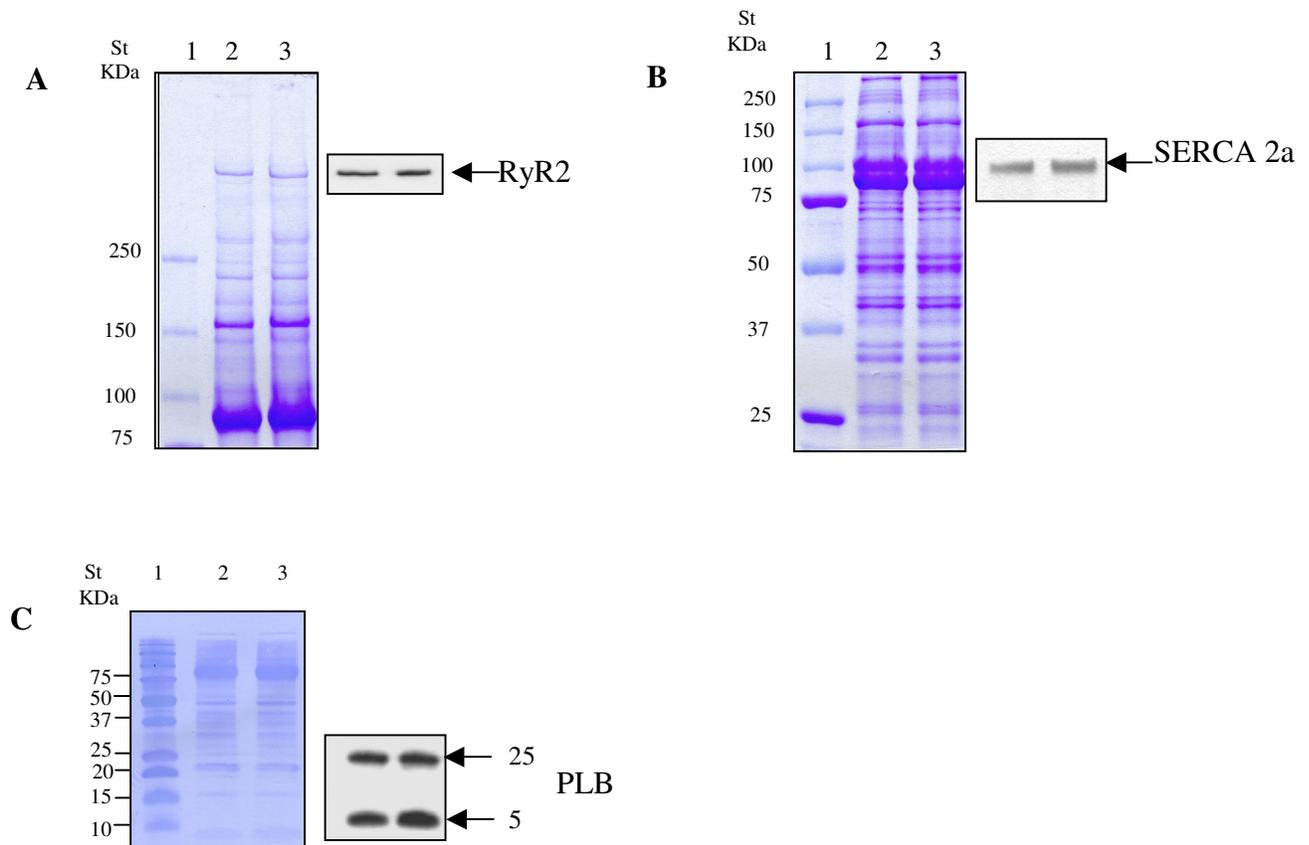


Figura 1: Separación electroforética e identificación de RyR2, SERCA 2a y PLB en Western blots

A Gel en gradiente 3.5% - 8% Tris-tricina teñido con Azul de Coomassie y Western blot representativo para RyR2. **Carril 1:** Estándar de peso molecular; **Carriles 2-3:** se cargaron distintas cantidades de proteínas provenientes de RS de corazón de perro control.

B Gel al 10% Tris-glicina teñido con Azul de Coomassie y Western blot representativo para SERCA2a. **Carril 1:** Estándar de peso molecular; **Carriles 2-3:** Se cargó la misma cantidad de proteínas de RS de corazón de perro control

C Gel al 15% Tris-tricina teñido con Azul de Coomassie y Western blot representativo para PLB pentamérico y monomérico. **Carril 1:** Estándar de peso molecular; **Carriles 2-3:** distintas cantidades de RS de corazón de perro control

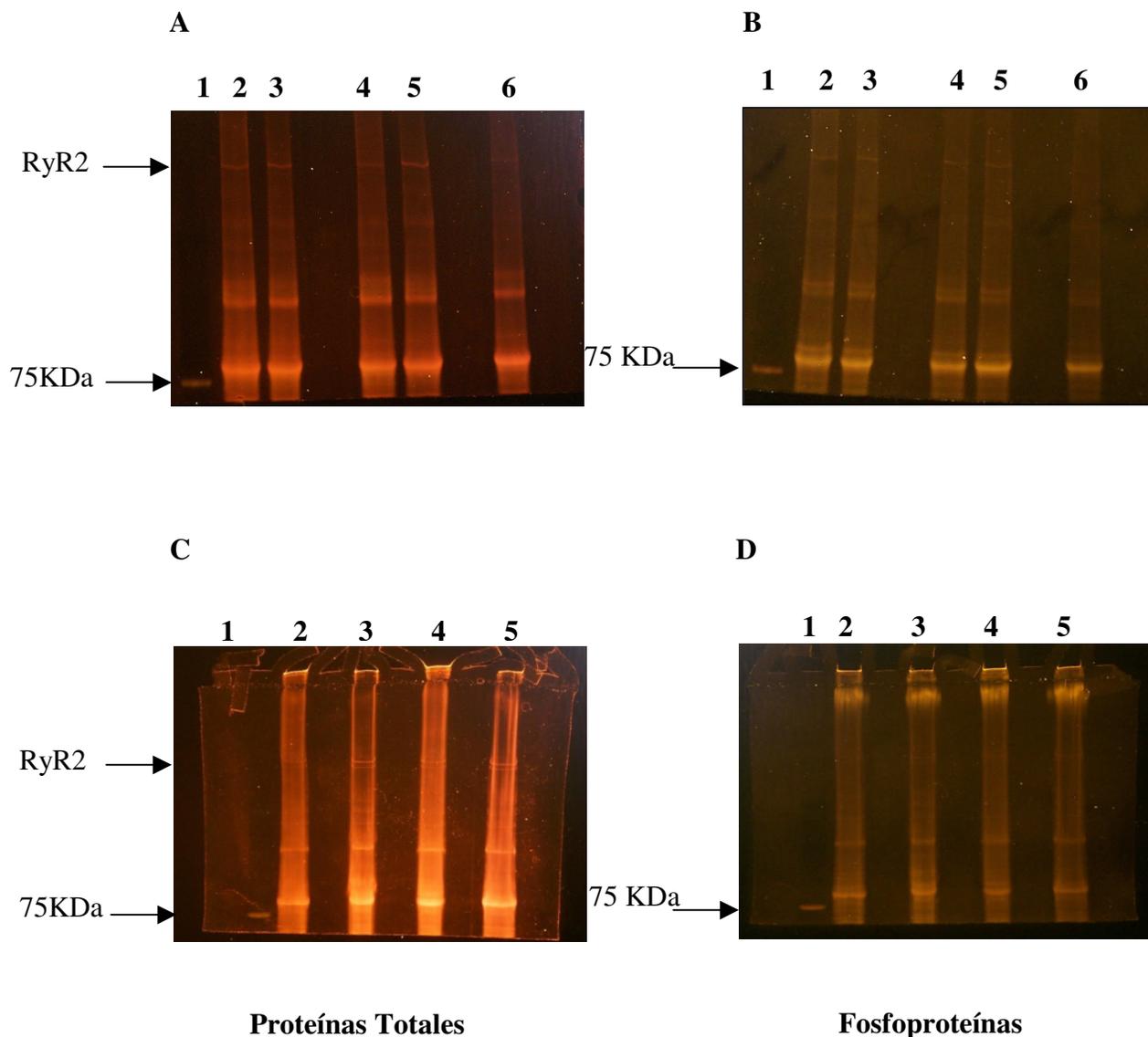


Figura 2: Tinción fluorescente para fosfoproteínas y proteínas totales

A Gel teñido con SYPRO® Ruby para proteínas totales. **B** Gel teñido con Pro-Q® Diamond para fosfoproteínas. *Carril 1*: Estándar de peso molecular; *Carril 2 y 4*: RS de corazón de perro control; *Carril 3 y 5*: RS de corazón de perro taquicárdico; *Carril 6*: RS de corazón de perro sometido a ejercicio. **C**:Gel teñido con SYPRO® Ruby para proteínas totales, **D** Gel teñido con Pro-Q® Diamond para fosfoproteínas. *Carril 1*: Estándar de peso molecular; *Carril 2 y 4*: RS de corazón control sin delipidar; *Carril 3 y 5*: RS de perro corazón control delipidada;

De acuerdo a los resultados obtenidos, concluimos que tanto la tinción para proteínas totales como para proteínas fosforiladas es poco sensible y no es útil para detectar proteínas fosforiladas, menos aún cuando ellas son un componente minoritario de la fracción investigada.

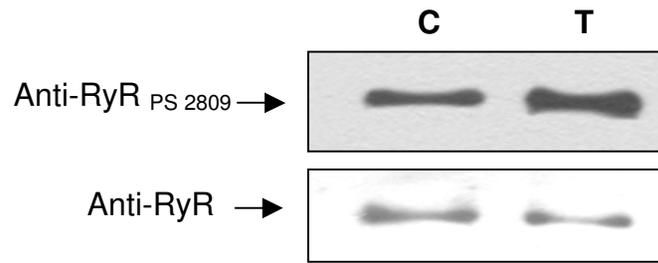
Se adoptó por lo tanto el método tradicional de identificación de proteínas fosforiladas que consiste en el reconocimiento en base a los anticuerpos comerciales específicos. Es por esto que no se pudo determinar las diferencias de fosforilación para la SERCA2a.

2. Determinación de la fosforilación de RyR2 mediante la técnica de Western blot

Aunque este método sólo permite detectar cambios en el estado de fosforilación en la Ser²⁸⁰⁹, que es el sitio para el cual se dispone de anticuerpos comerciales, se utilizó en esta memoria por ser el único método simple y seguro del cual se dispone en el laboratorio.

Se analizaron fracciones de RS aisladas provenientes de 9 perros controles y de 9 perros sometidos a taquicardia eléctrica. Un Western blot representativo obtenido para RyR2 fosforilado en Ser²⁸⁰⁹ y para RyR2 total se muestra en la Figura 3A. El promedio de la cuantificación de todas las determinaciones de fosforilación normalizadas por el contenido total de RyR2 presente en cada fracción se muestra en la Figura 3B. La taquicardia eléctrica produjo un aumento significativo de un 50 % de fosforilación en Ser²⁸⁰⁹ ($P < 0.0001$).

A



B

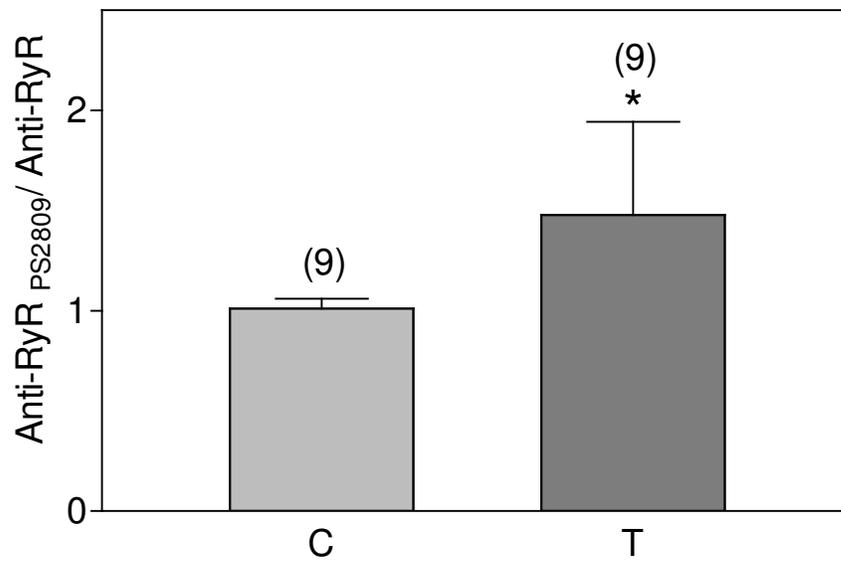


Figura 3: Fosforilación de RyR2 mediante la técnica de Western blot

Panel A: Western blot representativo para anti-P-RyR serina 2809 y anti-RyR en fracciones de RS de animales controles o sometidos a taquicardia.

Panel B: Resumen de la razón entre RyR fosforilado y RyR total para 9 animales controles (C) y 9 animales sometidos a taquicardia (T). Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar *P<0.0001

3. Determinación de la fosforilación de PLB mediante la técnica de Western blot

Debido a que el PLB es una proteína de bajo peso molecular, es necesario comprobar que la estimulación eléctrica no modifica el contenido total de ella en fracciones aisladas de RS. La figura 4 muestra que el anticuerpo anti PLB reconoce dos bandas de proteína que corresponden a la forma monomérica y pentamérica de PLB. No hubo diferencias en la densidad de las bandas de PLB total (monómero + pentámero) entre animales controles y sometidos a taquicardia eléctrica. Los anticuerpos anti PLB fosforilado detectaron sólo la forma pentamérica de la proteína. Al investigar el efecto de la estimulación eléctrica sobre la fosforilación de PLB pentamérico (Figura 5) se encontró que ésta aumenta la fosforilación en Thr¹⁷, en tanto que la fosforilación en Ser¹⁶ disminuye. La cuantificación de estos resultados se muestra en la Figura 6. El aumento de fosforilación en Thr¹⁷ fue de 5 veces mientras que la fosforilación en Ser¹⁶ disminuyó 2,5 veces.

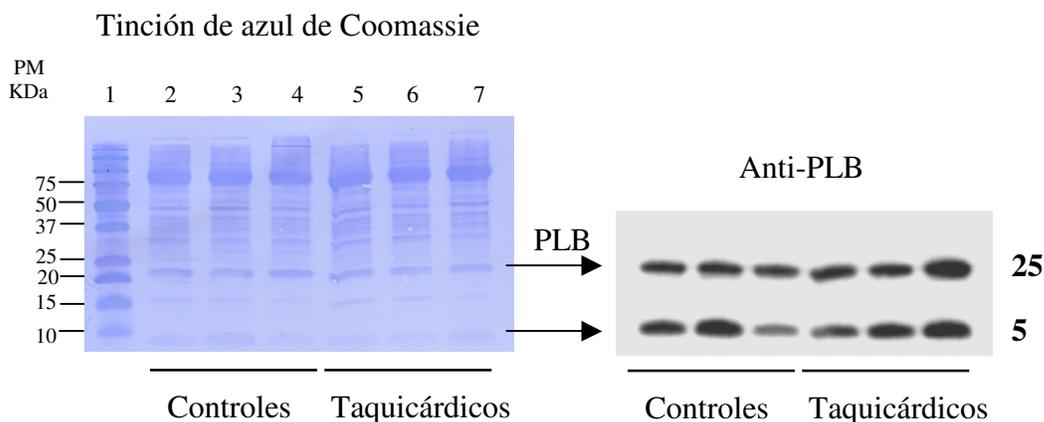


Figura 4: Efecto de la taquicardia eléctrica sobre el contenido de PLB

Gel al 15% Tris-tricina teñido con Azul de Coomassie y Western blot representativo para PLB. **Carril 1:** Estándar de peso molecular; **Carriles 2-4:** distintas muestras de RS de corazón de perro control. **Carriles 5-7** distintas muestras de RS de corazón de perro sometido a taquicardia eléctrica.

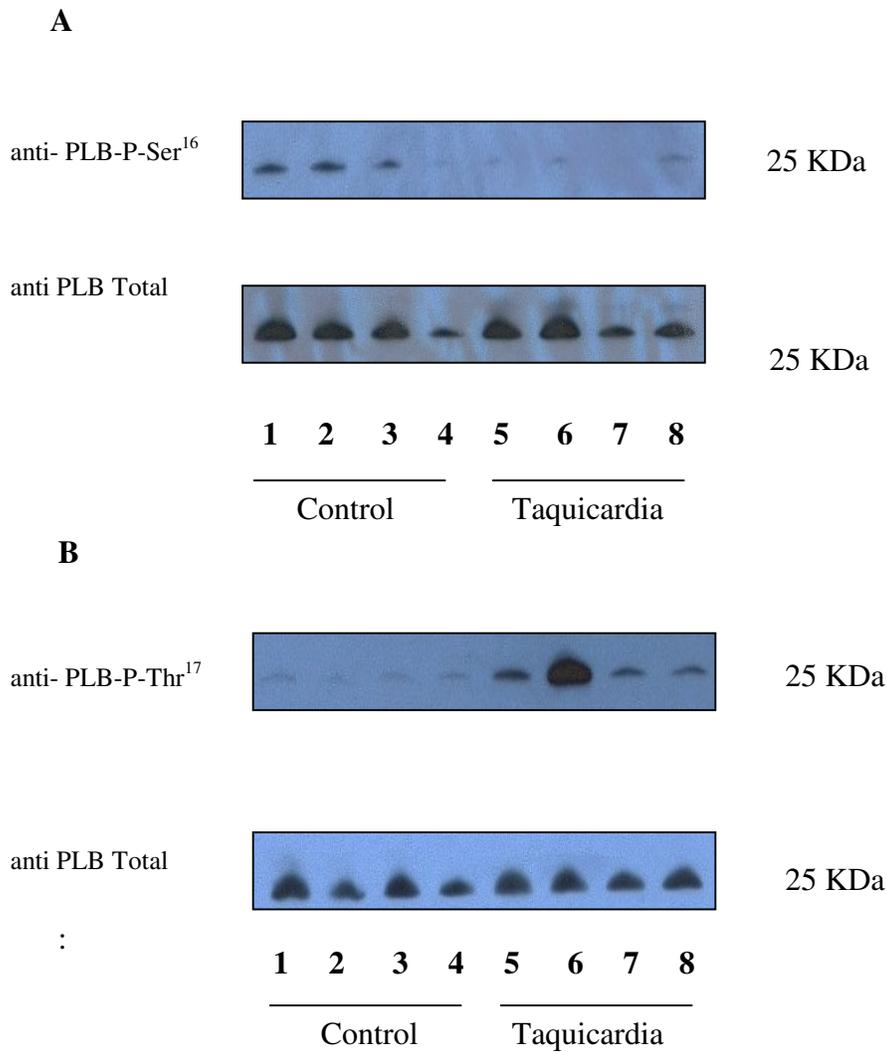


Figura 5: Efecto de la taquicardia eléctrica sobre la fosforilación del PLB pentamérico

A: Western blot representativo anti PLB total, anti p-PLB-Ser¹⁶ y **B:** anti p-PLB-Thr¹⁷ y PLB total en vesículas de RS de animales controles y los sometidos a Taquicardia, **Carriles 1 al 4:** RS control; **Carriles 5 al 8:** RS taquicardia.

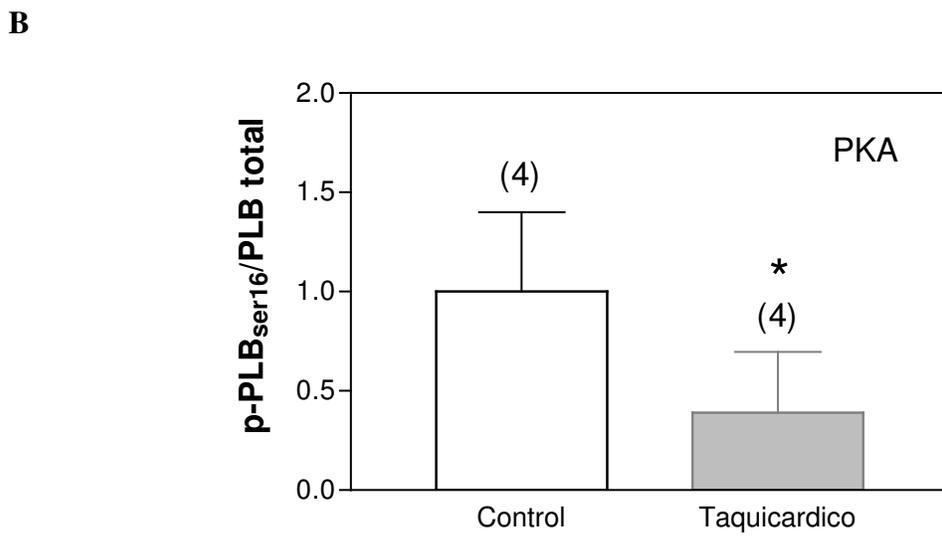
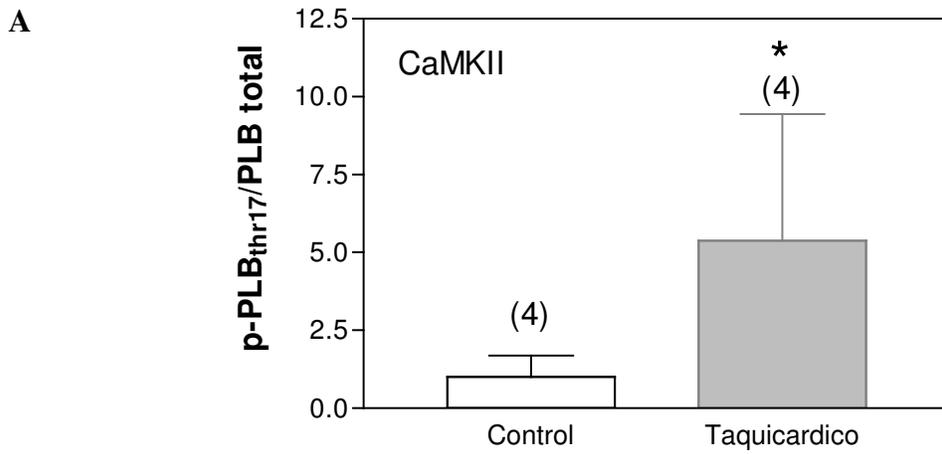


Figura 6: Fosforilación de PLB pentamérico mediante la técnica de Western blot

A: Razón entre el anti p-PLB-Thr¹⁷ y PLB total. **B:** Razón entre anti p-PLB-Ser¹⁶ y PLB total. N= 4 para controles y taquicárdicos. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar *P < 0.05

DISCUSIÓN

La investigación de los cambios en la fosforilación de proteínas en respuesta a diversos estímulos fisiológicos, es un problema difícil de estudiar debido a la falta de métodos de detección. El objetivo inicial de esta memoria fue evaluar un método de detección de proteínas fosforiladas en geles de poliacrilamida, promovido por su fabricante como un método sensible y sencillo de realizar. Sin embargo, se pudo comprobar que el método no era capaz de detectar proteínas que se encuentran en baja concentración en membranas subcelulares y su sensibilidad para detectar proteínas totales era mucho menor que el de tinción con azul de Coomassie, que es una tinción de uso rutinario en muchos laboratorios. Se decidió entonces estudiar los efectos de la estimulación eléctrica sobre la fosforilación de RyR2 y PLB utilizando Western blots y anticuerpos comerciales.

Encontramos que la estimulación eléctrica produce un significativo aumento de la fosforilación de RyR2 en Ser²⁸⁰⁹. Se ha reportado que la Ser²⁸⁰⁹ del RyR2 se fosforila exclusivamente por PKA (Marks et al, 2000) y esta fosforilación tiene efectos importantes en la insuficiencia cardíaca. En esta condición disminuye tanto la cantidad como la velocidad de liberación de Ca⁺², con lo que disminuye la fuerza contráctil del corazón. Se ha propuesto que la fosforilación de los RyR2 producido por la estimulación adrenérgica aumentada que existe en la insuficiencia cardíaca contribuye en forma importante a producir una liberación de Ca⁺² anormal. La “hiperfosforilación” del RyR2 produciría la disociación de FKBP12.6, la proteína que regula la apertura y cierre sincronizado de estos receptores/canales. No existe acuerdo entre los distintos investigadores acerca de este mecanismo de malfuncionamiento del RS en la insuficiencia cardíaca propuesto por Marks

y Wehrens (2004) ya que otros autores lo descartan (Xiao *et al*, 2004). Durante el protocolo de estimulación eléctrica realizado en esta memoria no habría una estimulación beta adrenérgica importante (Ross *et al*, 1995), pero existe un significativo aumento en la fosforilación del RyR2, lo que sugiere que en ella participa(n) otras quinasas. El patrón de fosforilación de PLB, discutido más adelante, sugiere que esta quinasa sería CaMKII.

Frente a aumentos de la frecuencia de estimulación eléctrica debe necesariamente activarse la acción de SERCA2a, para restituir la concentración de calcio a los niveles de reposo. La fosforilación de PLB juega un papel crucial en esta activación, ya que se ha demostrado que la fosforilación en la Ser¹⁶ y/o en la Thr¹⁷ promueven la formación de pentámeros de PLB, lo que revierte la inhibición sobre la SERCA2a y, en consecuencia, activa la recaptación de Ca⁺² hacia el RS (Huke *et al.*, 2004). Muchos estudios han considerado que la fosforilación de PLB en Ser¹⁶ mediada por PKA en respuesta a la estimulación beta adrenérgica es un prerrequisito obligatorio para la fosforilación de Thr¹⁷ por CaMKII. Otros estudios, en cambio, indican que el aumento de la frecuencia cardíaca aumenta el calcio citosólico, lo que activa CaMKII, la que puede fosforilar PLB en Thr¹⁷ y activar SERCA2a en ausencia de fosforilación en Ser¹⁶ (Zhao *et al*, 2004). Los resultados obtenidos en esta memoria apoyan esta segunda posibilidad, ya que el aumento de fosforilación de PLB en Thr¹⁷ debe haber sido suficiente para activar la SERCA2a, puesto que este protocolo de estimulación a alta frecuencia permite la rápida y completa relajación del corazón entre cada estimulación.

El patrón de fosforilación de PLB indica que la quinasa activada en condiciones de alta frecuencia de estimulación es CaMKII. Esta quinasa sería por lo tanto la responsable de la fosforilación del RyR2 en Ser²⁸⁰⁹. Esta es una evidencia más para descartar que la

responsable de la fosforilación de RyR2 sea PKA y que esa quinasa sea la responsable del malfuncionamiento del canal en la insuficiencia cardíaca. No tenemos una explicación para la disminución de la fosforilación de PLB en Ser¹⁶ observada en este trabajo. Entre las posibilidades que pudieran explicar este hecho, está la activación de fosfatasas por el protocolo de taquicardia, que puedan remover específicamente este fosfato. Este hecho no ha sido reportado en otras especies o en protocolos de estimulación y merece ser estudiado con mayor detalle.

CONCLUSIONES

- El método de tinción para proteínas fosforiladas y totales no ofreció resultados satisfactorios, debido a la poca definición que se observó de las bandas tanto del RyR2, SERCA2a y PLB, por lo que el método de Western blot con anticuerpos específicos para las formas fosforiladas de estas proteínas sigue siendo el método de elección.
- El modelo de preconditionamiento cardíaco mediado por taquicardia eléctrica produce un aumento significativo en la fosforilación del RyR2 en Ser²⁸⁰⁹ la que podría ser mediada por la acción de CaMKII.
- Este modelo de preconditionamiento también produce un aumento significativo en la fosforilación del PLB pentamérico en Thr¹⁷ y una disminución en la fosforilación en Ser¹⁶.
- La fosforilación de RyR2 contribuiría a aumentar la velocidad de liberación de Ca⁺² desde el RS mientras que la fosforilación de PLB en Thr¹⁷ sería suficiente para aumentar la velocidad de recaptura de Ca⁺² para producir la relajación.

BIBLIOGRAFÍA

-BERS, D.M. 2001a. Cardiac Inotropy and Ca Mismanagement. **In:** Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. 2^a ed. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht / Boston / London. pp. 273-331.

-BERS, D.M. 2001b. Sarcoplasmic reticulum Ca uptake, content and release. **In:** Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. 2^a ed. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht / Boston / London. pp. 161-202.

-DOMENECH, R.J.; SANCHEZ, G.; DONOSO, P.; PARRA, V.; MACHO, P. 2003. Effect of tachycardia on myocardial sarcoplasmic reticulum and Ca²⁺ dynamics: a mechanism for preconditioning?. *J Mol.Cell Cardiol.* 35:1429-1437.

-HARTREE, E.F. 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochem.* 48:422-427.

-HUKE, S.; PERIASAMY, M. 2004. Phosphorylation-status of phospholamban and calsequestrin modifies their affinity towards commonly used antibodies. *J Mol.Cell Cardiol.* 37:795-799.

-MARX, S.O.; REIKEN, S.; HISAMATSU, Y.; JAYARAMAN, T.; BURKHOFF, D.; ROSEMBLIT, N.; MARKS, A.R. 2000. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6

from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. 101:365-376.

-RODRIGUEZ, P.; BHOGAL, M.S.; COLYER, J. 2003. Stoichiometric phosphorylation of cardiac ryanodine receptor on serine 2809 by calmodulin-dependent kinase II and protein kinase A. *J Biol.Chem.* 278:38593-38600

-ROSS, J.; MIURA, T.; KAMBAYASHI, M.; EISING, G.; RYU, K. 1995. Adrenergic control of the force-frequency relation. *Circulation* 92: 2327-2332.

-SANCHEZ, G.; HIDALGO, C.; DONOSO, P. 2003. Kinetic studies of calcium-induced calcium release in cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biophys.J.* 84:2319-2330.

-TERENTYEV, D.; VIATCHENKO-KARPINSKI, S.; GYORKE, I.; TERENTYEVA, R.; GYORKE, S. 2003. Protein phosphatases decrease sarcoplasmic reticulum calcium content by stimulating calcium release in cardiac myocytes. *J Physiol.* 552:109-118.

-VALDIVIA, H.H.; KAPLAN, J.H.; ELLIS-DAVIES, G.C.; LEDERER, W.J. 1995. Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg²⁺ and phosphorylation. *Science.* 267:1997-2000.

-WEHRENS, X.H.; MARKS, A.R.. 2004. Novel therapeutic approaches for heart failure by normalizing calcium cycling. *Nat.Rev.Drug Discov.* 3:565-573.

-XIAO, B.; SUTHERLAND, C.; WALSH, MP.; CHEN, SR. 2004. Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca²⁺-release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ Res.* 94(4):487-495.

-XU, A.; NARAYANAN, N. 2000. Reversible inhibition of the calcium-pumping ATPase in native cardiac sarcoplasmic reticulum by a calmodulin-binding peptide. Evidence for calmodulin-dependent regulation of the V(max) of calcium transport. *J Biol.Chem.* 275:4407-4416.

-ZHAO, W.; UEHARA, Y.; CHU, G.; SONG, Q.; QIAN, J.; YOUNG, K.; KRANIAS, EG. 2004. Threonine-17 phosphorylation of phospholamban: a key determinant of frequency-dependent increase of cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol.* 37(2):607-612.