

FC
72

CARACTERIZACION BIOQUIMICA Y ELECTROFISIOLOGICA DE LOS
RECEPTORES DE RIANODINA DE CEREBELO DE AVE

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Doctor en Ciencias con mención Biología

FACULTAD DE CIENCIAS

por

Jimena Alejandra Sierralta Jara

Junio 1996

Director de Tesis: Dr. Benjamín Alvaro Suárez Isla

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la tesis de Doctorado Presentada por el candidato.

Jimena Alejandra Sierralta Jara

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Biología, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 25 Junio de 1996.

Director de Tesis:

Dr. Benjamín A. Suárez Isla



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Tulio Núñez



Dr. Osvaldo Alvarez



Dra. Cecilia Vergara

C. Vergara

Dr. Gonzalo Bustos



AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud a mi tutor, el Dr. Benjamín Suárez que me acogió en su laboratorio me impulsó y apoyó durante el desarrollo de esta Tesis. El no solo me enseñó y dirigió, si no también me dió la libertad para tomar mi propio camino.

Agradezco también a mis amigos, Carmen, Benjamín, Fredy, Manuel y Pato que al compartir conmigo estos años de trabajo me dieron compañía, apoyo, comprensión y mucha alegría. Al Dr. Manuel Kukuljan por corregir y criticar este manuscrito. A la Dra. María Angélica Carrasco, por su amistad y asesoría.

Debo agradecer también a Conicyt que me financió a través de una beca y a Fondecyt y a la Dirección Técnica y de Investigación de la Universidad de Chile que financiaron este trabajo. Agradezco también a la Dra. Cecilia Hidalgo que me facilitó equipos y espacio en la etapa inicial de mi tesis.

INDICE DE MATERIAS

AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE MATERIAS	iii
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	xvi
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xx
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	6
1. Los sistemas de control del calcio intracelular en el cerebelo:	6

1.1 Características generales de las neuronas de Purkinje	7
1.2 Compartimientos de calcio en el soma	12
2. El receptor de rianodina	13
2.1. Tipos de RyR: clasificación y localización.	15
2.2. Características de la unión de [³ H]-Ry	18
2.2.1. Efecto de calcio sobre la unión de [³ H]-Ry.	19
2.2.2. Otros activadores de la unión.	19
2.2.3. Sitios de alta y de baja afinidad en el receptor de Ry.	20
3. Características de los canales asociados a receptores de Ry	21
3.1. Efecto de calcio sobre la fracción de tiempo que se encuentran los canales abiertos.	22
4. Cinética de los canales asociados a receptores de Ry.	24
5. Función de los receptores de Ry neuronales	26
OBJETIVOS	29
1. OBJETIVO GENERAL	29
2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.	29
METODOS	30

1. - Preparación de membranas de retículo endoplásmico de cerebelo de pollo	30
2. - Experimentos de Unión	33
2.1. Ligamen de [³ H]-Ry:	33
2.1.1. Experimentos de saturación	33
2.1.2. Experimentos cinéticos	35
2.1.2.1. <i>Cinética de asociación</i>	35
2.1.2.2. <i>Cinética de disociación</i>	36
2.1.3. Experimentos de desplazamiento	37
2.1.4. Dependencia de calcio y cafeína de la unión de [³ H]-Ry	37
2.2. Ligamen de [³ H]-IP ₃	39
3. Electroforesis e inmunodetección (western blots).	40
4. -Experimentos de canal único	41
4.1. Registro de canal único en bicapas planas.	41
4.2. Adquisición y análisis de datos	43
5. Lista de reactivos usados:	44
RESULTADOS	46
1. Obtención de una preparación de membranas enriquecida en RyR	46
1.1. Caracterización de la preparación de membranas	47

1.1.1. Distribución de la unión de [³ H]-Ry e [³ H]-IP ₃ en las fracciones de membrana de cerebelo de pollo	47
1.1.2. Distribución de la unión de [³ H]-STX	49
1.1.3. Análisis de la composición de proteínas de las fracciones de membrana.	52
1.2. Estudios de unión de [³ H]-Ry en membranas de la fracción P3-3	54
1.2.1. Características del ligamen de [³ H]-Ry	56
1.2.1.1. Experimentos de cinética de unión de [³ H]-Ry	56
1.2.1.1.1. Cinética de asociación	56
1.2.1.1.2. Cinética de disociación.	58
1.2.1.2. Experimentos de saturación	60
1.2.1.3. Experimentos de desplazamiento	63
1.2.2. Efecto de la concentración de calcio en la unión de [³ H]-Ry	66
1.2.3. Efecto de cafeína en la unión de [³ H]-Ry	69
1.3. Fracción P3-2	74
2. Registro y caracterización de los canales asociados a los RyR	77
2.1. Uso de metanosulfonato de cesio.	77

2.2. Incorporación de canales	78
2.3. Conductancia	84
2.4. Efecto de Ry	84
2.5. Farmacología	88
2.6. Selectividad:	88
2.7. Efecto de agonistas sobre P _o	91
2.7.1. Efecto de cafeína.	91
2.7.2. Efecto de calcio.	93
3. Análisis cinético del efecto de agonistas.	97
3.1.1. Efectos de calcio sobre la cinética de apertura y cierre.	99
3.1.2. Efecto de cafeína	108
DISCUSION	112
1. Caracterización de la preparación de membranas	113
1.1. Geles y análisis por western blot	114
2. Estudios de unión de [³ H]-Ry en membranas de la fracción P3-3	115
2.1. Características del ligamen de [³ H]-Ry	115
2.1.1. Sitios de baja afinidad para Ry.	116
2.2. Efecto de la concentración de calcio en la unión de [³ H]- Ry	118
2.3. Efecto de cafeína en la unión de [³ H]-Ry	120

3. Registro y caracterización de los canales asociadas a los RyR.	122
3.1. Efecto de agonistas en el tiempo fraccional abierto	122
3.1.1. Efecto de cafeína sobre tiempo fraccional abierto	122
3.1.2. Efecto de calcio sobre el tiempo fraccional abierto.	123
4. Análisis cinético del efecto de agonistas.	125
5. Asociación entre unión de [³ H]-Ry y grado de activación del canal	128
6. Son los RyR de cerebelo las isoformas α y β de músculo esquelético de ave.	129
7. Significado funcional de la heterogeneidad molecular	131
7.1 Posible papel de los RyR en la depresión de larga duración (LTD)	132
7.2 Ondas de calcio	134
REFERENCIAS	138

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Composición de las soluciones de pCa controlado 38

Tabla 2: Constantes de disociación para la unión de [³H]-Ry obtenidas por distintos métodos. 65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema de conexiones neuronales y organización general del cerebelo** 8
- Figura 2: Esquema del procedimiento utilizado para obtener una fracción microsomal enriquecida en receptores de rianodina.** 32
- Figura 3: Distribución de la unión de [³H]-Ry e [³H]-IP₃ en las fracciones y subfracciones de cerebelo de pollo.** 48
- Figura 4: Distribución de la unión de [³H]-Ry y [³H]-Saxitoxina en las fracciones y subfracciones de cerebelo de pollo.** 50
- Figura 5: Análisis de la composición de proteínas de fracciones y subfracciones de membranas de cerebelo de pollo por gel de poliacrilamida en presencia de SDS y DTT.** 53

Figura 6: Western blot de la fracción P3-3 con el anticuerpo específico para la isoforma α de músculo esquelético de pollo.	55
Figura 7: Cinética de asociación de la unión de [3H]-Ry a membranas de la fracción P3-3 de cerebelo de pollo.	57
Figura 8: Cinética de disociación por un exceso de medio de incubación.	59
Figura 9: Cinética de disociación por un exceso de Ry fría.	61
Figura 10: Experimento de saturación de la unión de [3H]-Ry a membranas de la subfracción P3-3.	62
Figura 11: Desplazamiento de la unión de [3H]-Ry por Ry fría.	64
Figura 12: Dependencia de calcio de la unión de [3H]-Ry.	67
Figura 13: Comparación de la dependencia de calcio de la unión de [3H]-Ry a membranas de músculo de conejo y de cerebelo de pollo	70

Figura 14: Efecto de 10 mM cafeína en la unión de [³H]-Ry a membranas de cerebelo de pollo.	72
Figura 15: Dependencia de Ca⁺² de la unión de [³H]-Ry a membranas de músculo esquelético de conejo en condiciones control y estimulada por 10 mM cafeína.	73
Figura 16: Efecto de concentraciones crecientes de cafeína en la unión de [³H]-Ry a la fracción P3-3 de cerebelo de pollo	75
Figura 17: Efecto de concentraciones crecientes de cafeína en la unión de [³H]-Ry a membranas de músculo esquelético de conejo.	76
Figura 18: Distribución de conductancias	79
Figura 19: Registros representativos de canales de baja conductancia observados en la subfracción P3-3 de cerebelo de pollo.	80
Figura 20: Registro representativo de un canal de alta conductancia.	82

Figura 21: Relación corriente voltaje promedio de 5 canales de alta conductancia.	85
Figura 22: Efecto de R_y en los canales de alta conductancia.	87
Figura 23: Farmacología de los canales de alta conductancia de la subfracción P3-3 de cerebelo de pollo.	89
Figura 24: Comparación de curvas corriente-voltaje en presencia de cationes monovalentes y divalentes.	90
Figura 25 Efecto de la concentración de cafeína en la fracción de tiempo abierto.	92
Figura 26: Efecto de calcio y cafeína en el tiempo fraccional abierto	94
Figura 27: Dependencia de calcio sobre P_o. Registros representativos del canal de tipo inactivante.	95
Figura 28: Dependencia de calcio sobre P_o y registros representativos de un canal del tipo no inactivante.	96

Figura 29: Efecto de calcio sobre P_o de los canales de tipo inactivante y no inactivante.	98
Figura 30: Histogramas no condicionados de duraciones de tiempos cerrados y abiertos para un registro típico.	100
Figura 31: Efecto de calcio en las constantes cinéticas de un canal sensible a Ry.	102
Figura 32: Ajuste de funciones <i>gamma</i> a la distribución de tiempos abiertos (A) y cerrados (B) promedios.	104
Figura 33: Efecto de calcio en las constantes de tiempos abiertos y cerrados promedios intraburst..	106
Figura 34: Efecto del calcio en la cinética interburst.	107
Figura 35: Efecto de la cafeína en las constantes cinéticas de un canal sensible a Ry.	109

**Figura 36: Efecto de cafeína en las constantes de tiempo abiertos y
cerrados promedios intraburst..**

111

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ATP	: Adenosintrisfosfato
DTT	: Ditiotreitól
EDTA	: Ácido etilén diamino tetra acético
EGTA	: Ácido etilén-bis(oxi-etilénitrilo)tetraacético
HEDTA	: Ácido N-hidroxietilendiaminotetra acético
I	: Corriente
IgG	: Inmunoglobulina G
Khz	: Kilo Hertz, 10^3 Hertz
ms	: Milisegundos, 10^{-3} segundos
mV	: Milivolts, 10^{-3} Volts
NTA	: Ácido nitrilotri acético
pA	: pico ampere, 10^{-12} Amperes
PMSF	: Para metil sulfonil fluorida
pS	: Pico siemens, 10^{-12} siemens, unidad de conductancia
SDS	: Dodecil sulfato de sodio, lauril sulfato de sodio
Tween 20	: Polioxietilén sorbitán, monolaurato
V	: Potencial eléctrico

RESUMEN

La liberación de calcio desde reservorios internos en neuronas es de importancia en la generación de los aumentos de calcio intracelular. La liberación de calcio en neuronas es mediada por proteínas con actividad de canales iónicos presentes en la membrana del retículo endoplasmático. En la literatura se describen dos tipos de canales, el receptor a rianodina (RyR), el que está asociado al compartimento de calcio liberable por calcio y el receptor de inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃ R) que se asocia con el compartimento de calcio liberable por el segundo mensajero inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃).

Los RyR son macromoléculas diversas y las evidencias obtenidas mediante técnicas de biología molecular e inmunológicas demuestran que en el cerebro de mamífero coexisten tres isoformas. Dos de ellas son propias de músculos cardíaco y esquelético, una tercera isoforma es específica de cerebro. La contraparte funcional de la heterogeneidad molecular observada no ha sido estudiada debido a que los canales de liberación de calcio neuronales no se han caracterizado y sólo la isoforma cardíaca, que es la más abundante, ha sido purificada e incorporada en bicapas lipídicas. En músculo de ave se ha encontrado tres isoformas y, como en mamíferos, las tres se expresan en el

sistema nervioso central concentrándose en las neuronas grandes. Entre ellas es de especial interés la neurona de Purkinje del cerebelo del pollo por ser prácticamente la única neurona de la corteza cerebelar donde se expresa el RyR. Las neuronas de Purkinje se caracterizan por la abundancia y heterogeneidad de sus almacenes de calcio intracelular y en ellas se expresan abundantemente el IP₃R y al menos dos isoformas de RyR.

En este trabajo se caracterizaron bioquímica y electrofisiológicamente los RyR del cerebelo de pollo. Para esto se desarrolló una preparación de membranas enriquecida en RyR que permitió hacer estudios de unión de [³H]-Ry y de incorporación de vesículas en bicapas planas para el registro de canales únicos. Los resultados más importantes de esta tesis son:

1. La fracción de membranas enriquecida en RyR presentó dos sitios de unión de diferente afinidad claramente distinguibles, comprobado por métodos de desplazamiento y de saturación. El sitio de alta afinidad presentó un K_D promedio de 2,2 nM y el sitio de baja afinidad presentó un K_D variable, superior a 100 nM.
2. Los estudios de unión de [³H]-Ry mostraron que el sitio de alta afinidad tenía una fuerte dependencia de calcio con un K_{0,5} = 1,08 μM. La unión de [³H]-Ry no presentó inactivación por calcio.
3. La unión de [³H]-Ry no fue modificada por cafeína hasta una concentración de 10 mM

4. Los canales únicos registrados en bicapas presentaron características farmacológicas y de cinética de apertura y cierre que permitieron identificarlos como RyR.
5. La cafeína (0,5 a 5 mM) aumentó el tiempo fraccional abierto (P_o) de los canales. Este aumento de P_o fue dependiente de calcio.
6. La dependencia de calcio de P_o de los canales registrados resultó ser heterogénea, pudiendo clasificarse en dos poblaciones que difirieron en la sensibilidad al calcio de la activación y en la inactivación por concentraciones de calcio mayores que 100 μ M.
7. Estos resultados sugieren por primera vez que la heterogeneidad molecular descrita en la literatura tiene un correlato funcional.
8. El análisis cinético de los efectos de calcio y cafeína permitió postular que estos dos agonistas tienen mecanismos de activación distintos y por lo tanto posiblemente sitios de acción diferentes en el RyR.

ABSTRACT

Calcium release from internal stores in neurons is important to determine the increase of intracellular calcium levels. Calcium release is mediated by ion channel proteins present in the endoplasmic reticulum. Two types of ion channels have been described, the ryanodine receptor (RyR) which is associated with the calcium induced calcium release compartment and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R), that is associated with the 1,4,5-trisphosphate (IP₃)-induced calcium release compartment.

The RyR are diverse. Molecular biological and immunological studies have revealed the presence of three isoforms in mammalian brain. Two forms are specific to cardiac and skeletal muscle and the third isoform is brain specific. Studies on the functional counterpart of the observed molecular heterogeneity are lacking because calcium release channels have not been characterized. Only the cardiac isoform, the major brain isoform, has been purified and incorporated into planar lipid bilayers.

Three isoforms of RyR have been described in avian muscle and, as in mammals, they are expressed in brain tissues and concentrated mainly in large neurons. The Purkinje cell from the chicken cerebellum is the only neuron from

the cerebellar cortex that expresses RyR. The Purkinje neurons also present a high abundance and heterogeneity of intracellular calcium stores, which make possible the extensive expression of IP₃R and at least two isoforms of the RyR.

In this work, the RyR from chicken cerebellum were biochemically and electrophysiologically characterized. Microsomal membranes enriched in RyR that allowed [³H]-Ry binding studies and single channel recordings in planar lipid bilayer were purified. The main results of this thesis are:

1. A fraction enriched in RyR displayed two distinct binding sites as revealed by saturation and displacement methods. The high affinity binding site showed an average K_D of 2.2 nM and the low affinity binding site showed a variable K_D larger than 100 nM.
2. The binding of [³H]-Ry for the high affinity site showed a strong calcium dependence with a K_{0,5} = 1.08 μM without inactivation by higher calcium concentration.
3. [³H]-Ry binding was caffeine insensitive up to a concentration of 10 mM.
4. Single channels recorded in planar lipid bilayers exhibited pharmacological and gating characteristics that identified them as RyR.
5. The fractional open time (P_o) of the channels was increased by caffeine between 0.5 and 5 mM. This increase was also calcium dependent.

6. Calcium dependence of the P_o of channels was heterogeneous. Channels could be classified in two populations that differed in their calcium sensitivity and calcium inactivation to calcium concentrations higher than 100 μM .
7. These findings suggests for the first time that the described molecular heterogeneity has a functional relationship.
8. Kinetic analysis of calcium and caffeine effects suggest that the two agonists have different mechanisms of activation, and eventually different sites of action in the RyR.

INTRODUCCION

Los cambios dinámicos en la concentración del Ca^{+2} libre intracelular juegan un papel crucial en numerosas funciones neuronales. Para que el Ca^{+2} intracelular actúe como señal deben existir mecanismos que mantengan la concentración de Ca^{+2} citosólico muy bajo y que sean capaces de aumentarlo más de 100 veces en respuesta a un estímulo.

En los cambios de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático participan todos los mecanismos celulares de homeostasis del Ca^{2+} en la célula. Entre ellos se encuentran los canales de calcio de la membrana plasmática activados por voltaje (Tsien et al., 1989), o por agonistas (Barnard, 1992), la bomba de calcio y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ de la membrana plasmática, proteínas quelantes del Ca^{+2} citoplasmáticas y los procesos de liberación y recaptación de Ca^{+2} desde reservorios intracelulares (Pozzan et al., 1994, revisión)

El aumento de Ca^{+2} intracelular en neuronas modula y activa fenómenos tan importantes y diversos como la diferenciación celular (Holliday et al., 1991), la expresión génica (Gallin y Greenberg, 1995, revisión) la transmisión sináptica (Thomas y Almers, 1992, revisión), o la iniciación y mantención de cambios de larga duración en la eficacia sináptica como la potenciación de larga duración

(LTP; Lynch et al., 1983) en el hipocampo y la depresión de larga duración (LTD; Ito, 1989) en el cerebelo.

La visión original del papel del calcio en neuronas consideraba que todo el Ca^{+2} necesario para estos procesos provenía del compartimento extracelular. Sin embargo, desde una década atrás la evidencia acumulada ha demostrado la presencia de compartimientos intracelulares que acumulan calcio en neuronas periféricas y centrales (Lytton y Nigam, 1992, revisión) y se ha postulado que el calcio proveniente de los compartimientos intracelulares es un modulador de la excitabilidad (Kawai y Watanabe, 1989) y de los fenómenos de LTP (Obenaus et al., 1989) y LTD (Linden y Connor, 1993), entre otros.

La movilización de Ca^{+2} desde reservorios internos es mediada por dos tipos de canales de liberación de calcio, el receptor de inositol (1,4,5)-trisfosfato (IP_3R) y el receptor de rianodina (RyR). Estos dos receptores tienen una organización molecular similar. Son homotetrámeros compuestos por subunidades de alto peso molecular (300 y 550 kDa para IP_3R y RyR, respectivamente), con un grado significativo de homología en la zona del carboxilo terminal. Es allí donde se ha postulado la ubicación de las zonas transmembranales posiblemente constituyentes del poro del canal (Henzi y McDermott, 1992, revisión).

El receptor de rianodina (RyR), llamado así por la alta afinidad con que une el alcaloide vegetal rianodina (K_D en el rango nM), es un canal de Ca^{+2} de alta conductancia cuyo principal agonista es el mismo ion. Este receptor ha sido asociado al mecanismo de liberación de Ca^{+2} inducida por Ca^{+2} (CICR), propuesto

originalmente por Endo para fibras musculares esqueléticas (Endo et al., 1970).

El tejido muscular se encuentra enriquecido en receptores de Ry lo que ha permitido que éstos hayan sido ampliamente caracterizados en este tejido (Meissner, 1994). En músculo cardíaco y esquelético el RyR cumple funciones fundamentales en el acoplamiento excitación-contracción (Nabauer et al., 1989; Ríos et al., 1991).

Por otra parte el IP₃R es un canal de calcio de menor conductancia y que se abre sólo en presencia de concentraciones milimolares de ATP e IP₃, presentando aún así probabilidades de apertura no mayores del 30 %. Este receptor ha sido caracterizado electrofisiológicamente en cerebelo de mamífero (Bezprozvanny et al., 1991).

Las neuronas de Purkinje del cerebelo son la única aferencia neuronal de la corteza cerebelar (Shepherd, 1979) y se caracterizan, entre otras propiedades, por tener uno de los sistemas de almacenamiento de Ca⁺² más desarrollados y complejos del sistema nervioso central. Por esto ellas se han usado como modelo experimental para estudiar la naturaleza bioquímica y las características de las vesículas que componen los reservorios de Ca⁺² intracelulares. Se ha demostrado que la neurona de Purkinje tiene la concentración celular más alta de IP₃R y que en ella también se expresan al menos dos isoformas del RyR (Ellisman et al., 1990; Ouyang et al., 1993).

La diversidad de sistemas responsables del aumento del Ca⁺² intracelular en las neuronas de Purkinje sugiere una heterogeneidad funcional de los canales

de liberación de Ca^{+2} . Se ha demostrado que la liberación de Ca^{+2} desde compartimientos regulados por IP_3 o cafeína es de naturaleza cuántica y que se comportan en forma independiente en algunos sistemas (Cheek et al., 1994, Yuzaki y Mikoshiba, 1992; Brorson et al., 1991). La dinámica del Ca^{+2} intracelular es críticamente afectada por la distribución espacial heterogénea de la variedad de canales presentes en la membrana plasmática y en los organelos intracelulares. Se ha propuesto el concepto de *microdominios*, en los que la concentración de Ca^{+2} puede alcanzar niveles transitorios muy elevados. (Hernández-Cruz et al., 1990; Augustine y Neher, 1992, revisión).

Pero, si sólo la localización de las fuentes de Ca^{+2} fuera importante, cabe entonces preguntarse, ¿Por qué en la célula de Purkinje existe esta variedad de canales de liberación?

Es posible postular que las propiedades diferenciales de regulación por Ca^{+2} de los canales de liberación de Ca^{+2} determinan la dinámica de los aumentos transitorios de Ca^{+2} fisiológicos durante la transducción de señales. Por consiguiente, para entender el funcionamiento de las señales de Ca^{+2} en este tipo neuronal en particular es necesario **conocer la regulación por Ca^{+2} que tienen los canales involucrados en la liberación de Ca^{+2} desde reservorios internos.**

Un aspecto totalmente desconocido de las neuronas de Purkinje son las características electrofisiológicas y bioquímicas de los canales responsables de la liberación del Ca^{+2} asociados al compartimento liberable por Ca^{+2} (RyR). Aunque este canal-receptor ha sido estudiado en detalle en tejidos musculares,

no se conocen sus propiedades en el sistema nervioso central. En los pocos trabajos existentes sobre el tema los receptores se han purificado a partir del cerebro completo y se han caracterizado los canales con la técnica de bicapas planas (McPherson et al., 1991; Lai et al., 1992). La inestabilidad de los canales purificados ha impedido conocer en detalle su farmacología y características electrofisiológicas.

Un tejido apropiado para explorar la regulación de los RyR es el cerebelo de pollo, el cual presenta muy abundantes y diversos almacenes intracelulares de Ca^{+2} , y en el que se ha detectado por anticuerpos la presencia de dos isoformas de RyR. **La hipótesis de esta tesis es que la heterogeneidad molecular de los RyR tiene como expresión funcional las diferentes propiedades de activación por calcio de estos canales.**

En esta tesis se caracterizó bioquímica y electrofisiológicamente el sistema de liberación intracelular de Ca^{+2} asociado al RyR. Se usaron preparaciones nativas de membranas enriquecidas en RyR de cerebelo de pollo, lo cual permitió estudiar la heterogeneidad funcional de estos receptores.

ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

1. Los sistemas de control del calcio intracelular en el cerebelo:

El cerebelo es una estructura del encéfalo derivada del tronco cerebral que está presente en todos los vertebrados. Estudios en animales con ablaciones cerebelares y en pacientes con patologías cerebelares o daño traumático, indican que el cerebelo está involucrado en al menos tres funciones generales: a) mantención de la postura y el equilibrio, b) mantención de la tonicidad muscular, c) coordinación de movimientos voluntarios y d) aprendizaje motor. Estas funciones requieren de la coordinación de una gran cantidad de mensajes sensoriales. Por lo tanto el cerebelo es un órgano de coordinación sensori-motor.

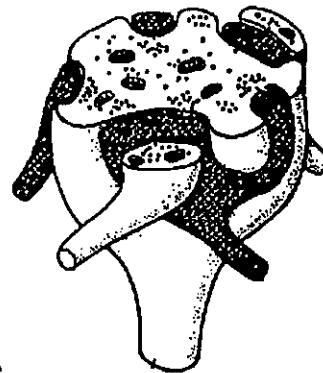
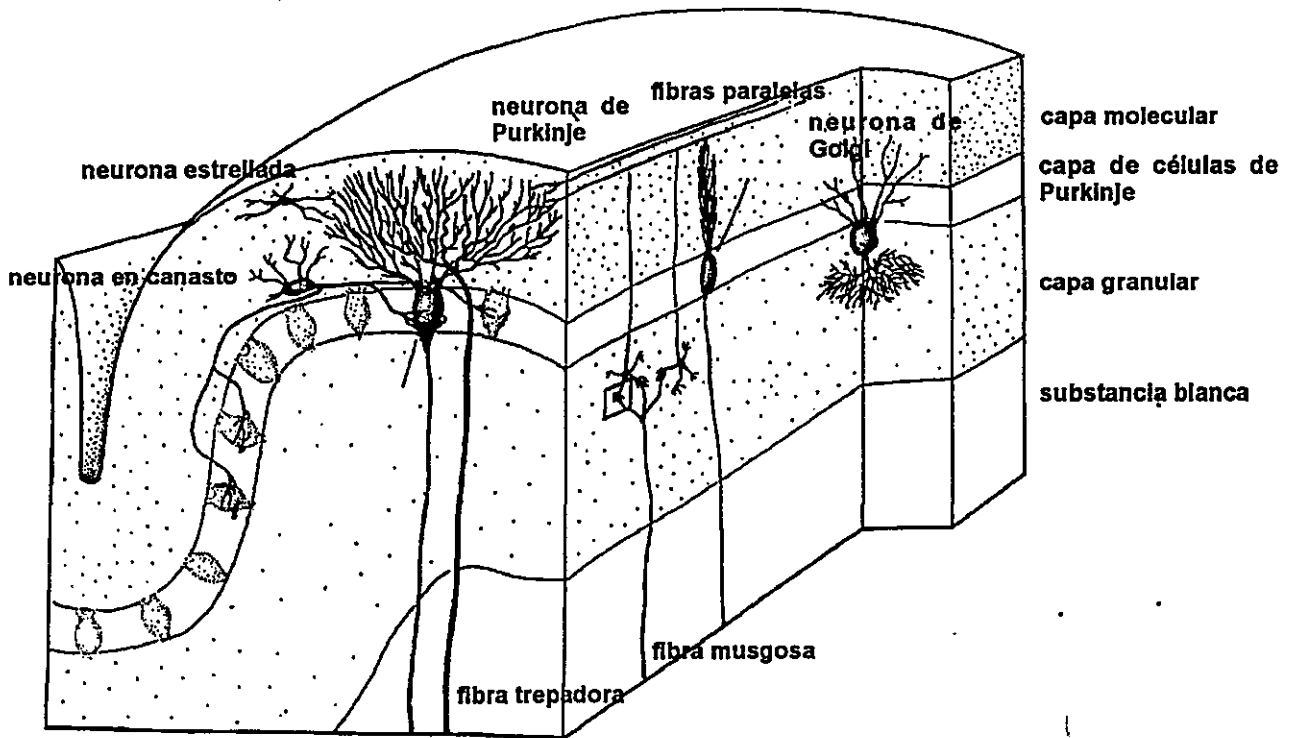
En el cerebelo las neuronas de Purkinje son la única salida de información por lo que es razonable sostener que es en esta célula donde se produce la coordinación mencionada (Shepherd, 1979).

1.1. Características generales de las neuronas de Purkinje

Las neuronas de Purkinje son inhibitorias y, como ya se dijo, son la única salida de la corteza cerebelar. Por otro lado, las entradas a la corteza cerebelar son dos, las fibras trepadoras y las fibras musgosas. Las fibras trepadoras hacen sinapsis directamente sobre la neurona de Purkinje, las fibras musgosas en cambio, hacen sinapsis en las dendritas de las células granulares.

La neurona de Purkinje recibe dos aferencias excitatorias que están organizadas de una manera muy diferente. Los axones de las células granulares forman las fibras paralelas, las cuales hacen sinapsis con las partes más distales del árbol dendrítico de la neurona de Purkinje. A su vez, cada fibra paralela hace sinapsis con varias neuronas de Purkinje y cada neurona de Purkinje recibe sinapsis de muchas fibras paralelas (alrededor de 150.000 sinapsis). Por otro lado, cada neurona de Purkinje recibe de una única fibra trepadora un poderoso estímulo en el soma y en el árbol dendrítico proximal. Estas fibras son axones de neuronas de la oliva inferior (**Figura 1**; Ghez, 1991).

Las sinapsis de las fibras paralelas usan glutamato como neurotransmisor y contienen receptores ionotrópicos de tipo AMPA y metabotrópicos de tipo mGluR1 ligados a la producción de IP_3 . El neurotransmisor de las fibras trepadoras es excitatorio pero aún no ha sido



axón de neurona de Golgi

dendrita de neurona granular

fibra musgosa

Figura 1: Esquema de las conexiones neuronales y organización general del cerebelo. (Adaptado de Ghez, 1991).

determinado. En tejidos adultos, ambas sinapsis carecen de receptores de tipo NMDA (Linden y Connor, 1993, revisión).

Además de las aferencias directas existen tres tipos de interneuronas, todas ellas inhibitorias. Las células en canasto y las células estrelladas se ubican en la capa granular de la corteza cerebelar y reciben sinapsis de las fibras paralelas. Ellas envían sinapsis inhibitorias a las dendritas de las neuronas de Purkinje cercanas (células estrelladas) y a los cuerpos celulares de neuronas de Purkinje lejanas (células en canasto). Las células de Golgi reciben sinapsis de las fibras paralelas y también conexiones directas de las fibras musgosas y envían terminales a las dendritas de las células granulares inhibiendo así el traspaso de información desde las fibras musgosas.

Las neuronas de Purkinje presentan una actividad eléctrica muy característica con diferencias importantes en las conductancias activadas por despolarización en el soma o en las dendritas. En el soma los potenciales de acción son la consecuencia de la activación de canales de sodio sensibles a TTX, con un componente de calcio y en las dendritas por canales de calcio dependientes de potencial con un pequeño componente sensible a TTX (Llinás y Sugimori, 1980 a y b).

La estimulación de las fibras paralelas induce en el soma de la neurona de Purkinje un tren de potenciales de acción. En cambio la estimulación de las fibras musgosas, y por lo tanto de las fibras paralelas, evoca un único potencial

de acción en las células de Purkinje. Además de esta actividad inducida, los registros somáticos de neurona de Purkinje en rebanadas de cerebelo muestran una actividad eléctrica rítmica espontánea que consiste en largos períodos de actividad seguidos por períodos de reposo. Esta actividad eléctrica se caracteriza por fluctuaciones periódicas en el potencial de membrana. La repolarización es debida a una corriente de potasio activada por calcio (Llinás y Sugimori, 1980 a y b).

La neurona de Purkinje ha sido usada ampliamente como modelo experimental para estudiar la naturaleza bioquímica y membranosa de los reservorios de calcio intracelulares. Los estudios llevados a cabo a partir del año 1988 demuestran que el compartimento microsomal de estas neuronas (vacuolas, túbulos y cisternas del retículo endoplásmico liso) es molecular y funcionalmente heterogéneo (Meldolesi et al., 1992; Villa et al., 1991; Nori et al., 1993; Takei et al., 1992).

Las neuronas de Purkinje poseen receptores de glutamato del tipo metabotrópico acoplados a la activación de fosfolipasa C y a la generación del segundo mensajero IP_3 (Blackstone et al., 1989). Su estimulación produce la liberación de calcio intracelular (Llano et al., 1991) por estimulación de IP_3R presentes en el retículo endoplasmático. El IP_3R ha sido purificado y clonado a partir de cerebelo (Maeda et al., 1990; Furuichi et al., 1989). Además del reservorio sensible a IP_3 , existen evidencias funcionales (Yuzaki y Mikoshiba,

1992; Llano et al., 1994), farmacológicas e inmunológicas que demuestran la presencia de reservorios sensibles a cafeína y Ry (Volpe et al., 1991; Nori et al., 1993, Brorson et al., 1991).

El modelo experimental que más ha sido estudiado desde el punto de vista bioquímico es el de cerebelo de pollo (Volpe et al., 1993, revisión). Estudios con anticuerpos monoclonales específicos para RyR demuestran que el cerebelo de pollo contiene al menos dos isoformas del receptor de diferente peso molecular (Ellisman et al., 1990). La inmunoreactividad aparece casi enteramente restringida a la neurona de Purkinje, distribuyéndose en el pericario y extendiéndose por el árbol dendrítico y axonal, no siendo visible ninguna marca en las espinas dendríticas (Ellisman et al., 1990). Esto difiere con lo encontrado en mamíferos (Nakanishi et al., 1992; Kuwajima et al., 1992) donde el RyR se acumula principalmente en el soma de la neurona de Purkinje y es evidente también en las células de la capa granular del cerebelo

Los microsomas de cerebelo de pollo están enriquecidos en IP_3R (Sato et al., 1990) y RyR (Volpe et al., 1991). Son abundantes también las proteínas que permiten la captación de calcio (CaATPasas, Kaprielian, 1989) y el quelamiento del calcio, este es el único tejido donde se ha descrito una proteína idéntica a la calsecuestrina de músculo esquelético (Volpe et al., 1990 y 1991). El subfraccionamiento en gradiente continuo de sacarosa demuestra que es posible separar en una pequeña zona las vesículas que contienen IP_3R

de las que contienen RyR, siendo estas últimas más pesadas y con un alto contenido de calsecuestrina (Volpe et al., 1991).

Volpe et al. (1993) han descrito la complejidad de las estructuras de los compartimientos intracelulares de calcio de las neuronas de Purkinje distinguiendo a) Vesículas o sacos terminales de retículo con alto contenido de calsecuestrina y que poseen RyR, IP₃R y Ca/ATPasas. b) Apilamientos de cisternas de membranas con contenido medio de calsecuestrina con alta densidad de IP₃R (Rusakov et al., 1993) y sin RyR. c) Zonas de retículo endoplasmático liso con bajo contenido de calsecuestrina, que contendrían RyR, IP₃R en baja densidad y Ca/ATPasas. d) Algunas vesículas sin calsecuestrina con baja densidad de uno o ambos receptores (Volpe et al., 1993).

1.2. Compartimientos de calcio en el soma

Los estudios morfológicos apoyan la idea que los compartimientos de calcio intracelular activados por calcio y por IP₃ son independientes. Los estudios inmunocitoquímicos han demostrado que en la neurona de Purkinje existen vesículas con un solo tipo de canal de liberación que además presentan distinta densidad de calsecuestrina y CaATPasas (Villa et al, 1991; Walton et al, 1991; Takei et al., 1992). El compartimento llamado de "cisternal stacks" (CS, apilamientos de membrana) tiene una alta concentración de IP₃R

que es lo que explicaría la asociación de las membranas por interacción de los IP_3R entre sí. Se ha postulado, por la relativamente baja concentración de calsecuestrina y CaATPasa en estas estructuras, que estos sistemas de membrana no serían reservorios de calcio funcionales y que podrían estar actuando como sistemas de almacenamiento de IP_3R o como sistemas de tamponamiento de las elevaciones transitorias de IP_3 en el soma (Villa et al., 1991, 1992; Takei et al., 1992)

2. El receptor de rianodina

El alcaloide vegetal rianodina (Ry), un insecticida natural, fue aislado originalmente del tronco y raíz del arbusto *Ryania speciosa* (Rogers et al., 1948). Estudios de los efectos de Ry revelaron que produce contracturas en músculo estriado de invertebrados y vertebrados (Jenden y Fairhurst, 1969). Se observó que los efectos de Ry en músculo esquelético de vertebrados involucraban la modificación de la permeabilidad al calcio del retículo sarcoplasmático (RS) (Fairhurst y Hasselbach, 1970, Fairhurst 1973). Efectos similares se demostraron en músculo cardíaco (Hillyard y Procita, 1959; Sutko et al., 1979; Hilgeman et al., 1983.). Estudios posteriores determinaron que Ry era un efector específico del canal de liberación de calcio que podía, dependiendo de la concentración y el tiempo incrementar o disminuir la permeabilidad al calcio del RS (Fleischer et al. 1985; Meissner, 1986; Lattanzio

et al., 1987). Franzini-Armstrong (1970, 1975) demostró que la Ry era un ligando específico para la proteína del pié de la tríada ahora comúnmente referida como receptor de rianodina. Posteriormente se encontró que los sitios de unión pertenecían al canal de liberación de calcio de retículo sarcoplasmático de músculo estriado (Pessah et al., 1985 y 1986; Inui et al., 1987, Imagawa et al., 1987; Lai et al., 1988).

Por ello la Ry ha sido usada como una herramienta para purificar y estudiar las propiedades del canal de liberación de calcio en músculo (Pessah et al., 1986; Inui et al., 1987a; Lai et al., 1988; Inui et al., 1987b; Anderson et al., 1989), y en cerebro de mamífero (McPherson y Campbell, 1990).

En canales únicos reconstituidos en bicapas planas, este alcaloide tiene efectos electrofisiológicos característicos. El más importante es la modificación del canal a un estado de menor conductancia (40 a 50 % de la conductancia principal) y de alto tiempo fraccional abierto (P_o) (Rousseau, 1987). Este efecto no es el único atribuible a la rianodina aunque si es el más característico. A bajas concentraciones (10-40 nM), Ry aumenta el P_o del canal (Bull et al., 1989) y a concentraciones mayores y hasta 10 μ M produce la aparición del estado de subconductancia después de demoras variables que disminuyen con el aumento de la concentración de Ry. A concentraciones de 70 μ M o mayores, Ry disminuye el P_o del canal llevándolo a estados cerrados prolongados con

aparición de subestados de aún menor conductancia (Buck et al., 1992; Lai et al., 1989).

2.1. Tipos de RyR: clasificación y localización.

Los estudios de biología molecular han revelado al menos tres isoformas de RyR. Dos de ellas de tipo muscular, esquelético (S) (Takeshima et al., 1989) y cardíaco (H) (Nakai et al., 1990, Otsu et al., 1990), y uno de tipo cerebral (B) (Hakamata et al., 1992). Los nombres de las isoformas se refieren a la relativa predominancia en el tejido (S y H) o al origen del clonamiento (B). Los genes respectivos han sido clonados (Takeshima et al., 1989, Zorzato et al., 1990, Nakai et al., 1990, Hakamata et al., 1992; Otsu et al., 1990) e identificados como **ryr1** (S) **ryr2** (H) y **ryr3** (B). Entre ellos comparten homologías de un 66% (S/H), 67% (S/B) y 70 % (H/B) (Ogawa, 1994).

En músculo esquelético de vertebrados no mamíferos se han definido dos tipos de RyR (α y β) de acuerdo a su movilidad electroforética y a su reacción con anticuerpos específicos (Olivares et al., 1991), y han sido identificados en pollo (Ellisman et al., 1990, Ouyang et al., 1993; Walton et al., 1991; Airey et al., 1990), peces (Zupanc et al., 1992) y rana (Murayama y Ogawa, 1992.). El músculo cardíaco de pollo posee una tercera isoforma (Airey et al., 1993). Sólo las isoformas de rana (α y β) han sido recientemente clonadas y comparten un 66% de homología entre ellas y un 80 % (α /S), 68 %

(α/H y α/B); 67 % (β/S), 70 % (β/H) y 86 % (β/B) con los genes de mamífero (Oyamada et al., 1994). Estos resultados relacionan la isoforma α con el gen **ryr1** y la isoforma β con el gen **ryr3**.

Criterios inmunológicos y de movilidad electroforética indican que las subunidades β de las distintas especies no mamíferas son muy conservadas entre sí pero que no están inmunológicamente relacionadas con la isoforma S ni H de mamíferos (Ogawa, 1994). Por el contrario las subunidades α son bastante variables entre especies y presentan movilidades electroforéticas e inmunoreactividades diversas.

Desde que en 1989 Ashley describió el ligamen de [3H]-Ry en membranas de cerebro de rata, se produjo un gran interés por obtener la distribución y caracterización de estos receptores en cerebro de mamíferos y no mamíferos. Estudios de autoradiografía y ligamen demostraron que el RyR se distribuía heterogéneamente en el cerebro de mamífero, concentrándose en el hipocampo, algunos núcleos de la corteza y en la capa granular del cerebelo (Padua et al., 1991; 1992; Sharp et al., 1993). La purificación de RyR de cerebro total de conejo demostró que la principal isoforma era la cardíaca (Lai et al., 1992; McPherson y Campbell, 1993)

Análisis con técnicas de biología molecular, como hibridación *in situ* de RNA, han permitido localizar las distintas isoformas de mamífero en el cerebro de la rata (Furuichi et al., 1994). En estos estudios se demostró que el **ryr2** se

expresaba en casi todo el cerebro, concentrándose en corteza, hipocampo y cerebelo, mientras que el **ryr3** se expresaba en el área CA1 del hipocampo, algunos núcleos del tálamo y ganglios basales. El gen **ryr1**, en cambio se expresaba casi exclusivamente en las neuronas del área CA1 del hipocampo y las neuronas de Purkinje del cerebelo. Es decir que en las neuronas de Purkinje de cerebelo de mamífero se expresan las isoformas **ryr2** y **ryr1** (Kuwajima et al., 1992)

Las tres isoformas de músculo han sido encontradas también en el cerebro de pollo. La más abundante es la isoforma α que se distribuye a través de todo el cerebro de ave, especialmente en las neuronas de mayor tamaño. La isoforma β /cardíaca (los anticuerpos utilizados no discriminan entre estas dos isoformas) se concentra en las neuronas de Purkinje de cerebelo. En estas neuronas coexisten RyR de tipo α y β /cardíaco (Ellisman et al., 1990; Walton et al., 1991; Airey et al., 1993; Ouyang et al., 1993).

Una particularidad del cerebelo de pollo respecto al de mamífero es su mayor concentración de RyR. El cerebelo de mamífero contiene una menor unión específica que el cerebro total (Kawai et al., 1991) y esta relación se invierte en pollo y peces (Zupanc et al., 1992; Ouyang et al., 1993). Adicionalmente, en el cerebelo de pollo, los RyR se encuentran exclusivamente en las neuronas de Purkinje (Ellisman et al., 1990), a diferencia del cerebelo de rata en que los RyR están también en las neuronas granulares del cerebelo

(Furuichi et al., 1994). Estas características hacen del cerebelo de pollo una fuente de RyR más rica y más homogénea que el cerebelo de mamífero.

2.2. Características de la unión de [³H]-Ry

La [³H]-Ry se une a su receptor con una cinética lenta demorando entre 25 a 180 minutos para llegar al equilibrio dependiendo de la temperatura y la fuerza iónica utilizada (Siefert y Casida, 1986; McGrew et al., 1989; Zimanyi y Pessah, 1991; Pessah et al., 1986; Alderson y Feher, 1987). El ligamen es óptimo entre pH 6,8 y 7,5 (Michalak et al., 1988; Zimanyi y Pessah, 1991a) y es favorecido por la temperatura (Buck et al., 1992; Ogawa y Harafuji, 1990a) y por el aumento de la fuerza iónica (Michalak et al., 1988; Ogawa y Harafuji, 1990b; Seifert y Casida, 1986; Chu et al., 1990; Coronado et al., 1994, revisión).

Estudios comparativos en mamífero indican que el músculo cardíaco posee un 25% de los sitios de músculo esquelético por gramo de tejido, y 3 veces más que el cerebro. Es decir el cerebro tiene aproximadamente sólo un 10 % de los sitios de músculo esquelético por gramo de tejido (Damiani et al., 1991).

2.2.1. Efecto del calcio sobre la unión de [³H]-Ry.

La unión de [³H]-Ry es altamente dependiente de calcio. En el RyR de músculo se pueden distinguir dos tipos de dependencia de calcio de la unión según el origen del tejido (Michalak et al., 1988; Zimanyi y Pessah, 1991a). El RyR de músculo cardíaco presenta una dependencia de calcio de tipo hiperbólico que se satura a concentraciones altas de calcio. En cambio el RyR de músculo esquelético presenta una dependencia de tipo campana, es decir presenta una inhibición de la unión a concentraciones de calcio mayores que 10 μ M.

Las isoformas de músculo esquelético (α y β) purificadas de anfibio exhiben distintas dependencias de calcio. En presencia de ATP, cafeína y alta fuerza iónica, la isoforma β es más sensible al calcio que la isoforma α ($K_{0.5}$ 80 nM versus 1,6 μ M respectivamente; Murayama y Ogawa, 1992).

Las isoformas α y β de peces también muestran diferencias. La isoforma α presenta inhibición por calcio como la isoforma esquelética mientras que la β no lo hace (O'Brien et al., 1995).

2.2.2. Otros activadores de la unión.

Además de calcio, otros agonistas como ATP y cafeína son capaces de aumentar la unión de [³H]-Ry presentando a su vez dependencia al calcio. En preparaciones de músculo esquelético o cardíaco, ATP y cafeína aumentan la

unión a todas las concentraciones de calcio aún en presencia de alta fuerza iónica (Pessah et al., 1987; Ogawa, 1994).

Compuestos como cafeína, ATP y calcio son capaces de aumentar el P_o del canal en experimentos de bicapas o aumentar los flujos de calcio activados por calcio en vesículas. Estos compuestos también son capaces de aumentar el ligamen de [^3H]-Ry de receptores musculares. Estas evidencias han llevado a proponer que la unión de [^3H]-Ry al receptor es una sonda que describe el estado de activación del canal (Pessah et al., 1986, Holmberg y Williams, 1990, Chu et al., 1990). Esto es apoyado por la observación que compuestos que disminuyen P_o , como rojo de rutenio y magnesio también disminuyen el ligamen de [^3H]-Ry.

2.2.3. Sitios de alta y de baja afinidad en el receptor de Ry.

En los primeros estudios de unión de [^3H]-Ry en músculo cardíaco y esquelético (Holmberg y Williams, 1990; Michalak et al., 1988) se encontró un solo sitio de unión de alta afinidad. Más recientemente Pessah y Zimanyi (1991) demostraron que Ry se une en forma consecutiva a cuatro sitios (uno en cada subunidad) de afinidades decrecientes de 4,5; 53; 555; y 2800 nM para la isoforma S y de 1,5; 36; 681 y 4320 nM para la isoforma H. Estos sitios tendrían una cooperatividad negativa y llevarían a una inactivación total del canal con asociación irreversible de Ry a los sitios de unión al llenarse todos ellos.

Callaway et al. (1994), basándose en experimentos de proteólisis controlada con tripsina, propone que los sitios de alta y baja afinidad se ubican cerca de los fragmentos de transmembrana y del carboxilo terminal de la proteína. Sus resultados apoyan la hipótesis que estos sitios están normalmente ocultos y lejos de la superficie hidrofílica de la proteína.

La presencia de sitios de baja afinidad (Lai et al., 1989; Wang et al., 1993) y el acoplamiento alostérico entre ellos (McGrew et al., 1989; Wang et al., 1993) ha sido correlacionado con los efectos de Ry a nivel de canal único, asociándose el sitio de alta afinidad con la modificación al estado de subconductancia y el sitio de baja afinidad al cierre completo del canal (Lai et al., 1989, McGrew et al., 1989).]

3. Características de los canales asociados a receptores de Ry.

El RyR es un canal que ha sido ampliamente estudiado en músculo estriado. Las isoformas presentes en mamíferos y no mamíferos son canales relativamente selectivos para calcio que tienen una alta conductancia (100-150 pS, 50 mM Ca^{2+} intraluminal o trans). En ausencia de calcio estos canales son permeables a iones monovalentes presentando una conductancia mayor aún. (700-800 pS en KCl 250 mM simétrico) (Meissner, 1994, revisión).

El RyR purificado tiene una alta conductancia para calcio y cationes monovalentes y una alta selectividad por cationes sobre aniones. Las

conductancias iónicas presentan curvas de saturación simples con conductancias máximas de 172 pS para calcio y 1032 pS para K^+ para el RyR de músculo esquelético (Smith et al., 1988). En condiciones biiónicas el canal muestra selectividad por calcio con cuocientes de permeabilidades (P_{Ca}/P_K) de 6 (Smith et al., 1988)

Entre las características farmacológicas generales de los RyR se encuentran el ser activados por calcio (μM), ATP (mM) y cafeína (mM) y ser inhibidos por magnesio (mM), rojo de rutenio (μM) y dantroleno (mM) (Anderson et al., 1989; Ashley y Williams, 1990; Fill et al., 1990, Lai et al., 1988; Liu et al., 1989; Rousseau y Meissner, 1989).

3.1. Efecto de calcio sobre la fracción de tiempo abierto que se encuentran los canales RyR

El P_o de las isoformas de RyR de mamíferos presenta distintas dependencias del calcio. En presencia de cesio como ion permeante, la isoforma cardíaca tiene una dependencia de tipo hiperbólica saturando a concentraciones de calcio mayores de 10 μM y muy parecida a la dependencia de calcio de la unión de [3H]-Ry (Chu et al., 1993; Gyorke y Fill, 1993). En cambio la isoforma esquelética presenta una inactivación por calcio a concentraciones mayores de 10 μM (Fill et al., 1990; Fill et al., 1991, Chu et al., 1993). En membranas de cerebelo de rata se ha reportado una dependencia de

calcio en forma de campana con inactivación a concentraciones de calcio mayores que 100 μM (Bezprozvanny et al., 1991). Ya que en cerebelo de rata existen al menos dos isoformas (ryr1 y ryr2) no es posible atribuir esta dependencia a alguna de las dos isoformas.

En vertebrados no mamíferos, las evidencias indican que las isoformas α y β de músculo esquelético presentan una dependencia de calcio distinta. En anfibios (usando Ca^{+2} o Ba^{+2} como portador de la corriente; Bull y Marengo, 1993) y peces (usando cesio como ion portador; O'Brien et al., 1995) se observa una población de canales que presenta una dependencia de calcio con una constante de activación menor que la otra población, con probabilidades de apertura sobre 60 u 80 % y que no muestra inactivación a concentraciones de calcio milimolares. Además ambas especies contienen otra población de canales con menores probabilidades de apertura (máximos de 30%) e inactivación en calcio milimolar. En el caso de las isoformas de peces, la diferencia en la dependencia al calcio está asociada además a una diferencia en las conductancias. La isoforma más sensible al calcio (isoforma β) tiene una conductancia (en cesio simétrico 250 mM) de 380 pS, mientras que la de menor sensibilidad tiene una conductancia de 520 pS (isoforma α , O'Brien et al., 1995).

En estudios con músculo de pollo las isoformas se separaron por inmunopurificación (Percival et al., 1994). La isoforma α mostró dos modos de

activación (alto P_o (α_H) y bajo P_o (α_L)) que se intercambiaron espontáneamente con constantes de tiempo de minutos. En el modo α_L el canal se mostró prácticamente insensible al calcio con P_o máximas de menos del 20 %. En el modo α_H apareció una dependencia al calcio con P_o máximas del 80%, y curva de tipo campana con inactivación por calcio a concentraciones mayores de 100 μ M. En cambio, la isoforma β presentó P_o máximas del 80% e inactivación a concentraciones mayores que 300 μ M. La isoforma β presenta cinética más lenta que la isoforma α , la que es muy rápida y ruidosa (Percival et al., 1994)

4. Cinética de los canales asociados al receptor de Ry.

Una característica importante en los canales de liberación de calcio sensibles a rianodina es que en estado estacionario, ellos presentan marcados cambios espontáneos en P_o que han sido llamados **cambios de marcha** o de **modos** de activación. La alternancia entre modos de alto y de bajo P_o dentro de estallidos o "bursts" de actividad ha sido observada en canales activados por acetilcolina (Patlak et al., 1979; Auerbach y Lingle, 1986; Naranjo y Brehm, 1993), en canales de potasio activados por calcio (Moczydlowski y Latorre, 1983; MacManus y Magleby, 1988) y en canales activados por voltaje. (Hess et al., 1984)

Recientemente dos artículos han sido dedicados al estudio de estos cambios de marcha en canales de liberación de calcio sensibles a Ry de

músculo esquelético y neuronales (Armisen et al., 1996, en prensa) y de músculo cardíaco (Zahradníková y Zahradník, 1995). Ambos artículos coinciden en demostrar el comportamiento modal de los RyR, independiente del origen de ellos. Armisen et al. han sugerido que el gating modal es una característica intrínseca y bien conservada que puede tener implicaciones funcionales.

Estudios de activación ultrarrápida de canales de liberación por fotólisis de calcio enjaulado demostraron que estos canales eran capaces de activarse ante aumentos calibrados ultrarrápidos de calcio en un milisegundo (Gyorke y Fill, 1993). Los registros muestran que el canal es llevado en un milisegundo a un modo de alto P_o que es mayor que la que se alcanza en estado estacionario con concentraciones equivalentes de calcio. El P_o equivalente al estado estacionario se logra después de un período de "adaptación " que tiene una constante de tiempo de 1 segundo para el caso de RyR cardíaco (Gyorke y Fill, 1993) y de 3 segundos en el caso de RyR de músculo esquelético (Gyorke et al., 1994). El mecanismo de adaptación sugerido para los RyR de músculo de mamífero permite especular que estos receptores serían capaces de responder con un aumento de P_o aún en presencia de concentraciones de calcio mayores que las de reposo. La naturaleza modal de la cinética en estado estacionario que es compartida por los receptores musculares y de cerebelo de ave, permite

suponer que estos últimos también podrían mostrar el fenómeno de adaptación descrito para los receptores de músculo de mamífero.

5. Función de los receptores de Ry neuronales

El retículo endoplasmático y sus especializaciones están presentes en casi todos los compartimientos neuronales incluyendo el soma, las dendritas y los terminales sinápticos. Es importante considerar que estos organelos almacenadores de calcio no sólo inician señales de calcio (es decir son fuentes de calcio) sino también actúan como un sistema de atrapamiento de calcio (es decir como sumidero). En neuronas simpáticas la entrada de calcio por canales dependientes de voltaje de la membrana celular puede actuar como sumidero o fuente para la respuesta citosólica dependiendo del grado de llenado del retículo. En células PC12, el ATP produce **liberación de calcio inducida por calcio** (CICR) presumiblemente como consecuencia indirecta de la activación de receptores purinérgicos, mientras que la despolarización por potasio no produce CICR pero puede activar la entrada de calcio al retículo edoplasmático permitiendo el relleno de los almacenes (Barry y Cheek, 1994).

Se ha postulado que la CICR cumple un papel en la integración sináptica. Por ejemplo una despolarización de duración semejante a un potencial de acción (<10 ms) no produce activación de CICR en células de ganglios simpáticos, pero despolarizaciones más prolongadas (>100 ms) dan

lugar a una liberación de calcio significativa (Kuba et al, 1992). De manera semejante se ha observado que en neuronas de Purkinje pulsos despolarizantes de larga duración producen una CICR más prominente que la que producen pulsos cortos (Llano et al, 1994).

Los avances recientes en los métodos de tratamiento de imágenes de calcio han revelado importantes aspectos espaciales y temporales de las señales de calcio intracelulares y de sus funciones (Johnston, 1996). Muchos tipos celulares responden a los activadores biológicos con aumentos propagados de la concentración de calcio intracelular (ondas de calcio) o con oscilaciones de calcio causados por la liberación de calcio desde el retículo endoplasmático (Amundson y Clapham, 1993). Este tipo de señales no sólo son importantes por la posible variedad de respuestas que se pueden obtener, sino también porque permiten que la señal de calcio viaje y llegue a zonas de la neurona alejadas de la membrana plasmática.

Se sabe que la señal de calcio debe ser propagada hasta el núcleo donde gatilla profundos cambios en la expresión génica que son críticos para la función neuronal (Ghosh y Greenberg, 1995). Por ejemplo, en el caso de los fenómenos de plasticidad sináptica como LTP y LTD, aunque la inducción de estos requiere de modificación de proteínas existentes, la mantención a largo plazo de ellos requiere de la síntesis de proteínas y de transcripción, y por lo tanto, de la activación de genes (Nguyen et al., 1994).

Uno de los sistemas generadores de ondas y oscilaciones más estudiado es el asociado al IP_3R en ovocitos de *Xenopus*, donde se han definido las características básicas para un sistema generador de ondas de calcio (Miyazaki, 1995, revisión). El elemento fundamental es un proceso de liberación de calcio que sea regenerativo, es decir aquel donde el calcio liberado sea capaz de inducir a su vez la liberación de calcio. En segundo lugar se requiere que la liberación de calcio se inhiba a si misma impidiendo la depleción de los compartimientos y permitiendo la repetición de las ondas o la mantención de las oscilaciones por tiempos prolongados ante estímulos mantenidos. El receptor de IP_3 cumple estos requerimientos. En particular estos canales de liberación presentan activación e inhibición por calcio dando lugar a una curva de activación por calcio en forma de campana (Bezprozvanny et al, 1991).

No existen modelos estudiados ni datos de formación de ondas debidas a RyR. Los RyR de músculo poseen características que cumplirían los requerimientos para generar ondas de calcio. En miocardiocitos se ha reportado la formación de ondas en condiciones especiales de llenado del RS (Weir y Blatter, 1991). En neuronas de ganglio simpático también se ha reportado la generación de ondas inducidas por cafeína, involucrando por lo tanto un mecanismo asociado al RyR (Friel y Tsien, 1992). Es indispensable

entonces conocer la dependencia de calcio de los receptores de cerebelo para involucrarlos en la posible generación de ondas en las neuronas de Purkinje.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la regulación de los canales de liberación de almacenes intracelulares asociados al RyR de cerebelo de pollo.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Desarrollar una preparación de membranas enriquecida en receptores de rianodina que permita estudios bioquímicos y que sea adecuada para el registro de canales únicos en bicapas.
2. Caracterizar la unión de [³H]-Ry a su receptor y su sensibilidad a los agonistas calcio y cafeína.
- 3.- Caracterizar los canales de liberación de calcio sensibles a rianodina presentes en esta preparación por estudios de canal único con técnicas de bicapas planas determinando las propiedades de activación por Ca⁺² y cafeína.

METODOS

1. - Preparación de membranas de retículo endoplásmico de cerebelo de pollo

Las cabezas de pollos utilizadas para esta preparación se obtuvieron de la empresa faenadora de pollos "Agrícola ARIZTIA S.A.". Los pollos, machos de 45 a 50 días de edad, fueron sacrificados según los procedimientos estándares aprobados internacionalmente que implican pérdida de conciencia por golpe eléctrico y muerte por desangramiento por corte en el cuello. Las cabezas de pollos que se obtuvieron después del golpe eléctrico y antes del desangramiento se colocaron en hielo para su traslado y posterior utilización dentro de un plazo de 20 a 30 minutos. Durante el proceso de extracción, 20 a 80 cerebelos fueron mantenidos a 4°C en la solución A (5 mM HEPES-KOH pH 7,4, 0.32 M sacarosa, DTT 1 mM, PMSF 1 mM (inhibidor de proteasas de serina), leupeptina (inhibidor de proteasas de serina y cisteína) 1 µg/ml y 10 µg/ml de inhibidor de tripsina) (Ashley, 1989, con modificaciones). Los cerebelos fueron cortados en pedazos pequeños con tijeras, pesados,

suspendidos en 10 volúmenes de solución A y homogenizados en un homogenizador vidrio-teflón. La suspensión resultante se centrifugó a 1000 x g por 10 minutos. El sobrenadante se guardó y el sedimento (P1) se rehomogenizó en la mitad del volumen original y se centrifugó a 1000 x g por 10 minutos. Los sobrenadantes así obtenidos se juntaron y centrifugaron a 17.000 x g por una hora. El nuevo sedimento (P2) se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 100.000 x g por una hora. El sedimento de esta última centrifugación (P3) se resuspendió en un volumen reducido de solución A (de 2 a 10 ml dependiendo de la cantidad de proteína) y se colocó sobre una gradiente discontinua de sacarosa de 3 escalones (40%, 32% y 20% p/p) disuelta en solución A. La gradiente, que fue sometida a centrifugación a 100.000 x g hasta equilibrio (12 a 14 horas), separó cuatro fracciones ubicadas en cada transición de densidades más un sedimento (a las que se denominó P3-1, P3-2, P3-3 y P3-4, respectivamente, **(Figura 2)**). Las fracciones se colectaron y se centrifugaron a 100.000 x g por una hora. Finalmente cada fracción se resuspendió en solución A a una concentración final de 5 a 10 mg de proteínas/ml. La preparación se separó en alícuotas que se congelaron en nitrógeno líquido para su almacenamiento a -80 °C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinónico (Smith et al., 1985).

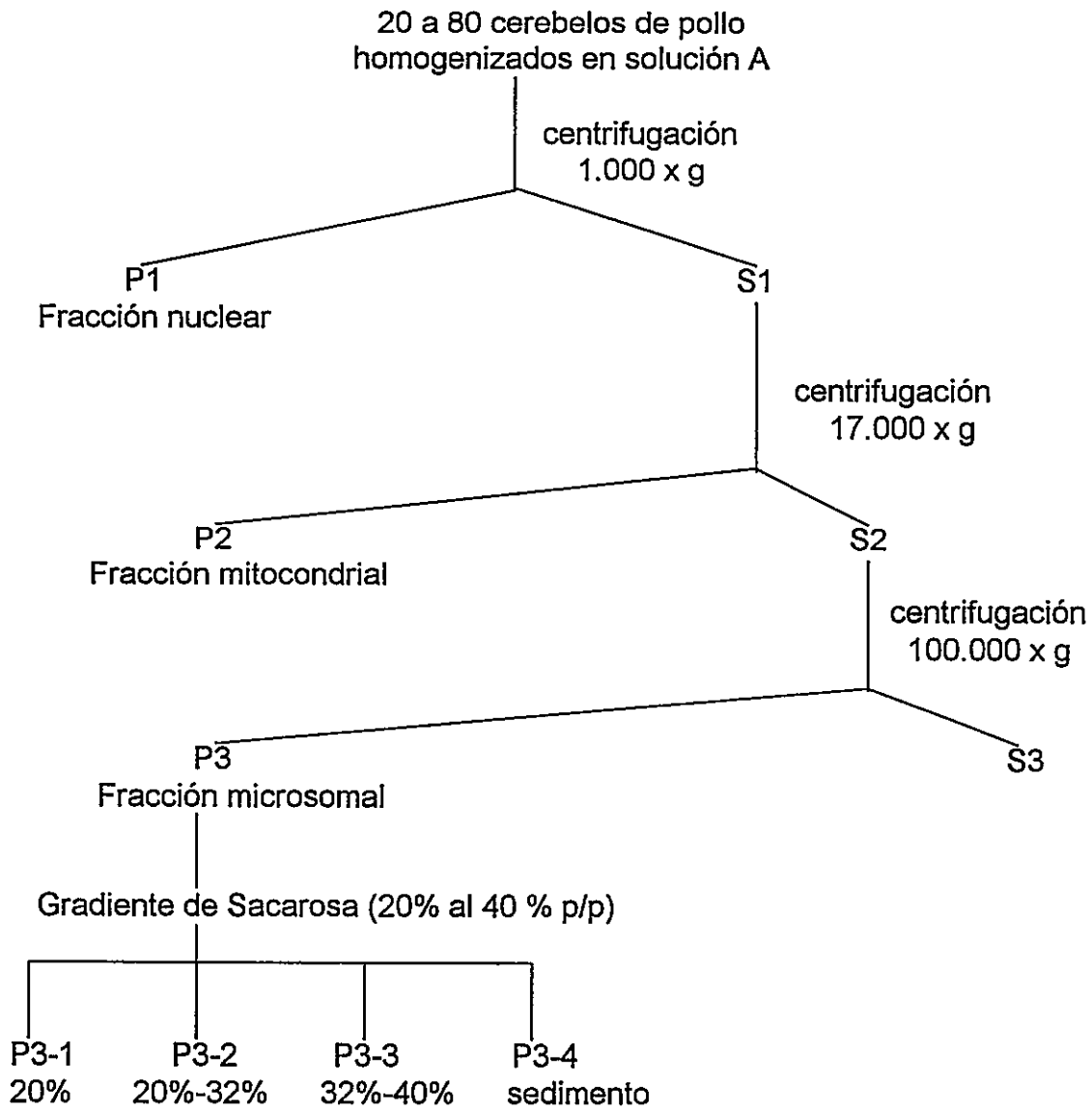


Figura 2: Esquema del procedimiento utilizado para obtener una fracción microsomal enriquecida en receptores de rianodina.

1. - Experimentos de Unión

1.1. Ligámen de [³H]-Ry

Se incubaron vesículas de membranas (100 µg de proteínas por vial) por 90 minutos a 37°C en un tampón que contenía 1 M KCl, 100 µM Ca⁺², 10 mM Hepes-KOH pH 7,4 y 1 mM PMSF en un volumen final de 0,25 ml. La [³H]-Ry (76.2 Ci/mmol) (Du Pont NEN) se agregó a una concentración de 2-4 nM. La unión inespecífica se determinó en presencia de 8 µM Ry. Para separar el radioligando unido del libre se usó el método de filtración por vacío en filtros Whatman GF/B seguida por dos lavados con una solución enfriada en hielo que contenía 1 M KCl y 10 mM Hepes-KOH, pH 7,4. Los filtros fueron secados al aire por 2 horas y colocados en viales con 8 ml de líquido de centelleo suplementados con Arcopal. La radioactividad retenida en los filtros se cuantificó durante 2 minutos en un contador de centelleo líquido (Packard 1600TR, Canberra Company) con una eficiencia de 43 a 48 %. La unión total a pCa 4 varió de preparación a preparación entre 12.000 y 6.000 dpm mientras que la unión inespecífica en las mismas condiciones se encontró entre 4000 y 1300 dpm.

1.1.1. Experimentos de saturación

Estos experimentos se realizaron a concentraciones crecientes de [³H]-Ry entre 0,25 y 20 nM. Las concentraciones mayores (30-200 nM) se lograron

disminuyendo la actividad específica, agregando Ry no radioactiva. La unión inespecífica se cuantificó para cada concentración agregando al medio de ensayo una concentración de Ry no radioactiva que excedió en 100 veces la concentración de [³H]-Ry. Los resultados de estos experimentos se ajustaron con un programa de ajuste, utilizando la ecuación:

$$B = B_{\max} * x / (K_D + x) \quad (\text{Bennet y Yamamura, 1985})$$

en la que **B** es la unión específica, **B_{max}** es el máximo de unión específica, **K_D** es la constante de disociación y **x** es la concentración de Ry libre. La unión específica **B** se obtuvo restando en cada punto la unión inespecífica de la unión total.

Alternativamente la unión inespecífica se ajustó a la ecuación de una recta y las uniones totales se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$B_T = (a * x + b) + B_{\max} * x / (K_D + x)$$

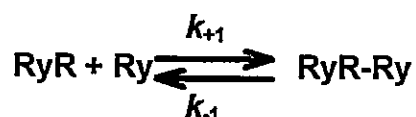
en la que **a** y **b** son los parámetros de la recta de unión inespecífica v/s concentración, **B_T** es la unión total, **B_{max}** es el máximo de unión específica, **K_D** es la constante de disociación y **x** es la concentración de Ry libre. Para linealizar los datos se usó la ecuación de Rosenthal (o transformación de Scatchard):

$$B / F = (-1 / K_D) * B - B_{max} / K_D$$

en que **B** es la cantidad de ligando unido, **F** es el ligando libre, **B_{max}** es la unión máxima y **K_D** es la constante de disociación. (Bylund y Yamamura, 1990)

1.1.2. Experimentos cinéticos.

Todos los experimentos cinéticos se realizaron con la fracción de membranas P3-3 a una concentración de [³H]-Ry de 4 nM. La constante de disociación del equilibrio



se obtuvo de la relación $K_D = k_{-1}/k_{+1}$. k_{+1} y k_{-1} se obtuvieron de experimentos independientes de asociación y disociación respectivamente donde el tratamiento matemático se basó en el manuscrito de Bylund y Yamamura (1990).

1.1.2.1. Cinética de asociación

La cinética de asociación se realizó incubando vesículas de membranas en las condiciones ya descritas, filtrándolas a 0,5, 1, 2, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 120 minutos, en duplicado. El ajuste de las curvas de asociación se hizo con la ecuación exponencial:

$$B = B_e * (1 - \exp (-t / t_{1/2}))$$

De esta ecuación se obtuvo el tiempo medio de asociación, k_{+1} se obtuvo de la ecuación:

$$k_{+1} = (k_{obs} - k_{-1}) / [{}^3\text{H}] - R_y]$$

donde k_{obs} es la pendiente del gráfico $\ln(B_e/B_e-B)$ vs tiempo, B_e es la unión máxima en el equilibrio, B es la unión a tiempo t y k_{-1} se obtiene de un experimento independiente de disociación (Bylund y Yamamura, 1990).

1.1.2.2. Cinética de disociación

La disociación se comenzó a los 90 minutos de incubación agregando al volumen de incubación (0,25 ml) un exceso de solución de incubación de 10 veces (2,5 ml) en presencia o ausencia de Ry 10 μM . Las muestras se filtraron a 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 120 minutos desde el momento de la dilución. El tiempo medio de disociación se obtuvo del ajuste de una ecuación de decaimiento logarítmico y k_{-1} se obtuvo de la pendiente del gráfico $\ln (B / B_e)$ vs tiempo (Bylund y Yamamura, 1990).

1.1.3. Experimentos de desplazamiento

Estos experimentos se realizaron manteniendo constante la concentración de [³H]-Ry en 4 nM y agregando concentraciones crecientes de 0.5 a 200 nM de Ry no radioactiva. La unión inespecífica se obtuvo agregando 8 μM de Ry no radioactiva. La ecuación usada para el ajuste de la curva de desplazamiento fue:

$$B = B_{\max} / (1 + [Ry] / K_{0.5}) \quad (\text{McPherson, 1985})$$

donde **B** es el porcentaje de unión respecto al máximo en ausencia de **Ry** no radioactiva (unión específica), **B_{max}** es el máximo de unión, como porcentaje y **K_{0.5}** es la concentración a la que se logra el 50% de desplazamiento.

1.1.4. Dependencia de calcio y cafeína de la unión de [³H]-Ry

La medición de la dependencia de calcio de la unión se realizó en presencia de 4 nM de [³H]-Ry usando las soluciones de pCa controlado descritas en la **Tabla 1**, las que además contenían 100 mM HEPES-KOH y 1M KCl (pH 7,4).

El calcio se agregó desde de una solución de CaCl₂ 110 mM titulada por medición de cloruros con un electrodo de Ag/AgCl. La concentración de calcio de estas soluciones no pudo ser medida directamente con electrodo de calcio por la alta fuerza iónica que afecta las mediciones de Ca²⁺ de concentraciones menores

Tabla 1: Composición de las soluciones de pCa controlado

<i>pCa</i>	<i>Quelante de calcio</i>	$[Ca^{+2}]$ (mM)
8	EGTA	2,18
7	EGTA	7,36
	HEDTA	0,588
6.5	HEDTA	1,66
6	HEDTA	3,8
5.5	HEDTA	6,6
5	NTA	2,73
4.5	NTA	5,75
4	-----	0,1
3	-----	2,2

de 100 μ M. Por ello la concentración de calcio se midió en soluciones de iguales concentraciones de Ca^{2+} y de quelante de calcio pero con una fuerza iónica menor (100 mM KCl). Con estos valores se ajustó la concentración de calcio agregado para tener los valores de pCa requeridos. Se midió la unión inespecífica para cada concentración de calcio. Para estos experimentos los datos se ajustaron a la ecuación de una hipérbola:

$$U = \text{Max} * [\text{Ca}^{2+}] / K_{0.5} + [\text{Ca}^{2+}]$$

donde **U** es la unión de [³H]-Ry como porcentaje del valor máximo (o como fmol/mg) y **K_{0.5}** es la concentración de Ca²⁺ a la que se logró la mitad de la unión máxima.

1.2. Ligamen de [³H]-IP₃

Se incubaron 100 µg de proteína por 30 minutos a 4°C en una solución con 2 a 3 nM de [³H]-IP₃ (New England Nuclear), tampón Tris-HCl 50 mM a pH 8,4 con 1 mM EDTA y 1 mM β-mercaptoetanol, en un volumen final de 0,25 ml. El [³H]-IP₃ unido se separó del libre por centrifugación a 12000 r.p.m. por 10 minutos. La unión inespecífica se obtuvo incubando las membranas con la solución descrita pero en presencia de 8 µM de IP₃ no radioactivo. Los sedimentos se solubilizaron con SDS (20 µl de una solución al 10%) toda la noche. Al día siguiente se cortaron las puntas de los viales eppendorf que contenían el sedimento y se colocaron en 7 ml de líquido de centelleo suplementado con Arcopal. Los viales se contaron por 2 minutos en un contador de centelleo líquido de alta eficiencia .

2. Electroforesis e inmunodetección (western blots).

Las electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS se realizaron por la técnica descrita por Laemmli (1970) en una cámara Bio-Rad para minigeles, en gradientes de poliacrilamida del 4 al 12 % p/v, a 100 V por 2 horas. Los geles se tiñeron con azul de coomassie. Los western blots se hicieron con geles al 5% (2 horas a 100 V).

La transferencia de proteínas a láminas de nitrocelulosa (0.45 mm. Micron Separations Inc.) se hizo en una cámara Bio-Rad a 100 volts por 5 horas en cámara fría. Se controló la eficiencia de la transferencia tiñendo el gel usado para la transferencia con azul de coomassie. Una vez realizada la transferencia, la membrana se trató durante toda la noche en una solución TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 al 0.4 %) con un 10 % de proteína bloqueadora (Leche en polvo descremada Svelty). Al día siguiente la membrana se lavó durante 1 hora con TTBS con 1% de proteína (4 lavados de 15 minutos). La membrana de nitrocelulosa se incubó con anticuerpos monoclonales específicos para las isoformas α y β de músculo esquelético de pollo (donados gentilmente por el Dr. John Sutko, University of Nevada, Reno; Airey et al, 1993; Percival et al, 1994) por 2 horas en TTBS con 1% de proteína en las siguientes diluciones: m110E anti β = 1/10, m5D4 anti α = 1/20. Esto fue seguido por incubación por dos horas con un segundo anticuerpo (anti IgG de ratón) conjugado con peroxidasa de rábano. Las membranas se lavaron durante una hora (3 lavados de 15 minutos y 2 de 10

minutos), con un último lavado con TBS para retirar el Tween-20. Para el revelado se usó el protocolo Amersham (ECL 2114) que produce una reacción quimioluminiscente que marca placas fotográficas de autorradiografía (Kodak o Amersham).

3. Experimentos de canal único

3.1. Registro de canal único en bicapas planas.

Para el registro de canales únicos los canales de liberación de calcio presentes en membranas de microsomas de cerebelo se incorporaron a bicapas lipídicas planas del tipo Mueller-Rudin (Suárez-Isla et al., 1991; Bull et al., 1989). Las bicapas se formaron a partir de una mezcla de 1-palmitoyl 2-oleoil fosfatidil etanolamina (POPE), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilcolina (PC) en la razón de 5:3:2, disueltas en decano a 30 mg/ml. Las membranas se fusionaron a las bicapas planas después de la adición de 20 a 30 µg de la suspensión de membranas al compartimento llamado cis, que corresponde a la cara intracelular de la membrana reticular (compartimento en que se aplica el potencial). La fusión se promovió con la presencia de un gradiente de metanosulfonato de cesio (CsMS) 400 mM en el compartimento cis versus 20 mM en trans (Fill et al., 1990) (trans, corresponde al lado intraluminal del canal y es tierra virtual). Ambos compartimentos contenían además 20 mM de HEPES Tris a pH 7,4 con 10 a 20 µM de Ca²⁺ libre. La

incorporación del canal se reveló como la aparición de una corriente positiva de más de 10 pA. En ese momento el lado trans fue conectado a tierra y se agregó CsMS 4 M en cantidad suficiente para llegar a una concentración igual a ambos lados de la membrana. Todos los agonistas y drogas se agregaron en el lado cis o citoplasmático.

Las curvas de dependencia de calcio de P_o se construyeron agregando calcio en el lado cis hasta una concentración de 100 μ M (100 μ l de una solución 20 mM de metanosulfonato de calcio, CaMS) y luego los quelantes de calcio EGTA y HEDTA en la proporción calculada por el programa Catlig para obtener las concentraciones deseadas de calcio libre. En experimentos independientes el proceso de adición de calcio y tampones se reconstruyó con las mismas soluciones y se midió la concentración de calcio por medio de un electrodo específico para Ca^{+2} (Orion). Esto se repitió cada vez que se cambiaron soluciones. Las concentraciones informadas corresponden a las medidas con el electrodo de calcio.

Para los dos tipos de dependencia de calcio encontradas, los datos de P_o se ajustaron con la ecuación desarrollada por Bull y Marengo (1993).

$$P_o = P_{o_{max}} / (1 + (K_A)^n / ([Ca^{2+}]^n + [Ca^{2+}] / K_B)) \quad \text{Ecuación 1}$$

donde $P_{o_{max}}$ corresponde a la fracción de tiempo que el canal está abierto a la

máxima activación por Ca^{+2} , K_A es la concentración de Ca^{+2} a la cual se produce la mitad de la activación máxima, K_B es la concentración de Ca^{+2} a la que se produce la mitad de la inhibición y n es el número de Hill.

3.2. Adquisición y análisis de datos

Los registros de canales únicos fueron filtrados a 1 o 2 KHz (-3 dB, filtro Bessel pasabajos de 8 polos, Frequency Devices Co. Haverhill, Massachusetts, EEUU de A.), digitalizados usando un procesador de audio modificado (Sansui PC-X11, 14 bits, DC a 14 kHz) y grabados en cinta de vídeo (videgrabadora Toshiba). Estos registros fueron posteriormente transferidos a la computadora por medio de una tarjeta de adquisición Axolab-1 usando la suite de programas pClamp 5.5.1 (Axon Instruments, Foster City, California, EEUU de A.). Las probabilidades de apertura (P_o) y la amplitud de corriente de los canales se midieron en registros de 3 a 5 minutos .

Para el análisis de estallidos o bursts se emplearon registros de canales únicos de más de tres minutos de duración. El análisis se realizó de acuerdo a la metodología del trabajo de Armisén et al., (1996, en prensa). En breve, a partir de un registro idealizado binario (programa Fetchan) se construyó un histograma no condicionado de duraciones de tiempos abiertos y cerrados. La constante de tiempos cerrados que presentó la mayor área relativa en el ajuste multiexponencial fue considerada como predominante y se seleccionó para definir el tiempo crítico interburst y de allí los estallidos. Un "burst" es una serie

de aperturas y cierres separados por tiempos cerrados más largos que un tiempo crítico. Este fue definido como al menos 5 veces el tiempo cerrado predominante obtenido del ajuste de los histogramas de duraciones de tiempos cerrados. Por medio de un programa desarrollado dentro del ambiente LPROC (Axon Instruments, Foster City, California, EEUU de A.) se analizó el registro binario idealizado tomando en cuenta el tiempo crítico obtenido para este registro. Este análisis dió como resultado una lista con las propiedades de los "bursts" definidos. Con esta información se construyeron histogramas de distribución de tiempos promedios intraburst abiertos y cerrados con al menos 5 aperturas. Cada uno de estos histogramas que se ajustaron usando una función de distribución *gamma* donde la variable ajustada fue el promedio de los tiempos abiertos o cerrados dentro del burst normalizado por el número de eventos abiertos o cerrados del burst (Naranjo y Brehm, 1993).

4. Lista de reactivos y equipos usados:

Todas las sales utilizadas y los quelantes de calcio EGTA y EDTA fueron reactivos analíticos de la empresa Merck (Darmstadt, Alemania). Los tampones de pH (Hepes y Tris) y los quelantes de calcio (NTA y HEDTA) así como los inhibidores de proteasas (inhibidor de tripsina, PMSF y leupeptina), DTT y β mercaptoetanol y CsMe fueron adquiridos de Sigma Chemical Co (St Louis, Missouri, EEUU de A.). Los ligandos radioactivos [^3H]-IP $_3$ y [^3H]-Ry fueron

adquiridos de New England Nuclear, Du Pont. Los reactivos para electroforesis provienen de la empresa BioRad (BioRad Laboratories, Richmond, California, EEUU de A.) y los fosfolípidos de Avanti Polar Lipids Inc.(Birmingham, Alabama, EEUU de A.). El CaMS fue preparado en el laboratorio por titulación de hidróxido de calcio con ácido metanosulfónico (Sigma Chemical Co.) hasta pH 7,4.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en esta tesis se presentan en tres capítulos. El primero contiene la caracterización bioquímica de la preparación de membranas usada y la caracterización de la unión de [^3H]-Ry; determinándose los efectos sobre la unión de [^3H]-Ry de dos agonistas importantes, cafeína y calcio. En el segundo capítulo se presenta la caracterización electrofisiológica de los canales de liberación por la técnica de bicapas planas, mostrando el efecto de Ry en los canales así como las dependencias de cafeína y calcio de la P0. En el último capítulo se presenta un análisis cinético de las dependencias de calcio y cafeína de los canales de liberación que permite sugerir un mecanismo de activación.

1 *Obtención de una preparación de membranas enriquecida en RyR*

El primer objetivo específico de esta tesis fue obtener una preparación de membranas enriquecida en receptores de rianodina (RyR) apropiada para experimentos de unión y electrofisiológicos. Para ello se introdujeron modificaciones a un protocolo para la preparación de microsomas de cerebro (Ashley, 1989) (ver Métodos). Los estudios preliminares determinaron el uso de

una fracción de membranas de cerebelo de pollo como el sistema más apropiado.

1.1 Caracterización de la preparación de membranas

1.1.1 Distribución de la unión de [³H]-Ry e [³H]-IP₃ en las fracciones de membrana de cerebelo de pollo

Para comparar la distribución de receptores de IP₃ y Ry y el enriquecimiento relativo de ellos, se midió la unión de [³H]-Ry y de [³H]-IP₃ en las distintas fracciones y subfracciones de membrana. La **Figura 3** muestra que la unión de [³H]-Ry se concentra en la fracción microsomal (P3) y esta enriquecida en la subfracción P3-3, en 2,5 veces la concentración de la fracción P3. La unión de [³H]-IP₃ es relativamente mayor en la fracción mitocondrial (P2) pero también esta presente en la fracción microsomal, encontrándose enriquecida en la fracción P3-3 en 3 veces la concentración de la fracción P3. Esto indica que esta preparación bioquímica, aunque no permite una separación estricta de ambos marcadores, posibilita un enriquecimiento significativo de los marcadores de reservorios de calcio intracelular.

Comparando las uniones máximas de ambos ligandos se pueden obtener sus proporciones relativas en la fracción de membranas P3-3 en que

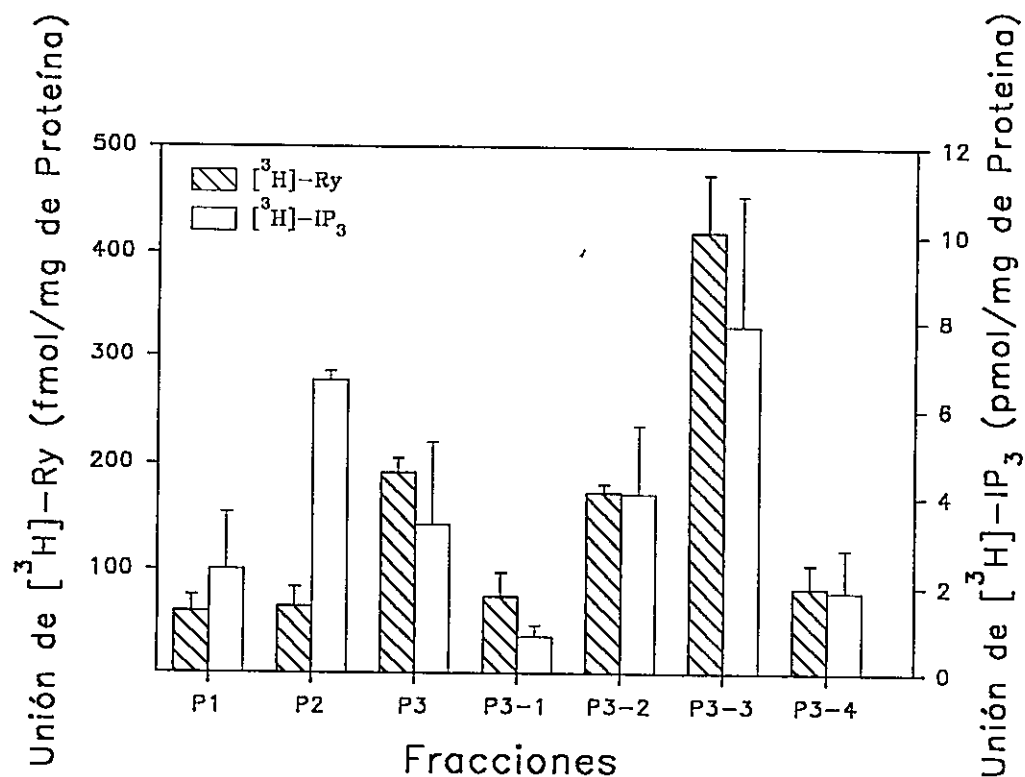


Figura 3: Distribución de la unión de [³H]-Ry e [³H]-IP₃ en las fracciones y subfracciones de cerebelo de pollo. La unión está graficada como el promedio \pm error estándar (n=4) de la unión máxima por mg de proteína calculada a partir de una K_D de 2 nM para la unión de [³H]-Ry y de 14 nM para la unión de [³H]-IP₃. Los experimentos se realizaron a una concentración de 2,4 nM de [³H]-Ry y de [³H]-IP₃.

ambos receptores están enriquecidos. Hay que tomar en cuenta que el receptor de IP_3 es un tetrámero donde cada subunidad une una molécula de IP_3 . Por lo tanto, la unión máxima representa cuatro veces el número de receptores de IP_3 . El RyR, en cambio, tiene un sólo sitio de alta afinidad por tetrámero. Por lo tanto en este caso la unión máxima es igual al número de receptores. Los cálculos indican que en la subfracción P3-3 hay un promedio de 5,7 receptores de IP_3 por cada receptor de Ry.

La unión máxima de [3H]-Ry se calculó con un K_D de 2 nM ya que dada la concentración de [3H]-Ry utilizada en este ensayo (2,4 nM) se está observando principalmente el sitio de alta afinidad. La unión máxima de [3H]- IP_3 se calculó usando un K_D de 14 nM que fué obtenido de un experimento de saturación (dato no mostrado).

1.1.2 Distribución de la unión de [3H]-STX

Para estimar la contaminación por membrana plasmática en la fracción P3-3, se midió la unión de saxitoxina tritiada ([3H]-STX) en las distintas fracciones y subfracciones. La [3H]-STX se une al canal de sodio que está exclusivamente en la membrana plasmática de las neuronas, por lo que se emplea como un marcador específico. En la **Figura 4** se muestra la distribución de este marcador y se compara con la unión de [3H]-Ry. Los resultados indican que la unión de [3H]-STX se concentra en la fracción P1 siendo muy baja la

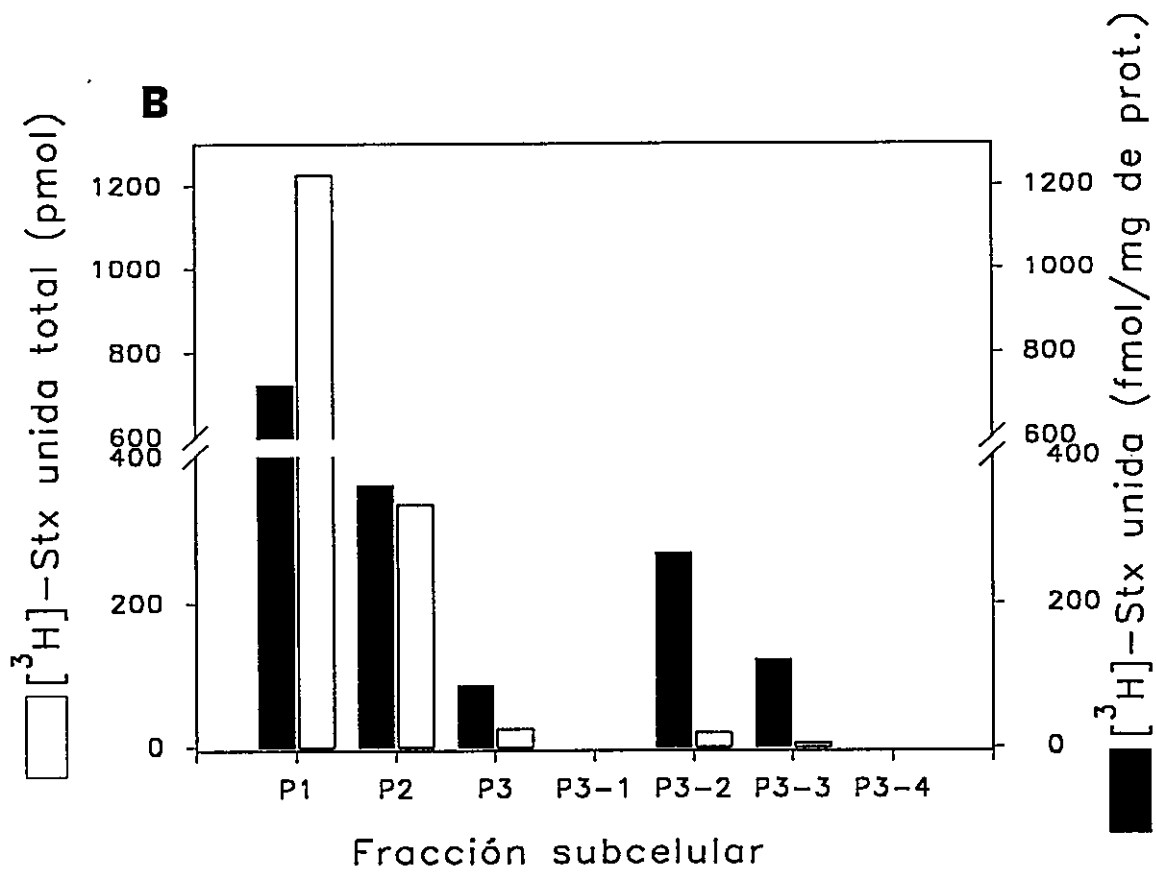
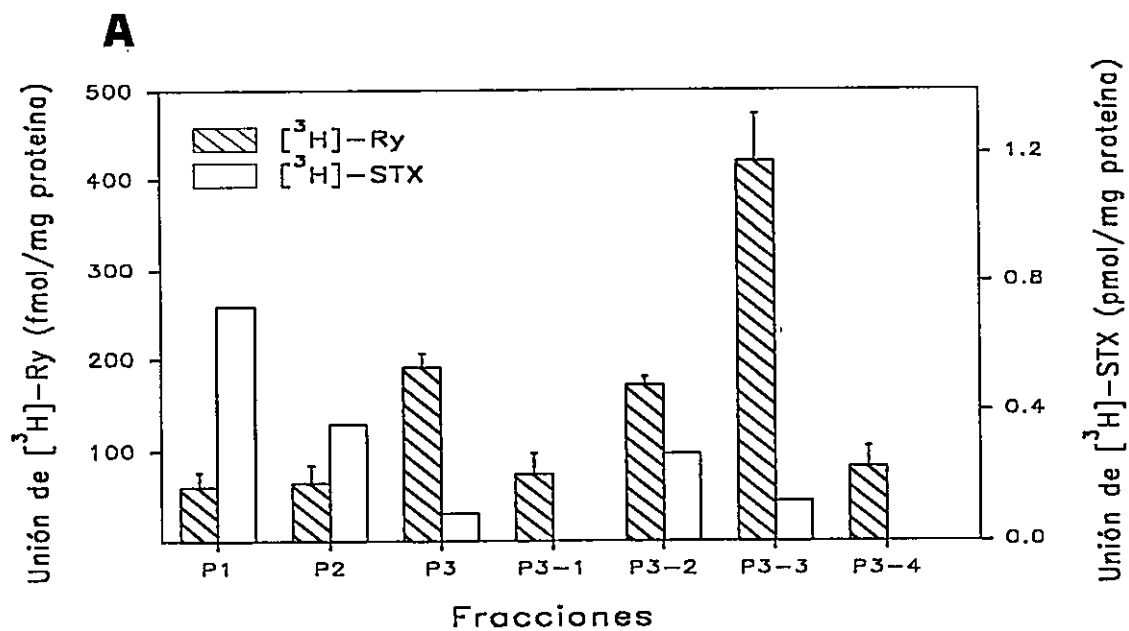


Figura 4: Distribución de la unión de [³H]-Ry y [³H]-Saxitoxina en las fracciones y subfracciones de cerebelo de pollo. La unión está expresada como unión máxima por mg de proteína calculada con un K_D de 2 nM para la unión de [³H]-Ry y de 1,5 nM para [³H]-STX (esta constante se obtuvo de experimentos de desplazamiento no mostrados). **A.** comparación entre la distribución de [³H]-Ry y [³H]-STX. **B.** Distribución de la unión de [³H]-STX expresada como unión específica y como unión total (unión específica multiplicada por el contenido total de proteínas de la fracción). La concentración de ambos isótopos en el ensayo fue de 2,4 nM.

contaminación en las fracciones microsomales. Esta contaminación se minimiza aún más en la subfracción P3-3. Para indicar la magnitud absoluta de la presencia del marcador de membrana plasmática en la fracción P3-3 se ha expresado en la **Figura 4B** el ligamen de [³H]-STX como ligamen total, definido como el ligamen específico multiplicado por el contenido total de proteínas en la fracción. Estos cálculos indican que el número de receptores de STX en la fracción P3-3 es el 0,13 % del número de receptores en la fracción P1. (P1=1226 pmoles y P3-3=1,56 pmoles). Es decir la contaminación por membrana plasmática es menor que el 0,2 %.

1.1.3 Análisis de la composición de proteínas de las fracciones de membrana.

El análisis de los geles de poliacrilamida en presencia de SDS revela una gran heterogeneidad de proteínas en todas las fracciones de membranas (**Figura 5**), especialmente en las proteínas de bajo peso molecular. Es posible observar en los geles varias bandas mayores que 200.000 Dalton (standard de miosina), pero ninguna de ellas corresponde a la migración de la banda de RyR de retículo sarcoplasmático de rana (carril 8) usada como estándar, no observándose, de hecho ninguna banda a esa distancia de migración, ni siquiera en la fracción P3-3.

Para determinar la presencia de la proteína del RyR se recurrió al uso de la técnica de inmunodetección (Western Blot) que es de mayor sensibilidad que la tinción con azul de coomassie. Para esto se realizaron geles de

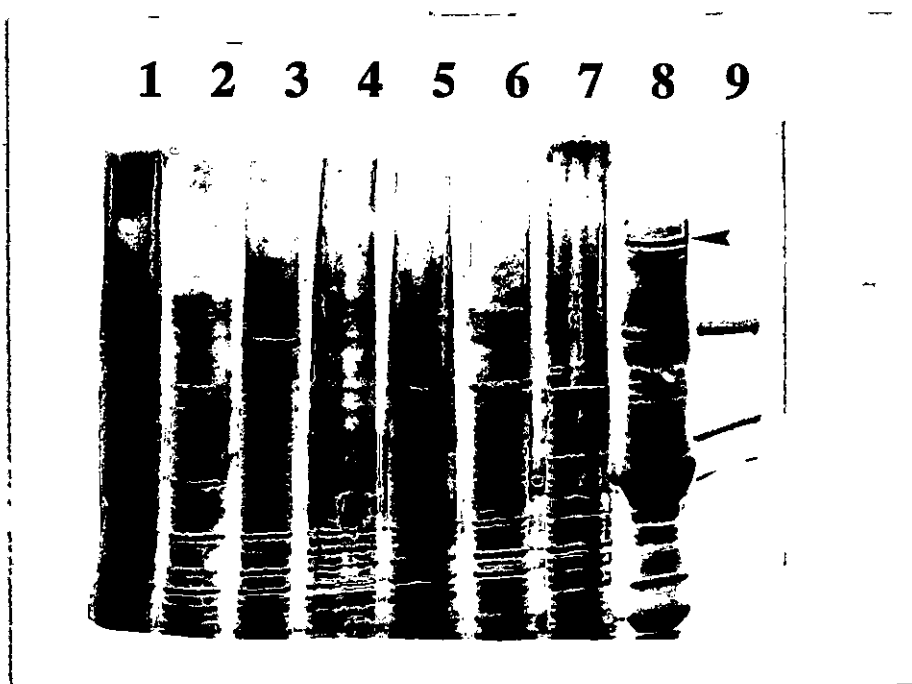


Figura 5: Análisis de la composición de proteínas de fracciones y subfracciones de membranas de cerebelo de pollo por gel de poliacrilamida en presencia de SDS y DTT. 50 μ g de proteínas de cada una de las fracciones fueron sometidos a electroforesis como se describe en métodos en un gel en gradiente de poliacrilamida del 4 al 12 %. Los carriles corresponden a: carril 1, fracción P1; carril 2, fracción P2; carril 3, fracción P3; carril 4, subfracción P3-1; carril 5, subfracción P3-2; carril 6, subfracción P3-3; carril 7, subfracción P3-4; carril 8, retículo sarcoplasmático de rana; carril 9, estándares de peso molecular; miosina, 200.000; β -galactosidasa, 116.000; fosforilasa b, 97.000 y albúmina de suero de bovino, 66.000. La punta de flecha indica la posición del RyR en el carril 8.

poliacrilamida de baja densidad (5 %) para lograr mayor resolución en la zona de alto peso molecular. Se transfirieron las proteínas a nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos específicos donados por el Dr. J. Sutko (University of Nevada, Reno) que diferencian entre la isoforma α y la isoforma β de músculo esquelético de pollo. El anticuerpo específico para la isoforma α mostró una banda de alto peso molecular, excepto en la preparación más antigua (seis meses) que mostró degradación. Esto demuestra la presencia de esta isoforma en la fracción de membranas utilizada para estos estudios (**Figura 6**). El anticuerpo específico para la subunidad β mostró no ser apropiado para western blot, lo cual fue confirmado por el Dr. John Sutko.

1.2 Estudios de unión de [³H]-Ry en membranas de la fracción P3-3

En los RyR de músculo esquelético o cardíaco se ha observado que los agonistas que son capaces de aumentar la P0 del canal también aumentan la unión de [³H]-Ry, y que los fármacos que disminuyen la P0 del canal, disminuyen la unión de [³H]-Ry. Se ha postulado así (Chu et al., 1990) que el ligamen de [³H]-Ry es una sonda que reporta el estado abierto del canal. Si esto es efectivo, el ligamen de [³H]-Ry puede ser usado como un método complementario para estudiar los efectos de agonistas y antagonistas del canal de liberación de calcio. En esta tesis esta posibilidad fue puesta a prueba, estudiándose los efectos de agonistas del

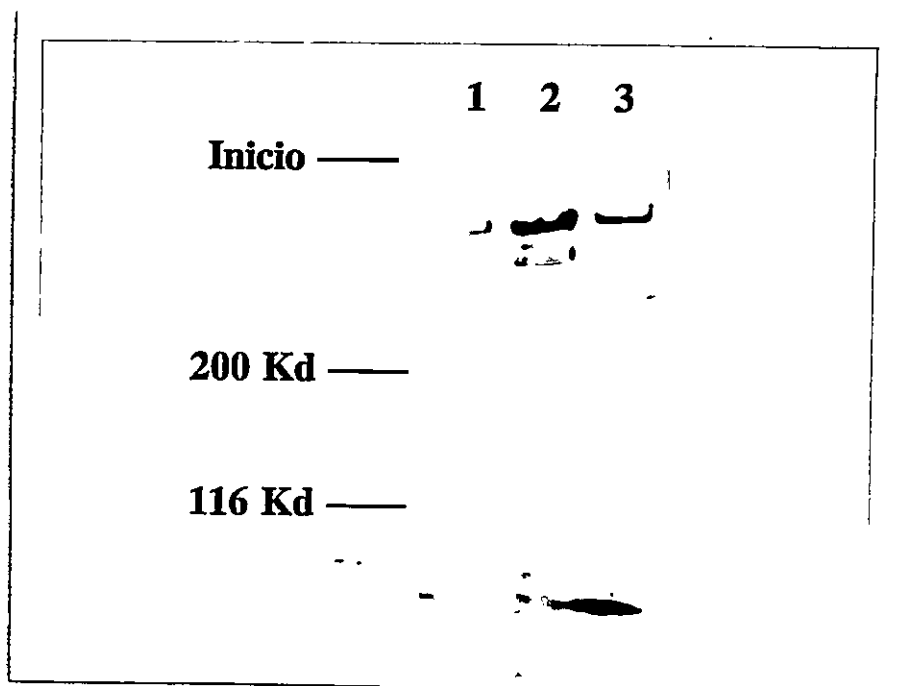


Figura 6: Western blot de la fracción P3-3 con el anticuerpo específico para la isoforma α de músculo esquelético de pollo. La electroforesis y posterior transferencia se realizó como se describe en métodos. Las indicaciones en la figura señalan el inicio y estándares de peso molecular que se obtuvieron comparando la transferencia al papel de nitrocelulosa con la mitad del gel que no se transfirió. Los carriles corresponden a preparaciones de la subfracción P3-3 de distinta antigüedad. Carril 1, dos semanas; carril 2, seis meses; carril 3, un mes.

canal de liberación sobre el ligamen de [^3H]-Ry, y comparándolos con los efectos observados en experimentos de canal único

1.2.1 Características del ligamen de [^3H]-Ry

Para estudiar los efectos de agonistas sobre la unión de [^3H]-Ry es necesario caracterizar previamente las constantes termodinámicas de disociación del receptor para [^3H]-Ry en esta nueva preparación, así como las constantes de velocidad de asociación y de disociación. Para esto se realizaron experimentos para definir las características más importantes del ligamen de [^3H]-Ry a estas membranas.

1.2.1.1 Experimentos de cinética de unión de [^3H]-Ry

Se hicieron experimentos de asociación y disociación de la unión de [^3H]-Ry para obtener las constantes de velocidad k_{-1} y k_{+1} y determinar los períodos de incubación ideales para los experimentos en estado estacionario.

1.2.1.1.1 *Cinética de asociación*

La **Figura 7** muestra un ejemplo de cinética de asociación para la unión de [^3H]-Ry a la fracción P3-3. El tiempo medio de asociación observado fue de 15,7 minutos. La curva de asociación permite concluir que después del período de incubación empleado en los experimentos en estado estacionario (90 minutos) se ha alcanzado más del 85% de la unión máxima. El tratamiento de

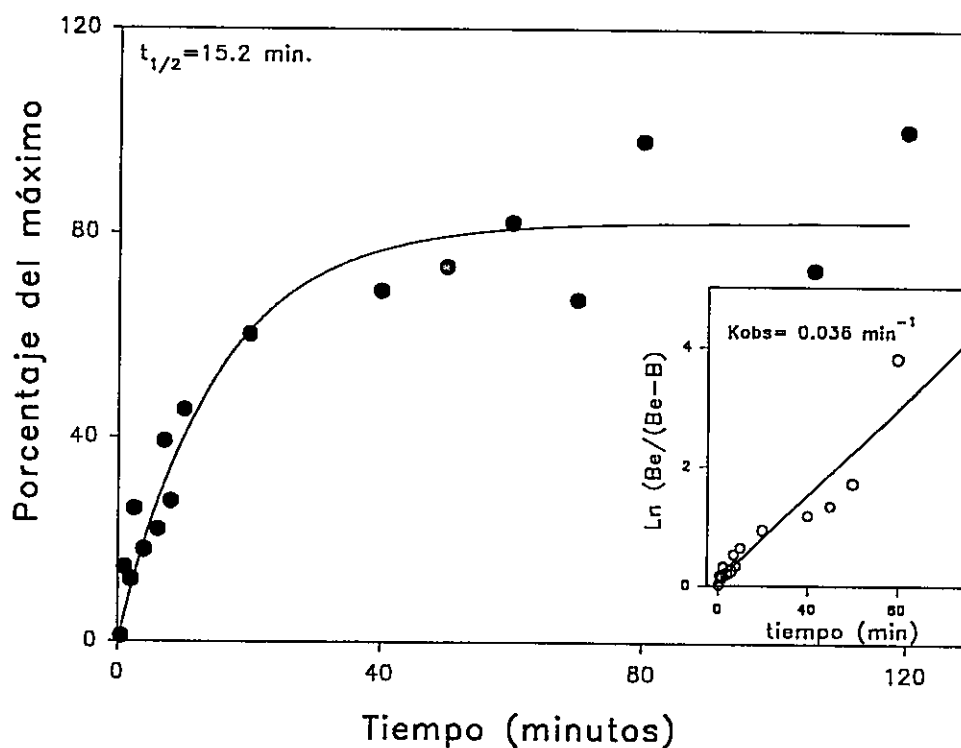


Figura 7: Cinética de asociación de la unión de $[^3\text{H}]\text{-Ry}$ a membranas de la fracción P3-3 de cerebelo de pollo. La unión está expresada como porcentaje del máximo alcanzado a los 120 minutos de incubación. En el inserto se grafica la transformación que permite obtener el k_{obs} que corresponde a la pendiente de la recta. Se grafican todos los puntos obtenidos en dos experimentos independientes hechos en duplicado (se grafican los promedios de los duplicados). En ambos experimentos se usó una concentración de $[^3\text{H}]\text{-Ry}$ de 4 nM.

datos mostrado en el inserto permite la estimación de k_{obs} como la pendiente de la recta $\ln(B_0 / B_0 - B)$ vs tiempo (ver Métodos).

1.2.1.1.2 *Cinética de disociación.*

En experimentos independientes se determinó la velocidad de disociación de la unión de [^3H]-Ry. Hay dos maneras de obtener cinéticas de disociación que son equivalentes si los receptores estudiados no presentan interacción entre sitios de diferente afinidad. Una de ellas es por adición de un exceso de ligando no radioactivo y otra es por dilución del ligando radioactivo por un exceso de solución de incubación (Bennet y Yamamura, 1985). Diferencias en la velocidad de disociación obtenidas por los dos métodos sugerirían contribuciones de cooperatividad al proceso de unión. Se determinó la velocidad de disociación en ambas condiciones (en presencia y en ausencia de un exceso de Ry fría).

La **Figura 8** muestra la disociación de [^3H]-Ry por dilución del radioligando por exceso de solución de incubación, en ausencia de Ry fría. El tiempo medio de disociación en estas condiciones fue de 35,17 minutos. Esto muestra que la cinética de disociación es relativamente lenta y que por lo tanto el método de filtración para la separación del ligando radioactivo unido del libre es adecuado, no necesitándose métodos más rápidos como la separación por centrifugación. La K_D obtenida en experimentos cinéticos (k_{-1} / k_{+1} , ver Métodos) fue 3,1 nM (promedio de dos experimentos). La concentración usada de [^3H]-Ry

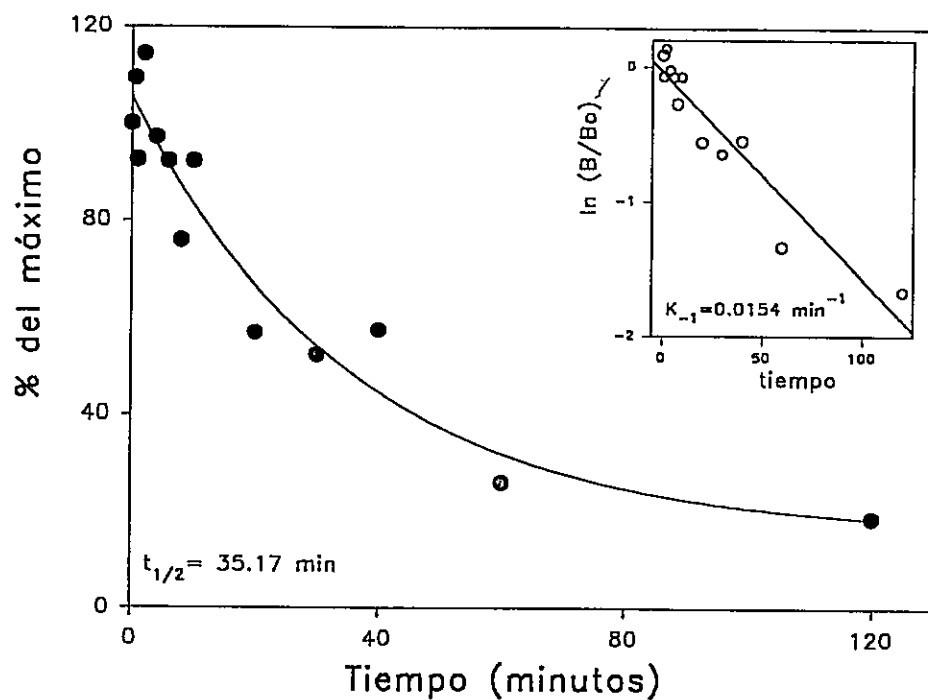


Figura 8: Cinética de disociación por dilución con un exceso de medio de incubación. En el inserto se grafica la transformación que permite obtener el k_{-1} . La unión está expresada como porcentaje del máximo logrado después de 120 minutos de incubación. Los puntos son promedios de dos experimentos cada uno hecho en duplicado.

en estos experimentos (4 nM) sólo permitió obtener la K_D para sitios de alta afinidad.

En la **Figura 9** se muestra la cinética de disociación de [^3H]-Ry cuando se agrega un exceso de Ry fría. Se observa que la cinética de disociación tiene dos componentes, uno muy rápido ($t_{1/2} = 1,07$ minutos) y otro muy lento ($t_{1/2} > 10.000$ minutos) que representa un porcentaje de difícil disociación. Comparando las dos curvas se observa que el exceso de Ry no radioactiva está impidiendo que se disocie [^3H]-Ry que fue fácilmente disociada por dilución en ausencia de ella. La [^3H]-Ry está unida principalmente a los sitios de alta afinidad (el experimento está realizado a 4 nM de [^3H]-Ry). Por lo tanto esto sugiere que se está produciendo una interacción alostérica entre el sitio de alta afinidad (de disociación relativamente rápida en ausencia de Ry) y uno o más sitios de baja afinidad que al ocuparse impedirían la disociación de la [^3H]-Ry desde el sitio de alta afinidad.

1.2.1.2 Experimentos de saturación

La manera clásica de obtener el número de sitios para un ligando y la afinidad de cada uno de ellos es la determinación de constantes de disociación por el método de saturación. De esa manera se determinó la K_D del RyR en la subfracción P3-3. En la **Figura** se muestra un experimento de saturación en el que se grafica la unión específica versus la concentración de Ry. Los puntos

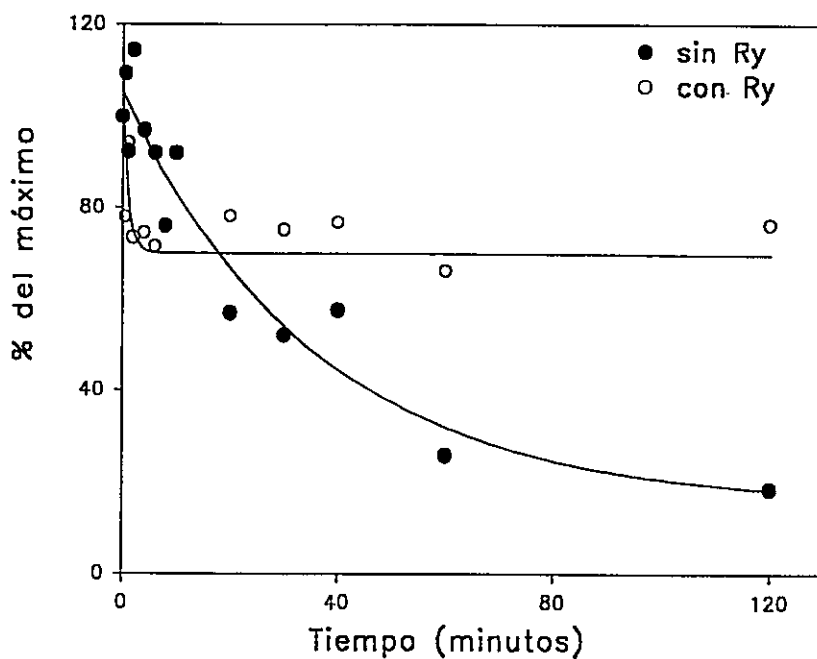


Figura 9: Cinética de disociación por un exceso de Ry no radioactiva. En la figura se compara la cinética en presencia y ausencia de Ry fría. La cinética en presencia de Ry no radioactiva se ajustó con 2 exponenciales (ver texto). La unión está expresada como porcentaje del máximo logrado después de 120 minutos de incubación. Experimento representativo de dos experimentos realizados con una concentración de [^3H]-Ry de 4 nM.

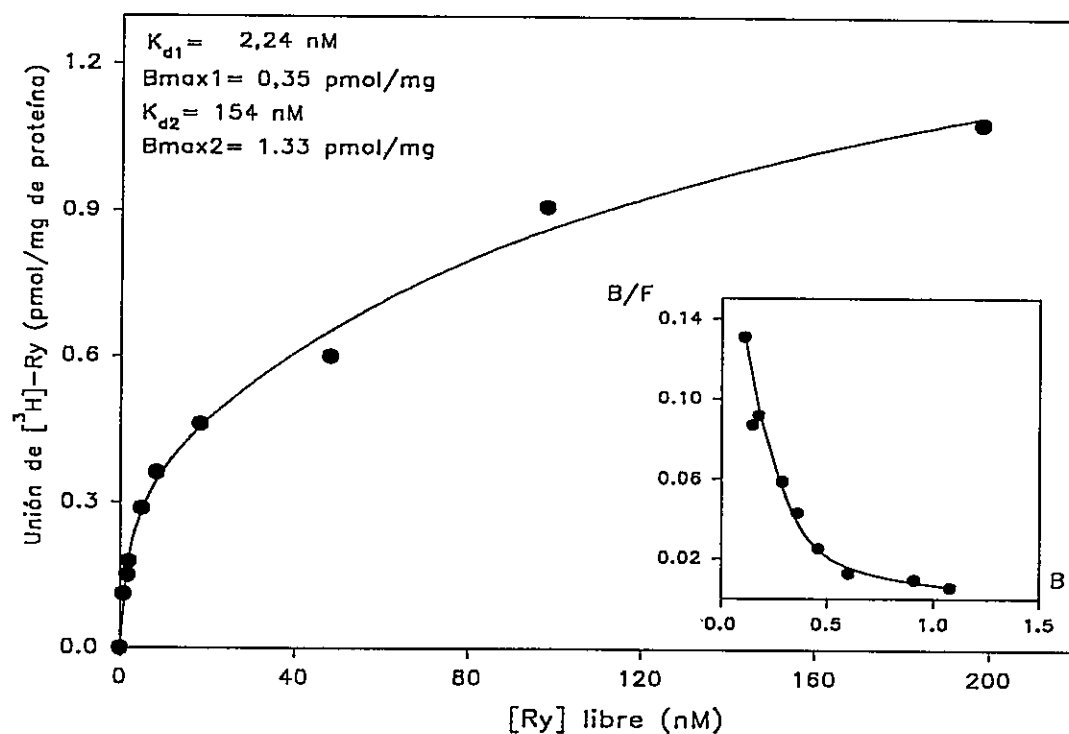


Figura 10: Experimento de saturación de la unión de [^3H]-Ry a membranas de la subfracción P3-3. El inserto muestra la transformación de Scatchard. La unión está expresada como unión específica en pmol/mg de proteína.

se ajustaron por un programa de ajuste por el método de los cuadrados mínimos y el mejor ajuste (por χ^2) de los puntos se logró con la ecuación que supone dos sitios. Esto se aprecia más claramente en el inserto en que se grafica la transformación de Scatchard de los datos y que muestra una curva no lineal.

1.2.1.3 Experimentos de desplazamiento

En los experimentos de saturación el aumento importante de la unión inespecífica a altas concentraciones de [^3H]-Ry impidió que se llegara a altas concentraciones de Ry manteniendo la actividad específica. Se escogió aumentar la concentración de Ry fría disminuyendo la actividad específica. Este procedimiento podría generar un error al calcular la Ry unida que podría estar "creando" el segundo sitio encontrado. Para descartar esta posibilidad se hicieron experimentos de desplazamiento de la unión de [^3H]-Ry por Ry fría.

La **Figura 1** muestra los resultados de un experimento de desplazamiento. El mejor ajuste de los datos se logró con una ecuación que supone dos sitios. La transformación de Scatchard mostrada en el inserto muestra una curva no lineal confirmando la presencia de sitios de baja afinidad.

La **Tabla 2** muestra un resumen de las K_D obtenidas por los distintos métodos.

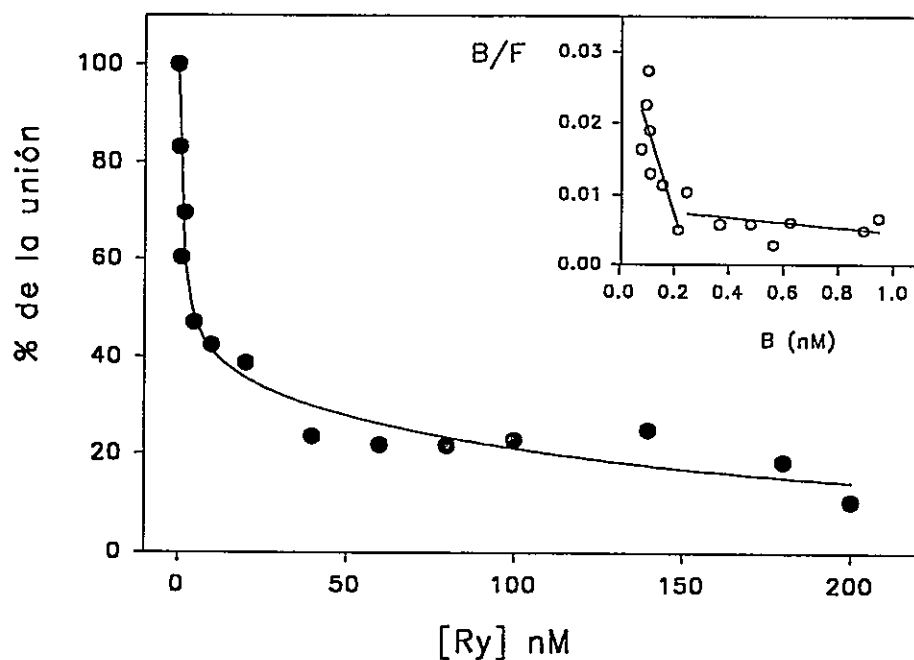


Figura 11: Desplazamiento de la unión de $[^3\text{H}]\text{-Ry}$ por Ry fría. El experimento se realizó a una concentración de 4 nM de $[^3\text{H}]\text{-Ry}$. El 100 % corresponde a una unión de 353 fmol/mg de proteína. La línea continua representa el mejor ajuste considerando dos sitios de unión. En el inserto se grafica la transformación de Scatchard.

Tabla 2: Constantes de disociación para la unión de [³H]-Ry obtenidas por distintos métodos.

Método	K_{D1} promedio \pm DS (nM)	K_{D2} promedio \pm DS (nM)
Saturación	1.39 \pm 0.97 n=4	133 \pm 66 n=3, *
Cinética	3.1 n=2	
Desplazamiento	($K_{0,5}$) 2 \pm 0.74 n=3	115 **

* un experimento no pudo ser ajustado a valores menores que 1000 nM, ** dos experimentos no pudieron ajustarse con valores menores que 1000 nM.

Como se puede observar las constantes de alta afinidad obtenidas por los distintos métodos son muy parecidas siendo estadísticamente indistinguibles. Por el contrario, las constantes de baja afinidad no pueden ser medidas tan precisamente y su dispersión es alta. Sin embargo, estos datos de experimentos complementarios junto con el experimento de disociación por exceso de Ry no radioactiva, permiten sostener que el sitio de baja afinidad tiene existencia real y que no es originado por un artificio del método aplicado. Los datos no permiten descartar la presencia de más de un sitio de baja afinidad.

1.2.2 Efecto de la concentración de calcio sobre la unión de [³H]-Ry

El uso de la unión de [³H]-Ry como detector del estado abierto del canal implica que el efecto de agonistas en el ligamen de [³H]-Ry entrega un promedio poblacional de los efectos de éstos a nivel de canal único. Si esto es efectivo, también en el caso de los RyR de cerebelo de pollo debería verse una congruencia entre los efectos de agonistas en el ligamen y los efectos en los canales únicos. Uno de los agonistas más importantes del RyR de músculo es precisamente el calcio. Se estudió el efecto de este agonista en la unión de [³H]-Ry con el objetivo de comparar posteriormente con los efectos vistos a nivel de canal único en esta misma preparación.

En la **Figura 12** se muestra el efecto de la concentración de calcio sobre la unión de [³H]-Ry en la subfracción P3-3 de cerebelo de pollo. Se observa que la unión es muy dependiente de la concentración de calcio mostrando una forma de activación de la unión de tipo sigmoideal con una saturación a concentraciones micromolares. La concentración a la que se logra la activación media es de $1,08 \pm 0,21 \mu\text{M}$ (promedio \pm desviación estándar, n=4).

En la gran mayoría de los trabajos publicados se menciona la utilización de EGTA como único tampón para regular la concentración de calcio, independientemente del pH usado y de la concentración de calcio libre que se

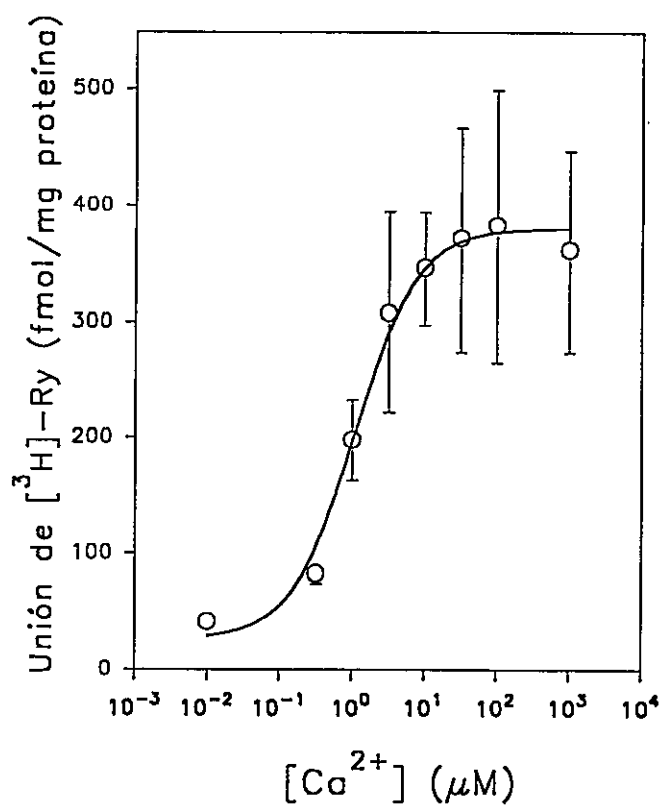


Figura 12: Dependencia de calcio de la unión de [³H]-Ry. La unión está expresada como unión específica en fmol/mg de proteína. Los símbolos representan el promedio de 4 experimentos, las barras corresponden a las desviaciones estándar. Los experimentos se hicieron con una concentración de 4 nM de [³H]-Ry. La línea continua corresponde al ajuste de una hipérbola con los parámetros: B_{max}= 380 fmol/mg de proteína y K_{0.5}= 1,08 ± 0,21 μM

quiere lograr. El EGTA, al igual que otros tampones de calcio como HEDTA y NTA, es muy sensibles al pH, cambiando su rango útil lineal en forma importante entre pH 6,6 y 7,4. En el caso de EGTA el rango dinámico a pH 6,6 es entre pCa 6,7 y 5, mientras que a pH 7,4 es entre 8,3 y 6,7, y a pH 7,2 es entre 8 y 6,4. Esto hace que a los pH en que se realizan los experimentos de unión (entre pH 7,2 y 7,4) EGTA no sea el tampón más apropiado en los rangos más interesantes, es decir entre pCa 6 y 5. Esto provoca una gran incertidumbre en las concentraciones de calcio reportadas en la literatura y por lo tanto en las concentraciones medias de activación encontradas.

En este trabajo se utilizaron diferentes tampones de acuerdo a la concentración de calcio que se quería lograr (ver métodos). Ya que HEDTA a pH 7,4 tiene un rango dinámico entre 6,8 y 4,5 se le seleccionó para controlar adecuadamente las concentraciones de calcio de interés en este estudio. Para controlar este sistema de tampones de calcio se determinó si éste preservaba la sensibilidad característica de los RyR de músculo esquelético que tienen distinta sensibilidad al calcio que los RyR de cerebelo de pollo. Para ello se hicieron experimentos en paralelo con una preparación de tríadas de músculo esquelético de conejo (Hidalgo et al., 1993). En la **Figura 13** se muestra esta comparación que comprueba que el sistema de tampones de calcio es muy adecuado. La unión de [³H]-Ry a los receptores de cerebelo de pollo es, en

promedio, más sensible al calcio que la unión a los receptores de tríadas de músculo de conejo. Este experimento demuestra además que en las condiciones en que se realizaron los experimentos de dependencia de calcio de la unión de [³H]-Ry se reprodujeron las propiedades de una preparación conocida en la literatura (Chu et al., 1993; Michalak et al, 1988; Zimanyi y Pessah, 1991a);

1.2.3 Efecto de cafeína en la unión de [³H]-Ry

La cafeína es un fármaco conocido por aumentar la P₀ del canal de liberación de músculo esquelético y cardíaco. Este agonista ha sido usado como un indicador de la presencia de liberación de calcio inducida por calcio mediada por RyR en neuronas del sistema nervioso central y periférico (Hernández-Cruz et al, 1995). A pesar de que existen evidencias de que la cafeína es capaz de activar el canal de liberación neuronal (Ashley, 1989; McPherson et al., 1991), no hay estudios más acabados del efecto de este agonista en la activación de la P₀ de canales neuronales ni de la activación de la unión de [³H]-Ry.

La **Figura 14** muestra el efecto de cafeína 10 mM en la dependencia de calcio de la unión de [³H]-Ry. Los resultados indican que la cafeína no es capaz de aumentar la unión a todas las concentraciones de calcio; se observa un aumento de la unión sólo a bajas concentraciones de calcio no observándose

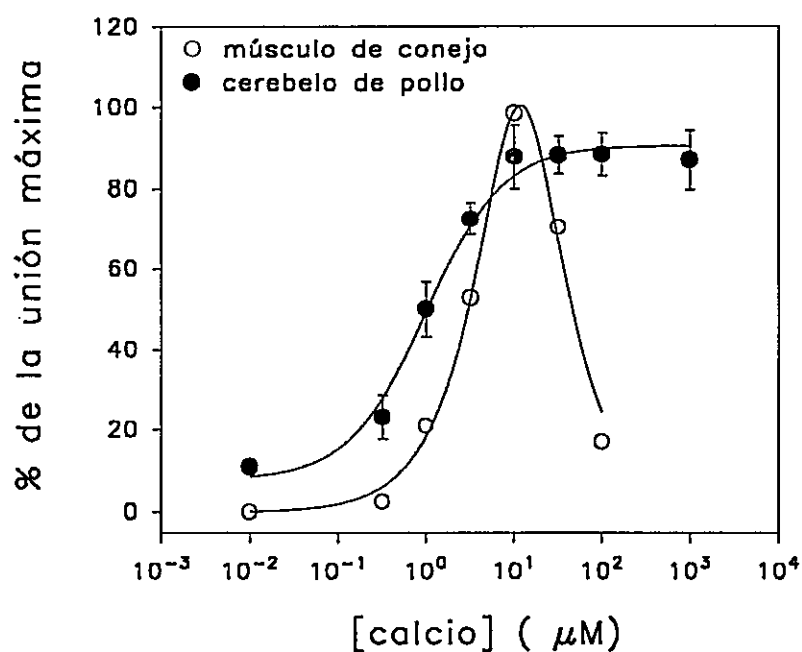


Figura 13: Comparación de la dependencia de calcio de la unión de $[^3\text{H}]\text{-Ry}$ a membranas de músculo de conejo y de cerebelo de pollo. La unión está expresada como porcentaje del máximo de la unión. Los valores máximos son: 3449 fmol/mg de proteína para el músculo de conejo y 380 fmol/mg de proteína para el cerebelo de pollo. Las líneas continuas corresponden a ajustes que generaron las constantes de activación de: $1.05 \mu\text{M}$ para cerebelo de pollo y de $5 \mu\text{M}$ para músculo de conejo (según ecuación 1).

efecto estimulador de cafeína sobre la unión de [^3H]-Ry a concentraciones de calcio mayores que $10\ \mu\text{M}$.

Para controlar posibles interferencias entre los quelantes de calcio y la cafeína se realizó un experimento en paralelo con tríadas de conejo. La **Figura 15** muestra el efecto de $10\ \text{mM}$ cafeína sobre la dependencia de calcio de la unión de [^3H]-Ry a tríadas de conejo. Es claro que en estas condiciones la cafeína aumenta la unión a todas las concentraciones de calcio, pero de una manera que depende fuertemente de la concentración de este catión. A bajas concentraciones de calcio, la cafeína aumenta comparativamente más la unión que a concentraciones altas de calcio, a las cuales la unión ya es máxima.

Una posibilidad que explicaría los resultados obtenidos con RyR de cerebelo sería que las condiciones utilizadas producirían una unión máxima por lo que la cafeína no podría aumentarla por sobre el nivel observado. Esto implicaría que los aumentos de la unión se podrían revelar sólo en condiciones lejanas a la saturación. Alternativamente, es también posible que la cafeína no active el ligamen de Ry a los RyR cerebelares y que esa potenciación sea específica de receptores musculares. Para comprobar o descartar estas hipótesis se realizaron experimentos de dependencia de la concentración de cafeína a dos concentraciones de calcio (pCa 8 y pCa 5). A pCa 8, la unión de [^3H]-Ry fue mínima por lo que se podría esperar que la cafeína sería capaz de aumentar la unión en una manera dependiente de la concentración. A pCa 5 en

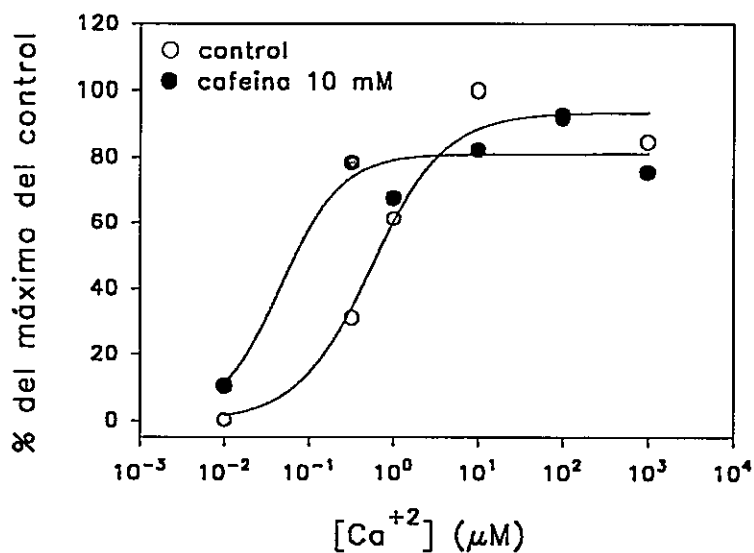


Figura 14: Efecto de 10 mM cafeína en la unión de $[^3H]$ -Ry a membranas de cerebelo de pollo. La unión está expresada como el porcentaje del máximo del control que fué de 214 fmol/mg de proteína. Los puntos representan promedios de dos experimentos independientes realizados en duplicado. El experimento se realizó en presencia de 4 nM de $[^3H]$ -Ry.

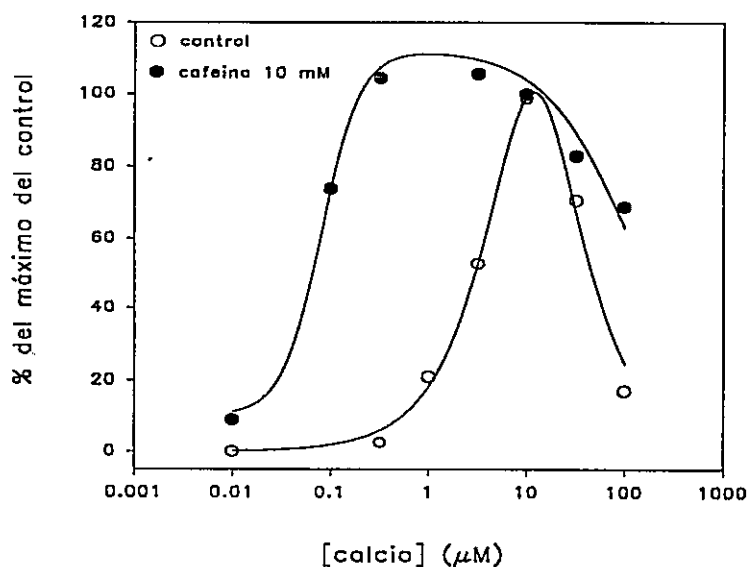


Figura 15: Dependencia de Ca^{+2} de la unión de $[^3\text{H}]\text{-Ry}$ a membranas de músculo esquelético de conejo en condiciones control y estimulada por 10 mM de cafeína. El experimento se realizó como se describió en la sección métodos, excepto que se usaron 25 μg de proteína por vial. Los datos están normalizados al máximo del control que correspondió, en este ejemplo, a 3449 fmol/mg de proteína a pCa 5

cambio, la unión fué máxima por lo que sería esperable, si es que la unión esta saturada, que la cafeína no aumentara la unión de [³H]-Ry independientemente de la concentración de cafeína utilizada. Este mismo experimento también se realizó con tríadas de conejo

Los resultados mostrados en la **Figura 16** para las membranas de cerebelo de pollo indican que, a pesar de que la cafeína a bajas concentraciones es capaz de aumentar discretamente la unión de [³H]-Ry, estos aumentos no son estadísticamente significativos a ninguna de las dos concentraciones de calcio. (p=0,3, pCa 5 y p= 0,15, pCa 8). Para las tríadas en cambio, la cafeína aumenta la unión a las dos concentraciones de calcio.(**Figura 17**), confirmando lo observado en otros trabajos. Estas observaciones apoyan la segunda hipótesis de que la falta de efecto de cafeína es una característica de los RyR de cerebelo de pollo.

1.3 Fracción P3-2

Paralelamente a la caracterización de la unión de [³H]-Ry en la fracción P3-3 se hicieron experimentos de unión con la fracción P3-2. para determinar si existía alguna diferencia en los receptores de las dos subfracciones Esta tiene aproximadamente un 50% de la unión específica de comparada con la fracción P3-3. La fracción P3-2 presentó un K_D de alta afinidad no significativamente distinto al de la fracción P3-3 en experimentos de saturación y de desplazamiento (K_D = 5,58 ± 2,34 nM, n=3 y K_d = 2,99 ± 2,35 nM, n=3) y presentó un segundo sitio de baja afinidad evidente sólo en experimentos de desplazamiento (380 nM, n = 2). La

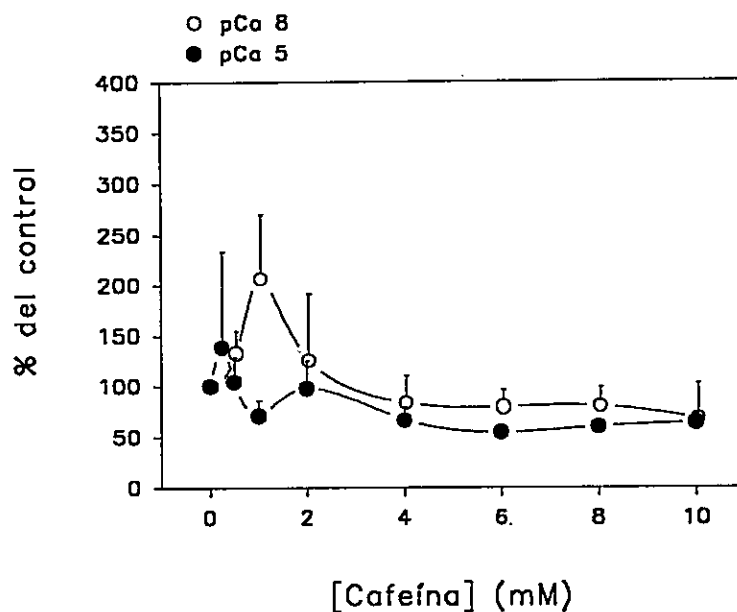


Figura 16: Efecto de concentraciones crecientes de cafeína en la unión de $[^3\text{H}]$ -Ry a la fracción P3-3 de cerebelo de pollo. Los datos se presentan como el porcentaje del control promedio \pm error estándar ($n=4$). La unión de $[^3\text{H}]$ -Ry no mostró diferencias estadísticamente significativas a las dos concentraciones de calcio estudiadas (pCa8 1 mM cafeína $p=0,15$; pCa 5 0,25 mM cafeína $p=0,38$; test t de Student para muestras pareadas). Los experimentos se realizaron en presencia de 4 nM de $[^3\text{H}]$ -Ry.

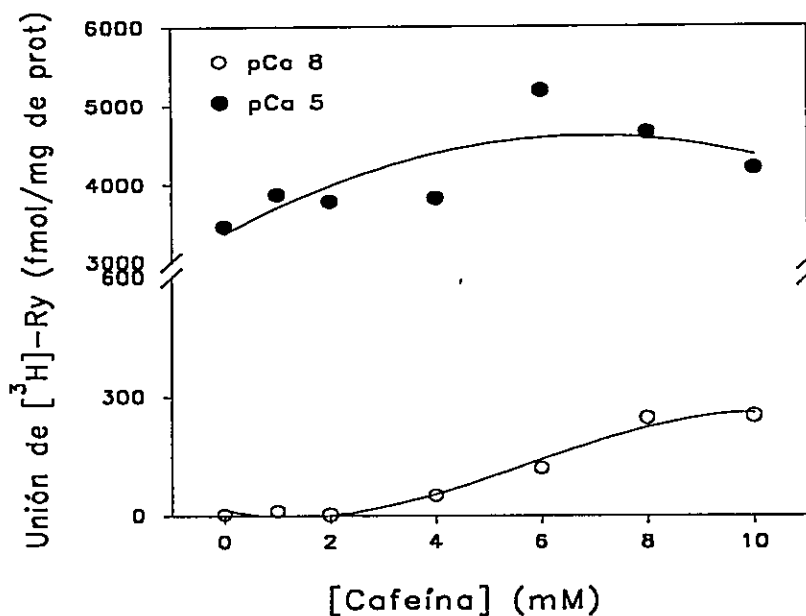


Figura 17: Efecto de concentraciones crecientes de cafeína en la unión de $[^3\text{H}]\text{-Ry}$ a membranas de músculo esquelético de conejo. La unión fue expresada como unión específica en fmol/mg de proteína. Los valores controles fueron: 2,8 fmol/mg de proteína a pCa8 y 3449 fmol/mg de proteína a pCa 5. Los valores máximos fueron: 252 y 5180 fmol/mg de proteína a pCa 8 y pCa 5 respectivamente. El experimento se realizó en presencia de 4 nM de $[^3\text{H}]\text{-Ry}$.

dependencia al calcio de la unión de [³H]-Ry a la fracción P3-2 presentó una constante de activación no significativamente distinta ($K_{0,5} = 1,11 \pm 0,12 \mu\text{M}$, $n = 4$) al de la fracción P3-3 aunque las uniones totales a pCa 5 son aproximadamente la mitad de ellas. Ya que la población de receptores de las dos fracciones más enriquecidas en RyR no difieren significativamente en sus constantes de afinidad por [³H]-Ry y en su sensibilidad al calcio de la unión, los experimentos de canal único se realizaron exclusivamente con la fracción P3-3 que está más enriquecida en RyR. Esto permitió mejorar la probabilidad de fusión de los canales de interés.

2 Registro y caracterización de los canales asociados a los RyR

2.1 Uso de metanosulfonato de cesio.

Los experimentos en bicapas se realizaron con la subfracción P3-3 usando cesio como ion permeante. Los registros con cesio (Fill et al, 1990; Sitsapesan y Williams, 1994) presentan una serie de ventajas con respecto a los registros en presencia de bario o calcio. En ausencia de calcio el RyR es muy permeable a iones monovalentes como sodio, potasio y cesio y la conductancia a esos iones es mucho mayor que la de los iones divalentes. En el caso de músculo esquelético se observa una conductancia de 600 pS en NaCl 500 mM simétrico vs 91 pS en CaCl₂ 50 mM en trans (Lai et al., 1988). Esto mejora la razón señal/ruido de los registros. Además las preparaciones de

retículo endoplásmico y sarcoplasmático tienen canales de potasio y de cloruro (Ashley, 1989). El cesio bloquea a los canales de potasio disminuyendo su conductancia y el uso de metanosulfonato como anión permite eliminar los canales de cloruro de los registros. Por último el uso de iones monovalentes como portadores de corriente permite controlar con gran exactitud la concentración de calcio en las soluciones de registro.

2.2 Incorporación de canales

La probabilidad de fusión y la estabilidad de los canales en la bicapa fue baja. Las vesículas con canales se fusionaron en general después de varios minutos de agitación y muchos de ellos no fueron estables por el tiempo necesario como para terminar un experimento. Los canales observados mostraron además conductancias variables encontrándose canales de baja conductancia, (menores de 100 pS), canales de entre 100 a 180 pS y canales de conductancia mayor que 180 pS que podían llegar hasta 520 pS. (**Figura 18**). Los canales de baja conductancia (menores que 180 pS) se fusionaron con baja frecuencia y mostraron una cinética de apertura y cierre muy diferente de los canales que fueron identificados como RyR (**Figura 19**) y no se estudiaron más detalladamente. Estos podrían corresponder a canales de potasio bloqueados por cesio. Aquellos canales de conductancias mayores de 180 pS se caracterizaron por una cinética compleja cualitativamente semejante a la observada en RyR de músculo con aperturas y cierres rápidos distribuidos

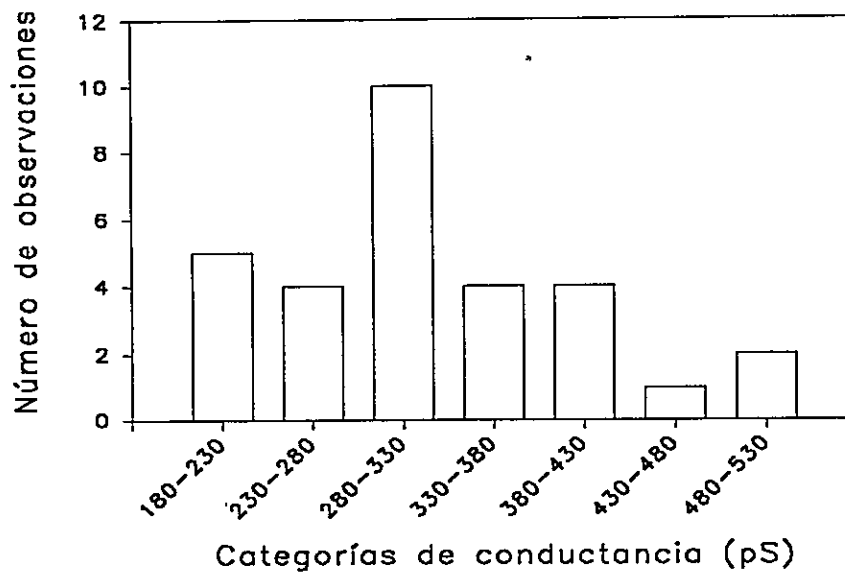
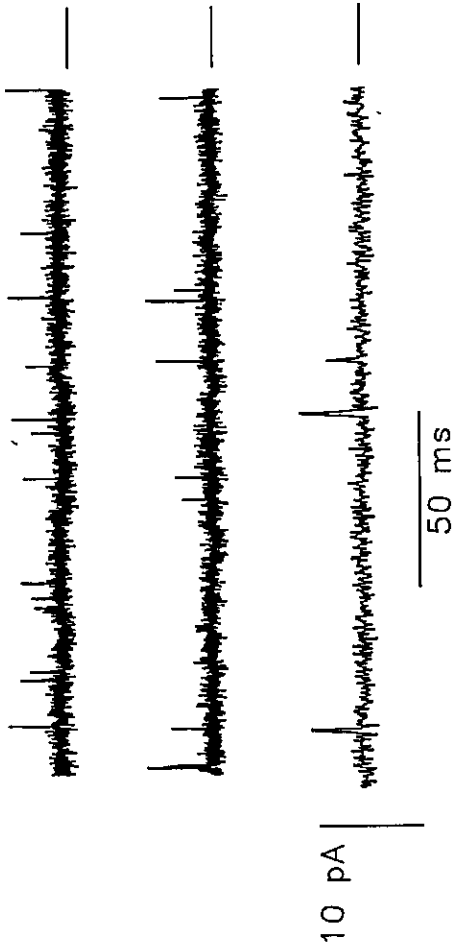
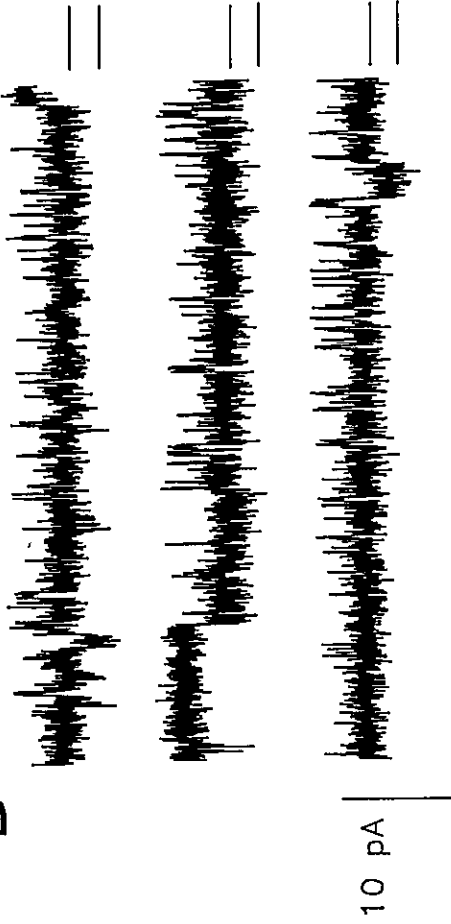


Figura 18: Distribución de conductancias. Las condiciones de registro fueron las mismas para todos los canales y están descritas en la sección métodos.

A



B



C

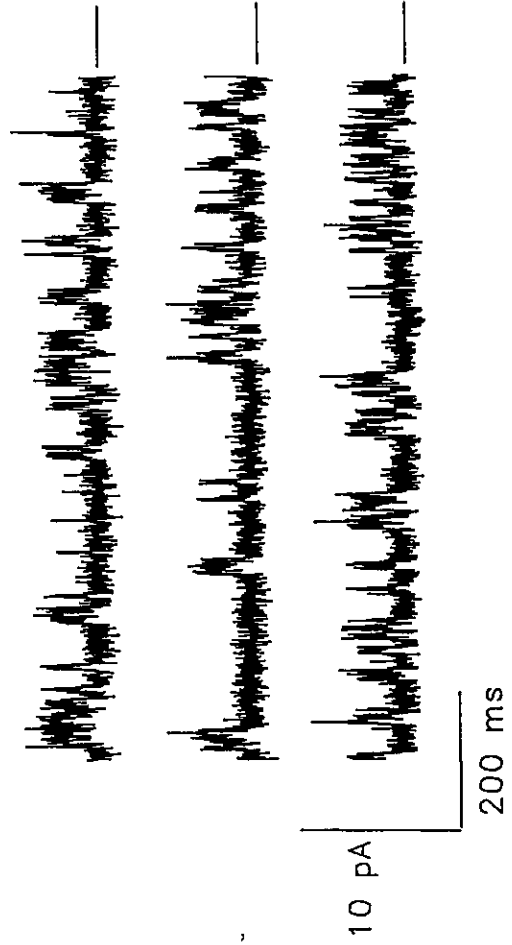
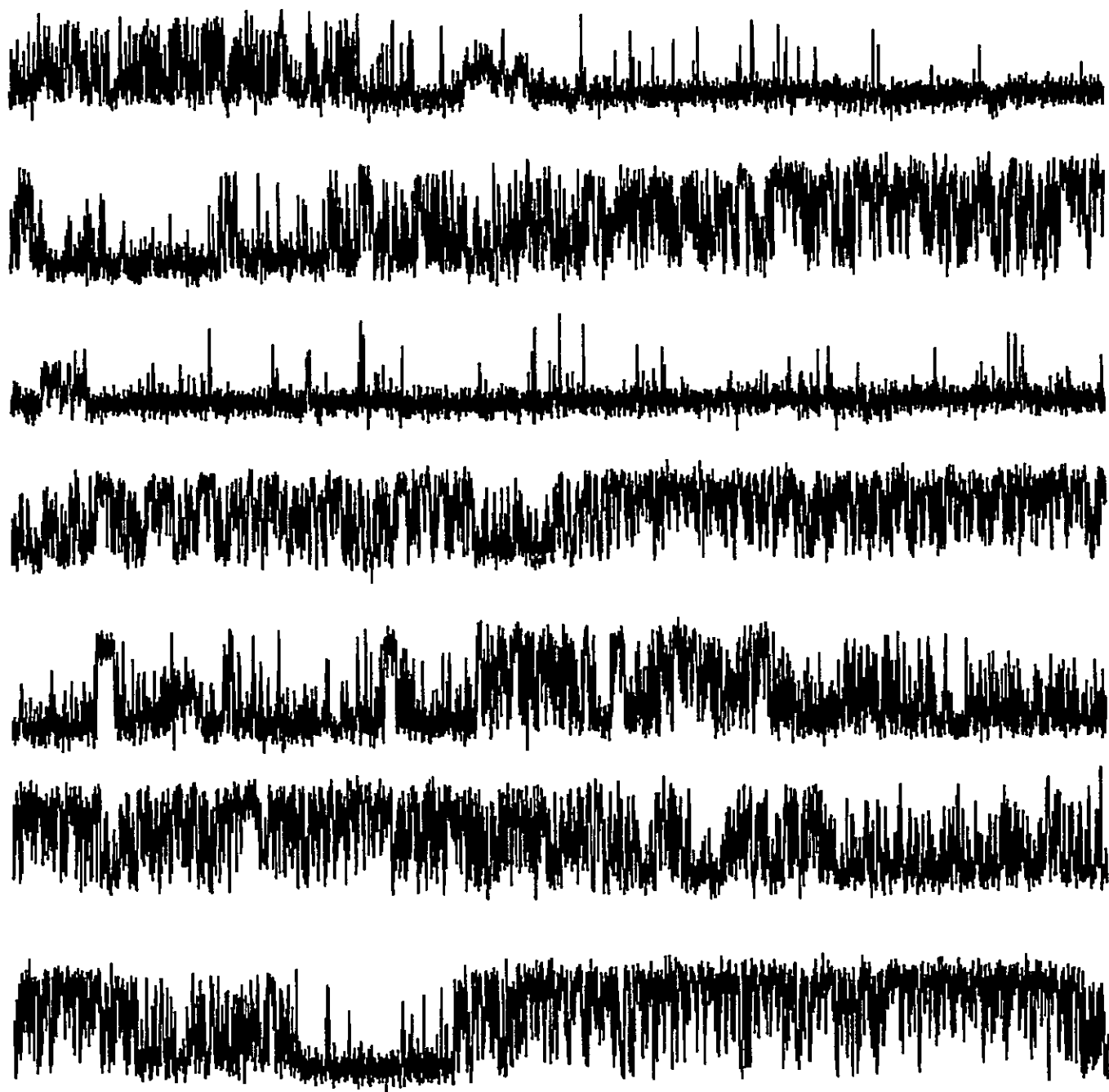


Figura 19: Registros representativos de canales de baja conductancia observados en la subfracción P3-3 de cerebelo de pollo. A) registro continuo de un canal de 75 pS registrado a +40 mV en condiciones simétricas de 400 mM CsMS y 500 μ M de calcio agregado en cis. B) registro continuo de un canal de 57 pS registrado a -50 mV en condiciones simétricas de 400 mM CsMS y 500 μ M de calcio agregado en cis. C) registro contínuo de un canal de 32 pS registrado a +70 mV en condiciones simétricas de 400 mM CsMS en presencia de calcio contaminante (10 a 20 μ M). Las marcas al lado izquierdo de los registros representan el estado cerrado.



20 pA
100 ms

Figura 20: Registro representativo de un canal de alta conductancia.

Registro continuo de segmentos de 1 segundo de un canal de alta conductancia (399 pS). Las condiciones de registro son: CsMS 400 mM, -40 mV potencial en cis, 300 μM Ca^{+2} en cis. Obsérvense los cambio evidentes de cinética, donde se intercalan períodos de baja P_o con períodos de alta P_o .

en estallidos o "bursts" de actividad separados por cierres largos (**Figura 20**). El ajuste de histogramas de tiempos abiertos y cerrados se pudo hacer con tres o cuatro constantes de tiempos cerrados y abiertos. Estos canales de alta conductancia fueron los que se caracterizaron a continuación.

2.3 Conductancia

Las conductancias se obtuvieron midiendo la amplitud de la corriente de los canales abiertos a potenciales entre -40 y +40 mV. En la **Figura 21** se muestra una curva corriente/voltaje promedio obtenida para cinco canales de alta conductancia que es lineal en ese intervalo de potenciales. Aunque no se estudió en forma detallada la relación entre fracción de tiempo abierto (P_o) y potencial transmembranal se pudo observar que a potenciales positivos los canales presentaban una menor P_o e incluso inactivación. Por ello todos los experimentos farmacológicos y de dependencia de calcio y cafeína se hicieron aplicando un potencial negativo constante (entre -20 y -40 mV) durante todo el experimento.

2.4 Efecto de R_y

Al ligarse al canal de liberación de músculo, la R_y modifica su función llevándolo a un estado de subconductancia de alrededor del 40% de la conductancia original con alta P_o (Bull et al., 1989; Rousseau et al., 1987). Esta modificación es tan característica que ha sido usada como un criterio de identificación. En el ejemplo de la **Figura 22**, se

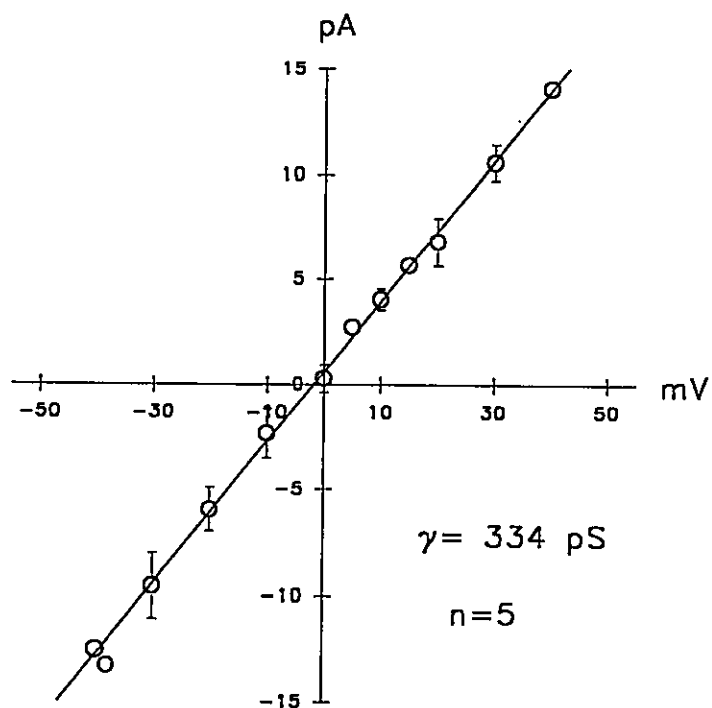


Figura 21: Relación corriente voltaje promedio de 5 canales de alta conductancia. Las condiciones de registro fueron las mismas para todos los canales y están en la sección de métodos.

180 ms
10 pA



A

180 ms
15 pA



B

Figura 22: Efecto de Ry . A) Modificación por 2 μM de Ry agregada en el lado cis en un canal de 220 pS, en presencia de CsMS 400 mM simétrico a -20 mV.
B) Modificación producida por 2 μM Ry agregada en el lado cis a un canal de 475 pS, en presencia de CsMS 400 mM simétrico a -30 mV.

muestra que la aplicación de 2 μM Ry a canales de la subfracción P3-3 produjo la modificación característica. La sensibilidad a Ry abarcó a canales de baja y de alta conductancia (**Figura 22**). Aproximadamente un 80 % de los canales observados presentaron sensibilidad a Ry y los que no fueron sensibles fueron descartados. Aunque la modificación por Ry es una característica muy específica de los RyR, ella es irreversible. Por esto la Ry se agregó sólo al final de los experimentos.

2.5 Farmacología

Los receptores de Ry de músculo esquelético y cardíaco comparten una farmacología característica que los distingue de otros canales intracelulares como el IP_3R . Se caracterizó la farmacología de los canales de alta conductancia de retículo endoplásmico de cerebelo de pollo usando agonistas conocidos de los RyR de músculo esquelético y cardíaco. La **Figura 23** ejemplifica un perfil farmacológico típico donde el canal es activado por ATP, cafeína y calcio y bloqueado por concentraciones milimolares de Mg^{+2} . Todas estas características son semejantes a la farmacología descrita para los RyR de músculo.

2.6 Selectividad:

Ya que los canales fueron incorporados y registrados empleando cesio como ion permeante, se procedió a comprobar su conductancia a iones divalentes, en presencia de CsMS 400 mM o de 40 mM de metanosulfonato de

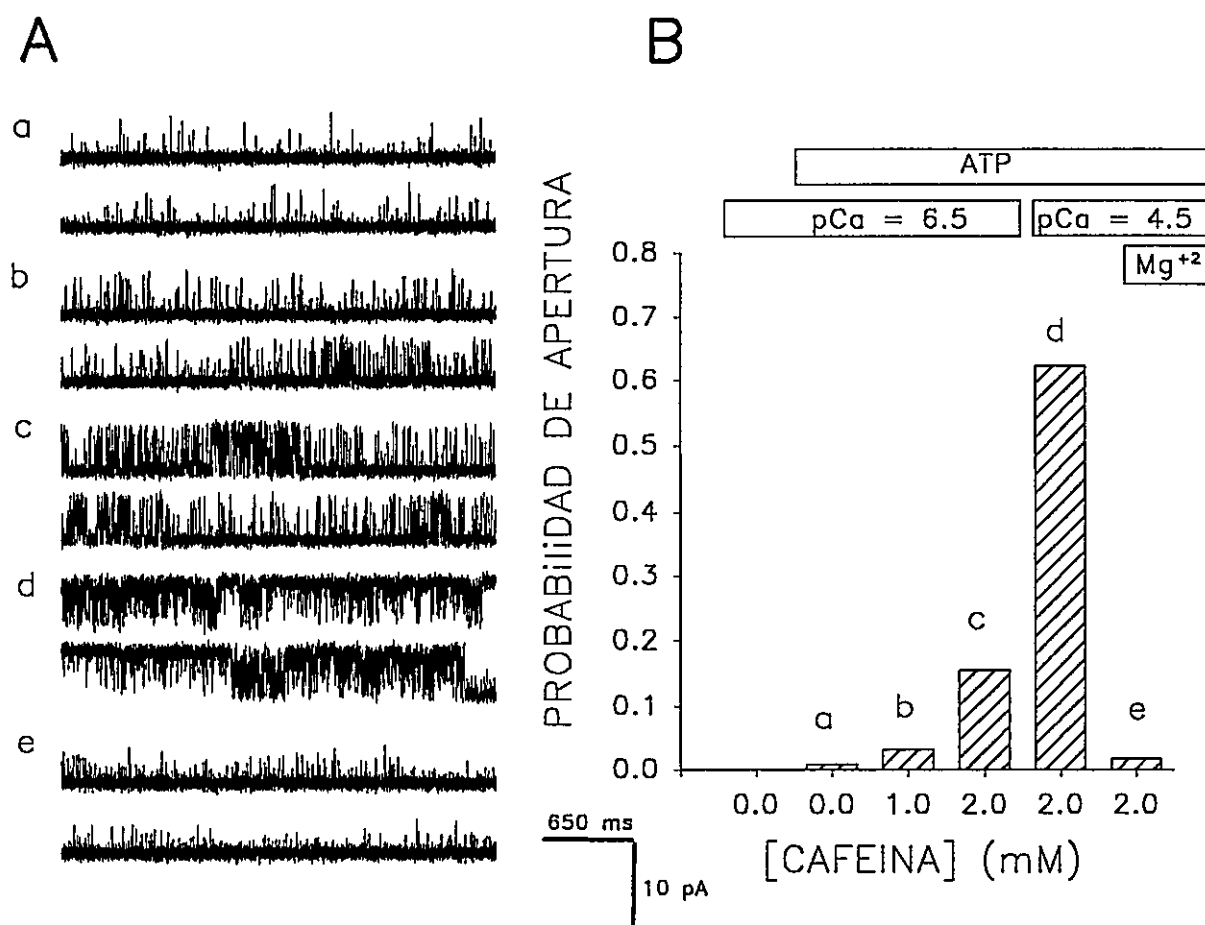


Figura 23: Farmacología de los canales de alta conductancia de la subfracción P3-3. Registros de canal único representativos de cada condición. La corriente se registró en condiciones simétricas de 400 mM de CsMS a un potencial de -20 mV. Los agonistas se agregaron en el compartimento cis en el siguiente orden a:) ATP 1mM ($P_o=0,008$), b) cafeína 1 mM ($P_o=0,03$), c) cafeína 2 mM ($P_o=0,156$), d) calcio ($P_o=0,622$) y e) magnesio 1mM ($P_o=0,017$). A pCa 6,5 y en ausencia de otros agonistas la P_o fue menor que 0,1%.

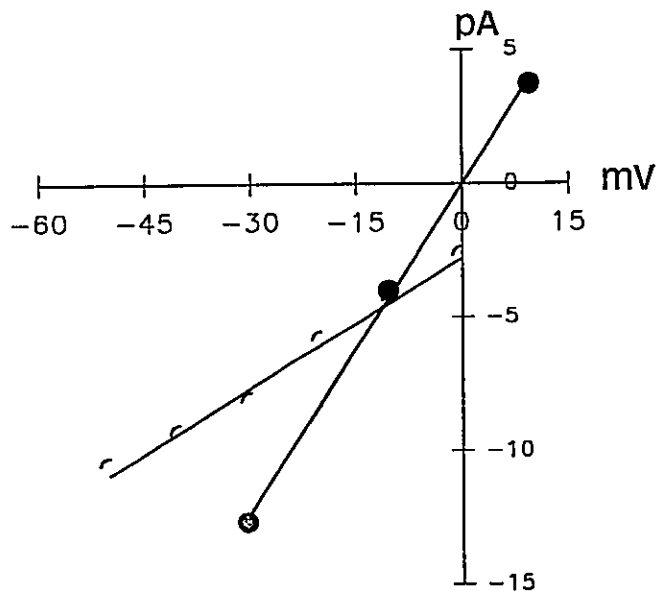


Figura 24: Comparación de curvas corriente-voltaje en presencia de cationes monovalentes y divalentes. Los símbolos llenos corresponden a la curva en condiciones simétricas de MSCs 400 mM, los símbolos vacíos corresponden a la curva en presencia de MSBa 40 mM en trans. Las conductancias son 160 pS para MSBa y 410 pS para CsMS.

bario en el compartimento trans, construyéndose curvas corriente-voltaje en ambas condiciones. En la **Figura 24** se muestra cómo cambia la pendiente de la curva I/V al cambiar la solución a BaMS. La razón de conductancias γ_{Ba}/γ_{Cs} fué de 2,6.

2.7 Efecto de agonistas sobre P_o

Los experimentos de unión de [3H]-Ry muestran que el ligamen depende fuertemente del calcio y que es independiente de cafeína. Si la relación entre aumento del ligamen y aumento de P_o se cumple en estos canales, los experimentos de canal único deberían mostrar una escasa acción de la cafeína sobre P_o y se debería observar que P_o depende claramente de calcio. Para confirmar o descartar esto se realizaron registros de varios minutos y se determinó el tiempo fraccional abierto del canal en estado estacionario a diferentes concentraciones de calcio y cafeína. Las concentraciones de calcio fueron ajustadas con los mismos tampones de calcio que se usaron para los experimentos de unión.

2.7.1 Efecto de cafeína.

A nivel de canal único la cafeína actuó como un agonista, aumentando P_o como en otras preparaciones. Este efecto fue altamente dependiente de la concentración de calcio en el lado citosólico del canal (lado cis). En la **Figura 25** se muestra el efecto de concentraciones crecientes de cafeína a distintas

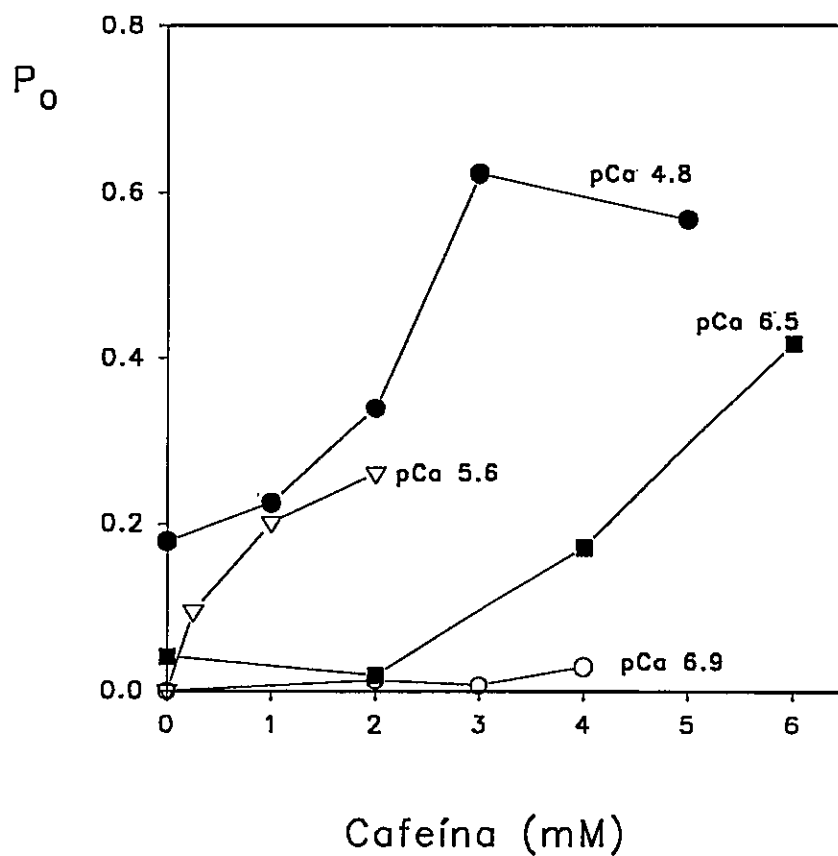


Figura 25 Efecto de la concentración de cafeína la fracción de tiempo abierto. Las distintas curvas corresponden a concentraciones de calcio distintas. Las curvas de pCa 6,9 y pCa 5,6 corresponden a un mismo experimento, las otras son experimentos distintos

concentraciones de calcio. En bajo calcio (pCa cercano a 7) la cafeína se muestra poco eficaz para aumentar la P_o del canal. A concentraciones mayores de calcio la cafeína es más efectiva como activador del canal. Esto se observa mejor en la **Figura 26** que muestra el efecto de concentraciones crecientes de calcio a concentraciones de cafeína fijas. Aquí se observa que el calcio es el principal activador del canal y que el efecto de la cafeína es dependiente del grado de activación por calcio que tiene el canal.

2.7.2 Efecto de calcio.

La sensibilidad al calcio de la activación de la P_o fue heterogénea. Los canales observados fueron clasificados sobre la base de la forma de la curva de activación por calcio en al menos dos poblaciones. Las diferencias entre las dos poblaciones se encontraron en:

- a) la constante de activación para calcio
- b) la inactivación a concentraciones de calcio mayores que $10 \mu M$ y
- c) el coeficiente de Hill.

La **Figura 27** muestra registros representativos a distintas concentraciones de calcio para un canal que mostró disminución del P_o a concentraciones de calcio mayores que $10 \mu M$. La **Figura 28** muestra un canal

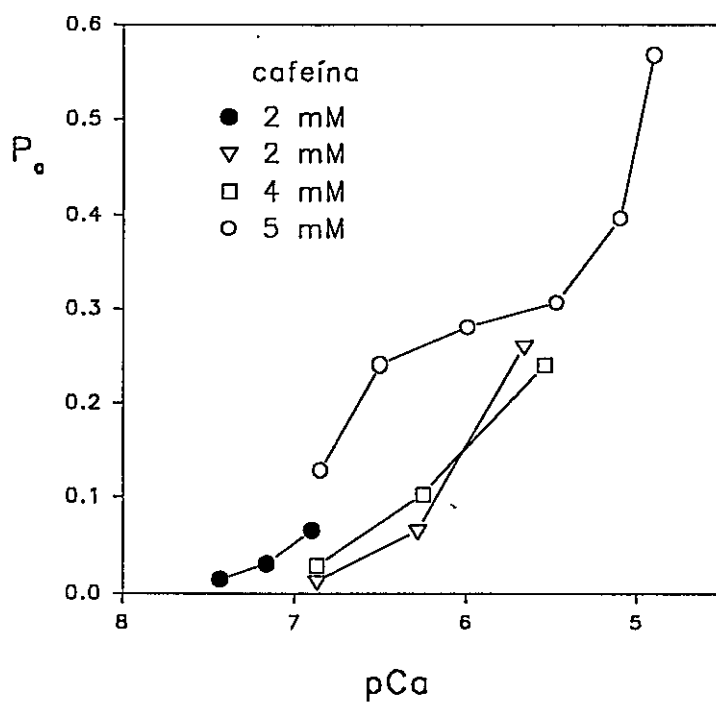


Figura 26: Efecto de calcio y cafeína en el tiempo fraccional abierto. La curva de 2 mM cafeína y de 5 mM cafeína corresponden al mismo experimento, las otras son de experimentos distintos.

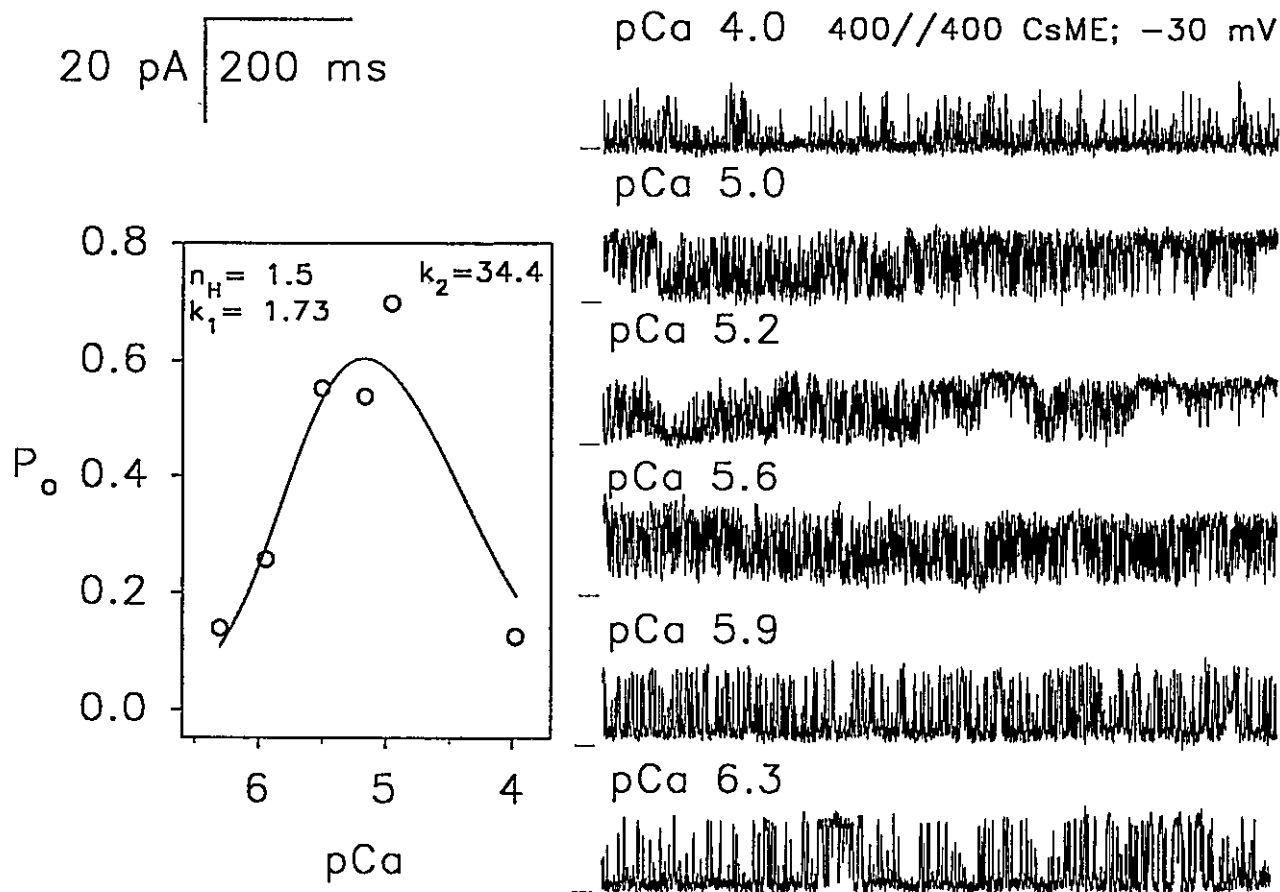


Figura 27: Efecto de calcio sobre P_o . Registros representativos del canal de tipo inactivante. El ajuste de la curva de dependencia de calcio de P_o se realizó mediante la ecuación 1. Los parámetros de ajuste se indican en la figura. Los segmentos horizontales al costado de los registros señalan el estado cerrado.

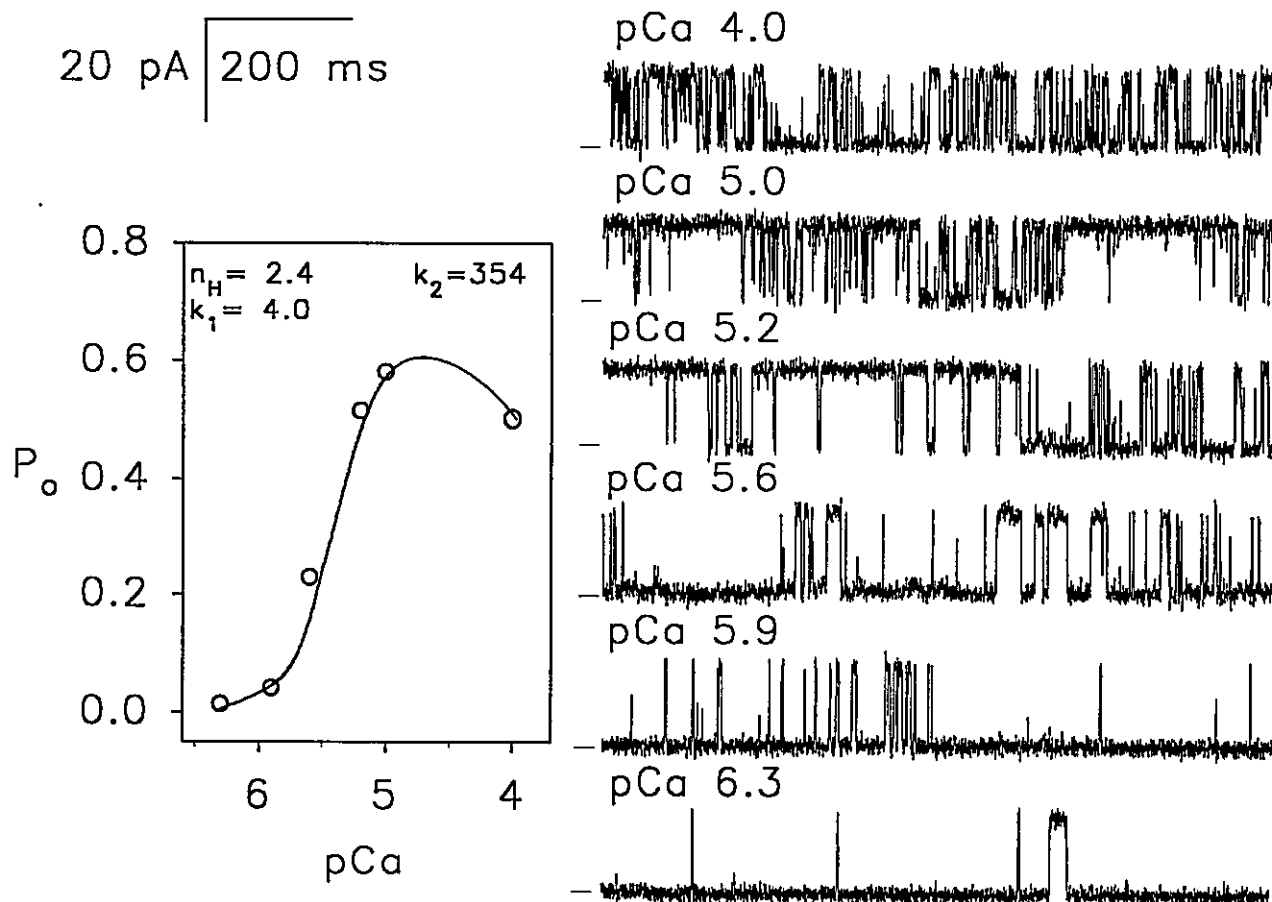


Figura 28: Efecto de calcio sobre P_o y registros representativos de un canal del tipo no inactivante. El ajuste de la curva de dependencia de calcio de la P_o se realizó mediante la ecuación 1, Los parámetros del ajuste se indican en la figura. Condiciones de registro como las de la **Figura 27**.

representativo de la otra población de canales sin inactivación a concentraciones de calcio mayores que $10 \mu\text{M}$. Se registraron también canales que no pudieron ser clasificados en ninguna de las dos poblaciones presentadas. Dos de ellos presentaron escasa dependencia del calcio y otros dos aumentaron su P_0 a muy bajas concentraciones de calcio. Las diferencias en el efecto de calcio sobre la P_0 se observan más claramente en la **Figura 29** en la que se comparan las dependencias de calcio promedio de tres a cuatro canales en cada población. Para hacerlas comparables, las P_0 se normalizaron con respecto al valor de máxima P_0 para cada experimento. En estas curvas promedio se observan las diferencias de sensibilidad al calcio de ambas poblaciones de canales, siendo la población que se inactiva a concentraciones mayores que $10 \mu\text{M}$ más sensible al calcio ($K_{0,5} = 0,86 \mu\text{M}$; $n_H = 1,3$) en comparación a la población que no se inactiva ($K_{0,5} = 3,7 \mu\text{M}$; $n_H = 2,2$).

3 *Análisis cinético del efecto de agonistas.*

En el ajuste de histogramas no condicionados de tiempos cerrados y abiertos todos los canales analizados presentaron al menos tres constantes de tiempo abiertas y tres cerradas, lo que subraya una complejidad cinética comparable a la observada en los canales RyR de músculo.

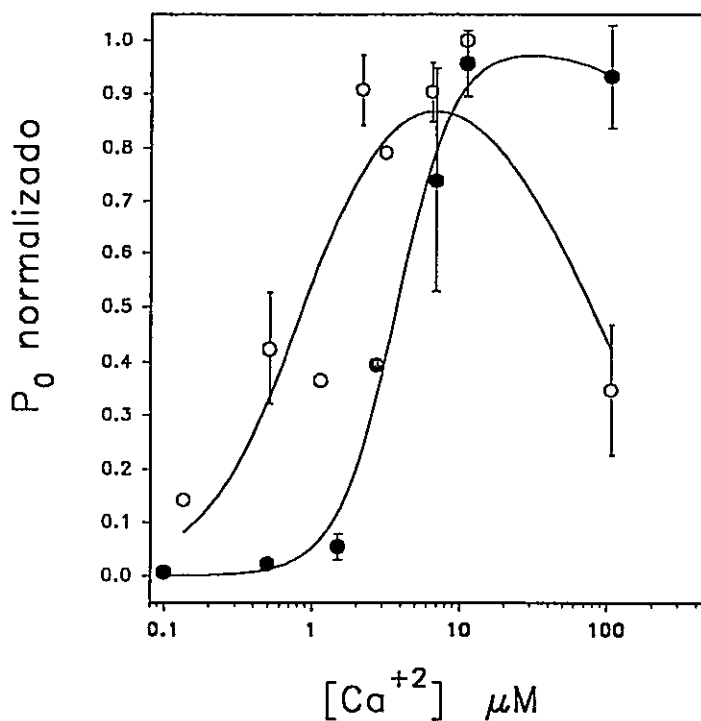


Figura 29: Efecto de calcio sobre la P_0 de los canales de tipo inactivante y no inactivante. Los valores corresponden a promedios de 3 a 4 canales en cada punto. Ya que las P_0 de apertura máximas variaron de canal a canal, se normalizó a la P_0 máxima para cada experimento. Las barras representan la desviación estándar para $n=3$ (círculos llenos) o $n=4$ (círculos vacíos).

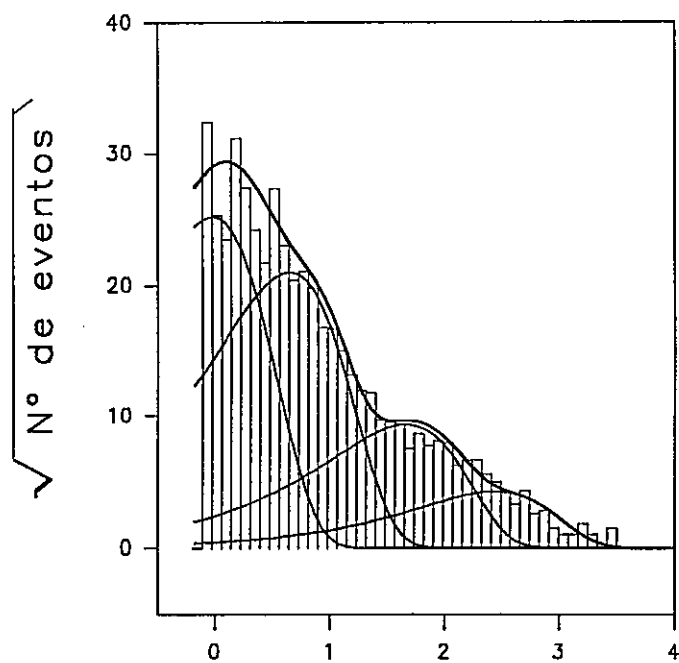
3.1.1 Efectos de calcio sobre la cinética de apertura y cierre.

Los efectos de calcio se ejemplifican con el análisis de las constantes cinéticas para el experimento de dependencia de calcio mostrado en la **Figura 28**. Los histogramas no condicionados (i.e., no seleccionados por otros criterios) de tiempos cerrados y abiertos mostrados en la **Figura 30** corresponden a registros a pCa 5,2. En este caso el mejor ajuste, de acuerdo al criterio de verosimilitud máxima, se logró con cuatro componentes exponenciales para los tiempos abiertos y cerrados (**Figura 30**).

El análisis clásico de histogramas no condicionados (**Figura 31**) a las concentraciones de calcio estudiadas muestra que el calcio afecta principalmente las constantes de tiempo cerradas. Estas disminuyen alrededor de un orden de magnitud, observándose un gran cambio a $1 \mu\text{M}$ de calcio, concentración a la cual la P_o promedio aún no muestra cambios significativos. Las constantes de tiempo abiertas sólo se afectan a concentraciones de calcio mayores que $1 \mu\text{M}$, reflejando de mejor manera los cambios que afectan a la P_o promedio.

Dado el gran número de constantes involucradas y por lo tanto la complejidad cinética del registro analizado es difícil sacar conclusiones. Este registro, analizado por los criterios descritos en la publicación de Armisén et al. (1996) muestra un comportamiento claramente modal. Es decir, presenta dos

A



B

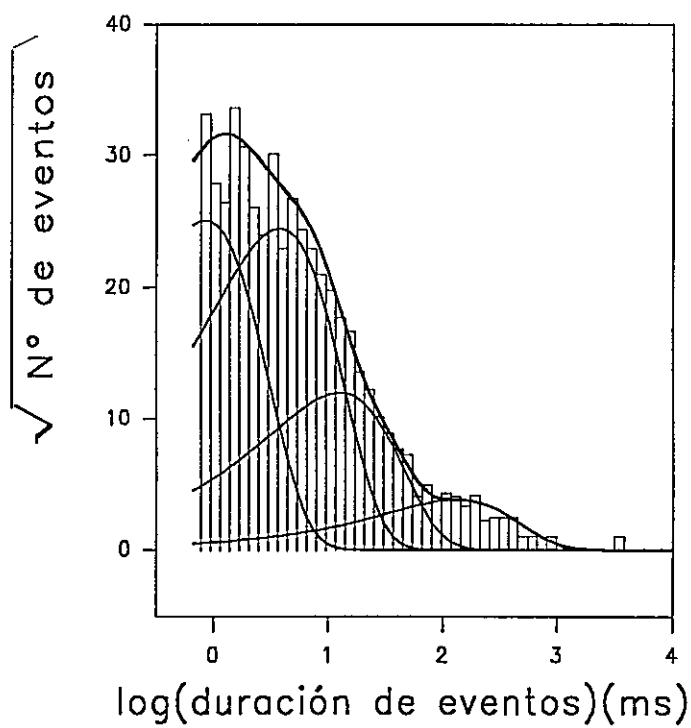


Figura 30: Histogramas no condicionados de duraciones de tiempos cerrados y abiertos para un registro típico. En cada histograma la línea continua representa el mejor ajuste a una función exponencial de cuatro componentes obtenida por el método de verosimilitud máxima. Las líneas cortadas representan cada uno de los componentes cinéticos. El número de exponenciales se determinó con un test de χ^2 con una $p < 0,01$ de acuerdo a Sigworth y Sine (1987). **A.** Distribución de tiempos abiertos de 29953 eventos con 55% contenidos en el componente de 1,1 ms, 37% en el de 5 ms, 7% en el de 52,1 ms y 1,3% en el de 317 ms. **B.** Distribución de tiempos cerrados del mismo registro con un 44% de los eventos en el componente de 0,8 ms, 43% en el de 3,8 ms, 12,7% en el de 12,7 ms y 1% en el de 144 ms. El componente predominante (en este caso 3,8 ms) fue usado para determinar el tiempo crítico.

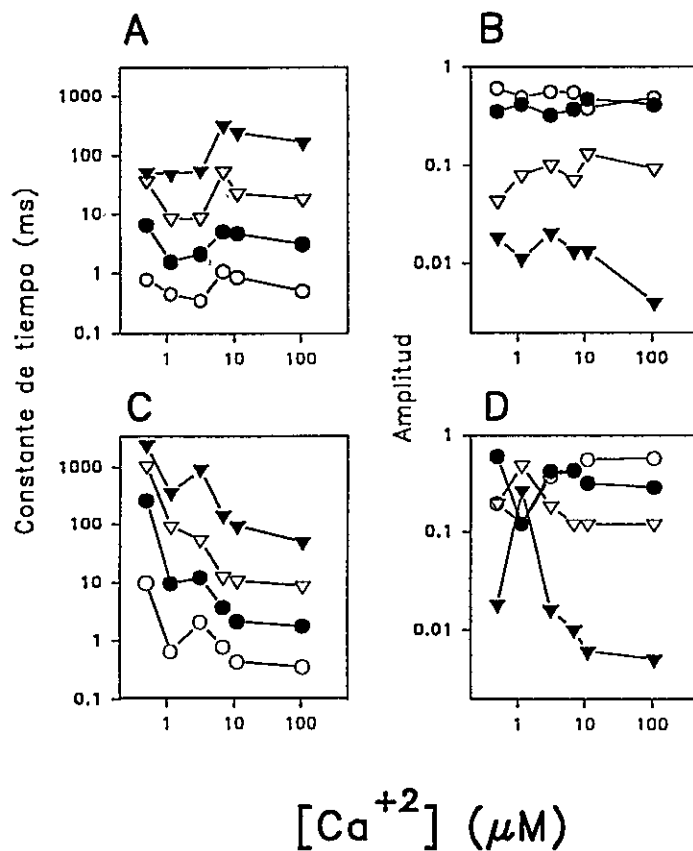
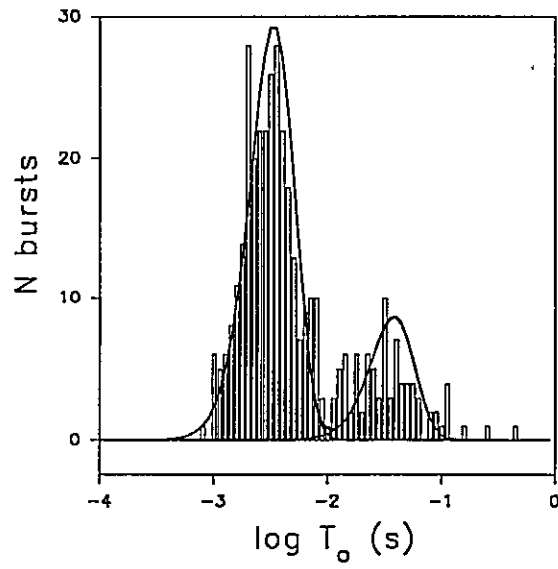


Figura 31 : Efecto de calcio en las constantes cinéticas de un canal sensible a Ry: En este ejemplo la distribución de tiempos cerrados y abiertos fue ajustada con 4 componentes, cada uno representado en la figura por un símbolo distinto. **A.** efecto de calcio en las constantes de tiempo abiertas. **B.** efecto de calcio en la amplitud relativa de las constantes de tiempo abiertas. **C.** efecto de calcio en las constantes de tiempo cerradas. **D.** efecto de calcio en la amplitud de las constantes de tiempo cerradas.

dos poblaciones de "bursts" o estallidos claramente diferenciables y separables, de alta y de baja P_0 . Este comportamiento es descrito por dos componentes en el ajuste de la distribución de tiempos abiertos promedios "intraburst". El análisis del efecto de calcio en las constantes de tiempo (τ_{gamma}) obtenidas de los ajustes de distribuciones de tiempos abiertos promedios "intraburst" (T_o) y tiempos cerrados promedios intraburst (T_c) (en el ejemplo de la **Figura 32** se muestran estos ajustes para una concentración de calcio dada) demuestra que (**Figura 33**): 1) el comportamiento modal del canal se mantiene a las concentraciones de calcio mayores de $1 \mu\text{M}$ (no fue posible analizar los experimentos a las concentraciones más baja de calcio por el escaso número de "bursts" que se obtuvieron aún con registros de 5 minutos de duración). Es decir se observan dos poblaciones de "bursts" a estas concentraciones de calcio, 2) el calcio afecta ambas constantes *gamma* abiertas, la más larga en mayor grado, presentando una dependencia al calcio de tipo campana con efectos a concentraciones de calcio mayores que $1 \mu\text{M}$. 3) la constante *gamma* cerrada es marcadamente afectada por el calcio.

Dado que las constantes de tiempo cerradas fueron las más afectadas, se analizaron adicionalmente los tiempos cerrados "interburst". Estos se ajustaron con tres componentes que se grafican en la **Figura 33**. Los efectos

A



B

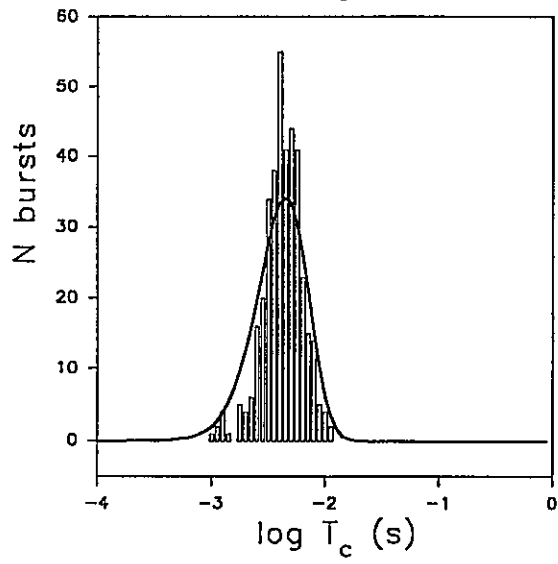


Figura 32: Ajuste de funciones *gamma* a la distribución de tiempos abiertos (A) y cerrados (B) promedios. El ajuste se realizó para todos los "bursts" de más de 5 aperturas usando el mismo registro de la **Figura 29**. Las líneas gruesas corresponden al ajuste de dos distribuciones *gamma* para el promedio de tiempos abiertos intraburst (T_o) y una distribución para el promedio de tiempos cerrados intraburst (T_c). Los ajustes que se hicieron por criterio de verosimilitud máxima generaron las constantes de 3,6 y 40,6 ms para la distribución de T_o y 4,7 ms par la distribución de T_c .

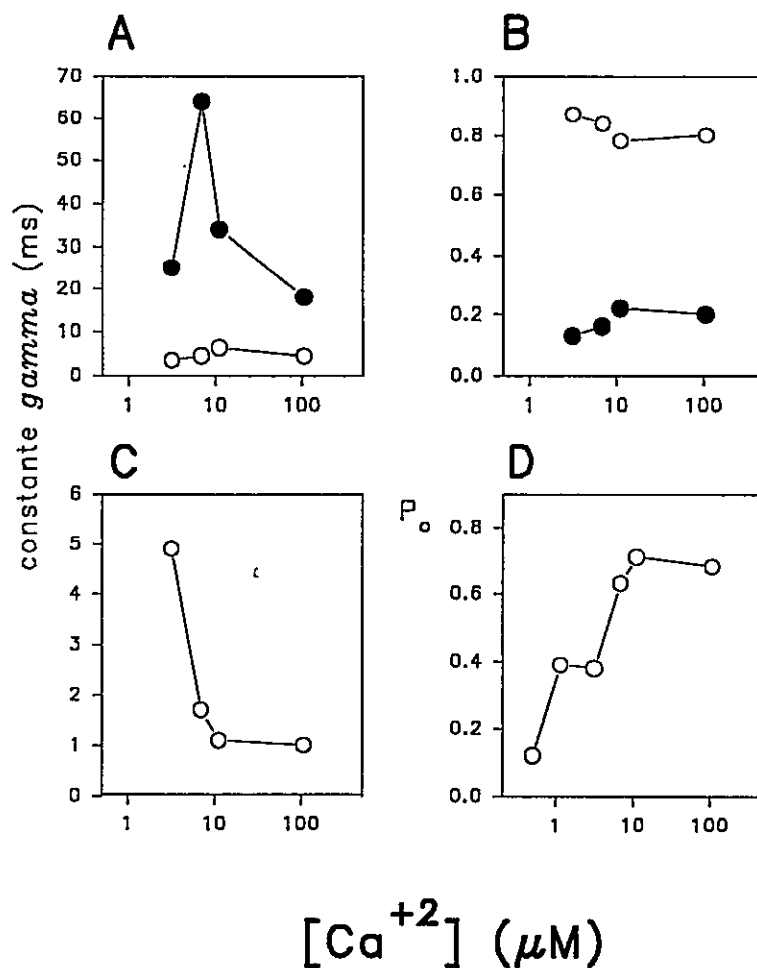


Figura 33: Efecto de calcio en las constantes de tiempos abiertos y cerrados promedios "intraburst". A) efecto de calcio en las constantes de tiempos abiertos promedio "intraburst". B) efecto de calcio en las amplitudes relativas de las constantes de tiempos abiertos promedio "intraburst". C) efecto de calcio en la constante de tiempos cerrados promedio "intraburst". D) efecto de calcio en la P_0 promedio "intraburst".

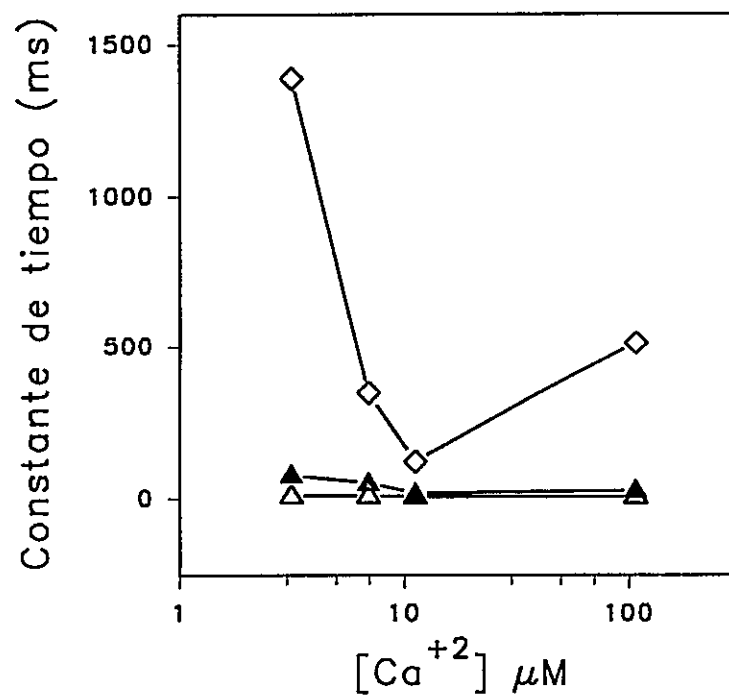


Figura 34: Efecto del calcio sobre la cinética "interburst". Los símbolos representan el resultado de ajustes por verosimilitud máxima a distribuciones de tiempos cerrados "interburst". Se observaron tres componentes cinéticos distintos, graficados cada uno con un símbolo diferente.

más claros pueden observarse en la constante de tiempos cerrados "interburst" más larga. El cambio que se puede detectar en esta constante es tal que es posible explicar el cambio en la P_0 promedio casi exclusivamente por el cambio en esta constante.

3.1.2 Efecto de cafeína

Se analizaron las constantes cinéticas para el experimento de aumento de la concentración de cafeína a pCa 4,8 mostrado previamente (**Figura 25**).

El análisis clásico de histogramas no condicionados de los efectos de cafeína, revela que las constantes de tiempo abiertos y cerrados (**Figura 35**) se afectan en grados diferentes. En el caso de las constantes de tiempo abiertas, sólo las dos mayores aumentan en función de la concentración de cafeína tanto en magnitud como en amplitud, mientras que la más pequeña no es afectada mayormente en su magnitud ni amplitud. Las constantes de tiempo cerradas, por otro lado, disminuyen en magnitud, en especial la mayor. Sin embargo la amplitud de esta última aumenta, especialmente en presencia de 5 mM de cafeína, produciéndose un resultado aparentemente contradictorio entre el aumento de constantes de tiempos abiertos larga y el aumento de tiempos cerrados largos. Esto lleva a una compensación y estabiliza la P_0 promedio que es prácticamente igual entre 3 mM y 5 mM.

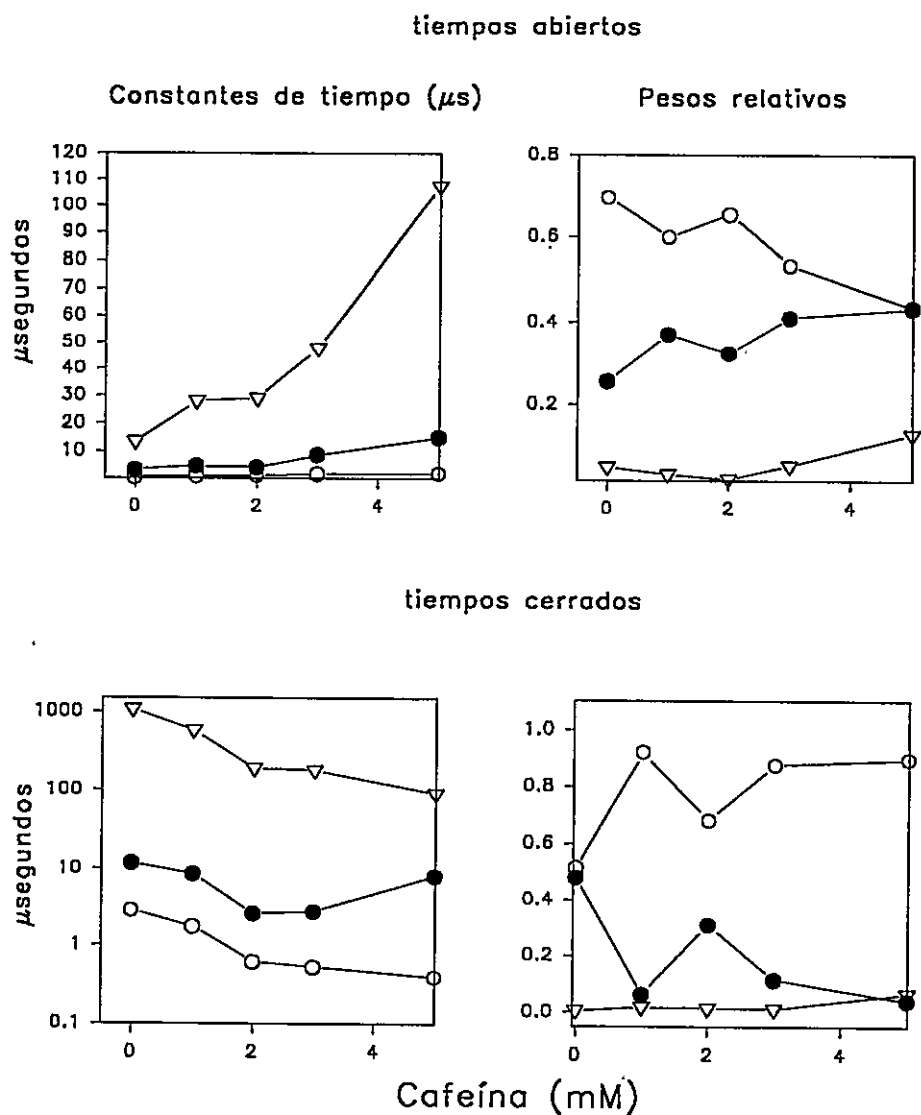


Figura 35: Efecto de la cafeína en las constantes cinéticas de un canal sensible a R_y . En este experimento las distribuciones de tiempos abiertos y cerrados fueron ajustados con tres componentes. Cada componente está representado con un signo distinto.

El análisis de las τ_{gamma} de las distribuciones de T_o y T_c muestra que (**Figura 36**): 1) este canal presenta modos, es decir presenta 2 τ_{gamma} en la distribución de T_o ; 2) ambas constantes gamma abiertas aumentan es decir ambos tipos de "burst" (de baja y de alta P_o) aumentan su P_o con la cafeína; 3) la capacidad transportadora de corriente del canal sigue aumentando entre 3 y 5 mM cafeína (**Figura 36**). Este efecto es debido a un alargamiento de los tiempos abiertos "intraburst" y a una mayor prevalencia del modo de alta P_o . Esto es, el canal se abre más veces en el modo de alta P_o que en el modo de baja P_o . Adicionalmente las constantes de tiempos abiertos promedios del modo de alta P_o y del modo de baja P_o son mayores. Los resultados de este tipo de análisis sugieren que la cafeína actúa principalmente estabilizando los estados abiertos del canal, aunque también se puede observar un efecto estabilizador sobre los cerrados "interburst" de mayor magnitud.

Lo anterior marca una diferencia importante en el modo de acción del efecto de calcio y el efecto de cafeína. En el primer caso los tiempos cerrados "interburst" son los mas afectados y en el segundo caso son los tiempos abiertos "intraburst" los principales responsables del cambio en la P_o .

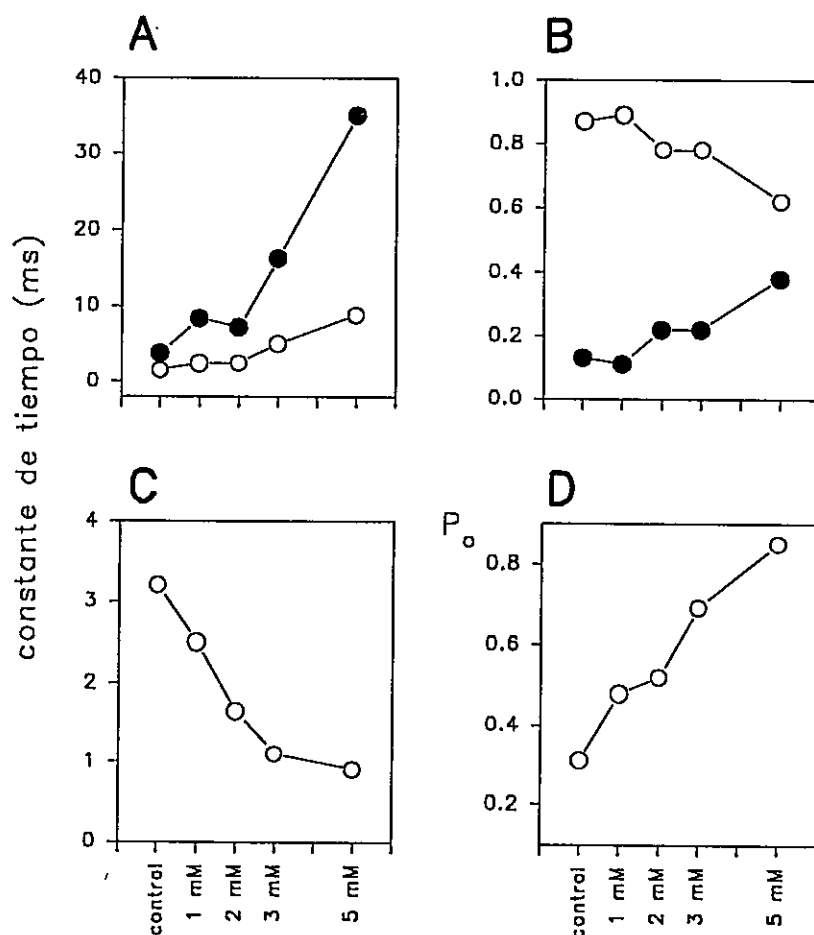


Figura 36: Efecto de cafeína en las constantes de tiempo abiertos y cerrados promedios "intraburst". A) Dependencia de cafeína de las constantes gama de tiempos abiertos promedio "intraburst" T_o . B) Peso relativo de ambas constantes C) dependencia de cafeína de la constante de tiempos cerrados promedio "intraburst" T_c . D) Dependencia de cafeína de la P_0 promedio "intraburst".

DISCUSION

En respuesta a estímulos externos, la concentración de calcio libre neuronal exhibe complejas fluctuaciones que actúan como señal iniciadora de una variedad de funciones neuronales. Aunque se acepta que en muchos casos la señal de calcio es iniciada en la neurona por la apertura de canales de la membrana plasmática dependientes de voltaje o de agonistas, en los últimos años se ha hecho evidente que los reservorios de calcio intracelular también cumplen un papel relevante en regular la complejidad y compartimentalización de esta señal (Simpson et al., 1995, revisión).

La neurona de Purkinje es una célula muy compleja entre cuyas características están la abundancia y diversidad de sus almacenes de calcio intracelulares. Ellos contienen al menos dos tipos de canales de liberación de calcio, los receptores de IP_3 y los receptores de rianodina. En esta tesis se caracterizaron los receptores de rianodina de cerebelo de pollo que en este tejido están presentes exclusivamente en las neuronas de Purkinje (Ellisman et al., 1990). Se realizó una caracterización de la unión de [3H]-Ry a su receptor y una caracterización electrofisiológica de los canales de liberación sensibles a Ry.

1. Caracterización de la preparación de membranas

Con el objetivo de obtener una preparación de membranas apropiada para los estudios bioquímicos y electrofisiológicos, se modificó un protocolo para la obtención de microsomas de cerebro (Ashley, 1989). La introducción de una homogenización suave y un gradiente de sacarosa permitieron la obtención de una fracción de membranas enriquecidas en RyR y con una mínima contaminación por membrana plasmática.

Las vesículas más ricas en RyR migraron en la interfase entre 32 % y 40 % de sacarosa. Un análisis más fino con concentraciones distintas de sacarosa muestran que esta fracción no es retenida por una densidad del 37 % de sacarosa. Esta densidad es equivalente a la que migran las fracciones de RS liviano de rana o conejo (Hidalgo et al., 1986; Rosemblat et al., 1981). Esto sugiere que el RyR en cerebelo está asociado, como en músculo, a vesículas que contienen proteínas que les confieren una alta densidad. Esta población de vesículas también está enriquecida en IP₃R pero las técnicas usadas en esta tesis no permitieron distinguir si estos receptores se encontraban en las mismas vesículas o segregados.

La distribución de los marcadores [³H]-IP₃ y [³H]-Ry corrobora los resultados de Volpe et al., (1993), que han estudiado el sistema microsomal de la neurona de Purkinje de cerebelo de pollo. Estos autores encuentran a los RyR

mayoritariamente asociados a vesículas de alta densidad y con alto contenido de calsecuestrina.

La distribución de los IP₃R en esta preparación muestra que existe una población asociada a vesículas grandes y pesadas que sedimentan con la fracción mitocondrial (P2). Esta población de vesículas con alto contenido de IP₃R podría corresponder a la estructura de membranas descrita por Rousakov (1994) de apilamientos de sacos de membranas (membrane stacks) que tienen una estructura que les permite mantener su integridad durante la homogenización.

1.1. Geles y análisis por western blot

El análisis de los geles de poliacrilamida confirma que los RyR son una proteína de baja representación en las membranas microsomales de cerebelo de pollo. Cálculos simples a partir de la unión máxima promedio (550 fmol/mg prot) permiten estimar que los RyR representan alrededor del 0,025 % de la proteína de la fracción P3-3. Esto dificulta la detección de las bandas de interés por tinción con azul de Coomassie e incluso por tinción con plata. Para detectar las bandas fue necesario recurrir a la técnica de detección por anticuerpos específicos (western blot). El anticuerpo utilizado es específico para la isoforma α de músculo esquelético de pollo y fue donado por el Dr. John Sutko (Percival et al 1994). La obtención de una banda positiva con este anticuerpo confirma la presencia de RyR en la fracción P3-3. No es posible determinar, sin embargo, si la isoforma encontrada es idéntica a la de músculo esquelético o si corresponde a una

isoforma nueva con inmunoreactividad cruzada con la isoforma de músculo. Aunque no pudo ser confirmada la presencia de la isoforma β en la fracción P3-3, resultados previos que demostraron la presencia de dos bandas positivas para RyR en cerebelo de pollo (Ellisman et al 1990; Ouyang et al 1993), en conjunto con el hallazgo en esta Tesis de una banda positiva para la isoforma alfa en esta fracción, sugieren la presencia de una segunda isoforma que podría ser la isoforma β . Esta conclusión se ve reforzada por los resultados de canales únicos que muestran la presencia de dos tipos de dependencia de calcio.

2. Estudios de unión de [3 H]-Ry en membranas de la fracción P3-3

2.1. Características del ligamen de [3 H]-Ry

La unión de [3 H]-Ry presentó varias características similares a las descritas previamente para los receptores de músculo esquelético y cardíaco (Meissner, 1995, revisión). Sin embargo, dada la diversidad de condiciones experimentales utilizadas es difícil comparar los parámetros obtenidos para los receptores de cerebelo con aquellos obtenidos de otras preparaciones. El tiempo medio de asociación (15,2 min) fue similar aunque menor al descrito para músculo esquelético (23,1 min; Pessah et al, 1987) que fue realizado a una menor fuerza iónica, o para músculo de rana (48,4 min) realizado a menor temperatura e igual fuerza iónica (Ogawa y Harafuji, 1990a). Esto confirma que la cinética lenta de la unión de Ry es una característica propia de este receptor.

El tiempo medio de disociación por un exceso de medio de incubación (35,7 min) también fue menor al descrito para músculo esquelético o cardíaco en condiciones de menor fuerza iónica (53,6 min esquelético, 89,1 min cardíaco, Pessah y Zimanyi, 1991). Tiempos medios de asociación y disociación menores a los descritos no son sorprendentes ya que está descrito el aumento de la velocidad de asociación y disociación por aumento de la fuerza iónica (Ogawa y Harafuji; 1990b; Padua et al., 1994). En cambio, las constantes de disociación del sitio de alta afinidad encontradas por los distintos métodos fueron similares a las descritas para músculo de rana (7 nM Ogawa y Harafuji, 1990b), músculo de conejo (7 nM, Lai et al., 1989; 16 nM, Pessah et al., 1986; 11,3 nM Michalak et al., 1988; 3,4 nM Zimanyi et al 1992; 7,94 nM, Chu et al., 1990; 2,2 nM, Pessah et al., 1987; 3 nM, McGrew et al., 1989), músculo de peces (3,87 nM , O'Brien et al., 1995) y para cerebro de conejo (29,3 nM, Kawai et al 1991; 1,3 nM McPherson y Campbell, 1990) y cerebro de rata (1,7 nM, Zimanyi y Pessah, 1991b; 2,4 nM Padua et al 1994; 2,5 nM Ashley, 1989).

2.1.1. Sitios de baja afinidad para Ry.

En experimentos de saturación y de desplazamiento de Ry se pudo detectar la presencia de un segundo sitio de unión de menor afinidad. La falta de disociación desde el sitio de alta afinidad en presencia de altas concentraciones de Ry (**Figura 9**) confirmó la existencia del sitio de baja afinidad. Este experimento demostró una interacción alostérica entre los sitios de alta y baja afinidad.

Se ha demostrado la presencia de sitios de menor afinidad en los receptores de músculo esquelético y cardíaco (Bull et al., 1989; Pessah y Zimanyi, 1991; Zimanyi et al., 1992; Buck et al., 1992; Callaway et al., 1994; Carroll et al., 1991; McGrew et al., 1989; Wang et al., 1993). Los estudios de afinidad de los sitios han sugerido que cada subunidad del tetrámero tiene un único sitio de unión de alta afinidad y que estos interactúan entre sí con cooperatividad negativa. Esto produce una disminución de la afinidad de los sitios al ser sucesivamente ocupados por Ry.

Sin embargo no todos los autores coinciden en encontrar dos o más sitios en las preparaciones de cerebro. Entre ellos, Damiani et al., (1991), McPherson y Campbell (1990), Padua et al., (1991), Lai et al., (1992), McPherson et al., (1991), Zimanyi y Pessah (1991b) y Ashley (1989), encontraron sólo un sitio de alta afinidad. Por el contrario, Padua et al., (1994) encontraron un segundo sitio con K_D de 20 nM y Kawai et al. (1991), un segundo sitio con K_D de 400 nM.

Alternativamente, el hallazgo de sitios de baja afinidad en los receptores neuronales podría representar la presencia de isoformas con distinta afinidad por Ry. Sin embargo el experimento de disociación por un exceso de Ry no radioactiva demuestra una interacción alostérica entre los sitios de alta y baja afinidad y apoya la hipótesis de que estos sitios son intrínsecos a la conformación tetramérica del receptor (McGrew et al., 1989; Carroll et al., 1991; Buck et al., 1992; Pessah y Zimanyi, 1991).

En esta Tesis se encontró un segundo sitio de menor afinidad por dos métodos diferentes confirmando su presencia. Además, las diferencias en las afinidades detectadas por los dos métodos empleados, sugieren la presencia de más de un solo sitio de baja afinidad.

2.2. Efecto de la concentración de calcio en la unión de [³H]-Ry

El efecto del calcio sobre la unión de Ry es una de las características que diferencia las distintas isoformas de los RyR. Algunos autores han informado que la isoforma cardíaca es más sensible al calcio que la esquelética (Rousseau et al., 1986; Meissner y Anderson, 1988; Zimanyi y Pessah 1991; 28,7 y 52,3 μ M, Lai et al., 1992b)) pero también se han reportado sensibilidades iguales o la relación opuesta (Pessah et al., 1985; Imagawa et al., 1989; Michalak et al., 1988, Chu et al., 1993). Estos resultados contradictorios no permiten asegurar cuál de las dos isoformas de músculo de mamífero tiene una constante de activación menor para el calcio pero es aceptado en la actualidad que la isoforma de músculo cardíaco es más sensible al calcio que la isoforma esquelética.

Las diferencias pueden deberse a la diversidad de condiciones experimentales usadas, entre las que se encuentran la fuerza iónica (entre 200 mM a 1 M, KCl o NaCl), el pH (entre 7.0 y 7.4) y la presencia de agonistas que afectan la unión de Ry al receptor como Mg, ATP o análogos no hidrolizables (Mg inhibe la unión y el ATP la aumenta).

Los resultados de esta tesis obtenidos en experimentos paralelos de dependencia de calcio demuestran que los receptores de cerebelo de pollo tienen una mayor sensibilidad al calcio que los RyR de tríadas de conejo. Experimentos de unión con preparaciones de cerebro de mamífero donde se ha demostrado que la isoforma predominante es la cardíaca (Kuwajima et al., 1992; McPherson y Campbell, 1993) sugieren que ésta también es muy sensible al calcio (14 nM, Padua et al 1994; 7 μ M, Kawai et al 1991; 1,1 μ M Zimanyi y Pessah, 1991). En cerebro de mamífero, la alta sensibilidad al calcio de la unión de [3 H]-Ry de los receptores neuronales podría deberse a la alta representatividad de la isoforma cardíaca o estar relacionada con la asociación con proteínas moduladoras específicas del cerebro. Por el momento no es posible discernir entre estas dos posibilidades ya que no hay trabajos publicados en que se comparen las dependencias de calcio de estas dos preparaciones.

Si se compara las curvas de dependencia de calcio de la unión de [3 H]-Ry y de la P_o de las dos poblaciones de canales, se encuentra que la curva de la unión, que representa la dependencia de calcio de todas las poblaciones de receptores, es una sigmoide simple, no reflejando las dos distintas dependencias de calcio de la P_o de los canales. Una interpretación simple de estos resultados es suponer que la población de tipo no inactivante es la más abundante en la fracción P3-3. Otra posibilidad es que, a pesar de las evidencias que apoyan la asociación entre unión de Ry y P_o en los receptores de origen muscular, esto no se cumpla estrictamente

en receptores neuronales y que la dependencia de calcio de la unión no sea un buen reflejo de la activación por calcio del canal. Como se discute a continuación, los resultados de esta tesis apoyan esta segunda posibilidad.

2.3. Efecto de cafeína en la unión de [³H]-Ry

El efecto de cafeína sobre la unión de [³H]-Ry descrito en la literatura es el desplazamiento de la curva de activación por calcio hacia menores concentraciones (Pessah et al, 1987). Esta observación sugirió que la cafeína estimularía la unión de Ry aumentando la afinidad para calcio del sitio activador. En músculo esquelético, la cafeína en presencia de calcio óptimo aumenta también el número de sitios de unión más allá del máximo e incrementa el coeficiente de Hill para la dependencia de calcio (Ogawa, 1994; Pessah et al 1987). Se ha reportado un aumento de 15 % por cafeína 10 mM o 1 mM AMPCOOP (análogo no hidrolizable de ATP) que puede subir hasta un 33 % en presencia de ambos (Ogawa y Harafuji, 1990b).

En contraste con lo anterior los resultados con RyR cerebelar del efecto de cafeína en la unión de [³H]-Ry muestran que este agonista fue muy poco efectivo para aumentarla. Esto no fue debido a un efecto de saturación de la unión ya que a concentraciones de calcio en que la unión no estaba saturada (pCa 8), la cafeína tampoco aumentó la unión significativamente. El efecto de saturación en la unión de Ry se puede demostrar en experimentos de ligamen en baja fuerza iónica. Padua et al., (1994) trabajando en preparaciones de

cerebro completo de rata sugieren que los receptores neuronales requerirían de una fuerza iónica menor para hacer evidentes los efectos agonistas de cafeína y ATP. En nuestro caso esta interpretación no pudo confirmarse pues a baja fuerza iónica sólo se obtiene un 10% de la unión específica a 1 M KCl lo cual impide una distinción entre ligamen específico e inespecífico debida a la baja concentración total de RyR en el tejido. Otro argumento en favor de una diferencia específica en canales neuronales lo brindan los experimentos realizados en paralelo con receptores de músculo en alta fuerza iónica. Estos últimos presentaron un aumento claro de la unión de [³H]-Ry en presencia de cafeína (**figura 15**), resultado semejante al obtenido con músculo de anfibio.

Estas diferencias podrían deberse a varios factores. Se ha sugerido que el efecto de la fuerza iónica es mejorar las interacciones hidrofóbicas en el sitio de unión o en sus alrededores (Ogawa y Harafuji 1990b). Es posible que los RyR de cerebelo de pollo sean más afectados por la fuerza iónica, o en otras palabras, que las interacciones hidrofóbicas en el sitio de unión a Ry sean aquí más importantes que en los RyR de músculo. Esto implicaría que la unión de Ry a alta fuerza iónica no es un buen reflejo del grado de activación de los RyR de cerebelo de pollo.

3. Registro y caracterización de los canales asociados a los RyR

Las propiedades de los canales que se registraron en esta tesis corresponden en sus características farmacológicas y cinéticas a receptores de rianodina. Estos canales mostraron activación por ATP, cafeína y calcio y bloqueo por magnesio, propiedades características de los RyR de músculo esquelético (Meissner, 1994, revisión). La cinética de apertura y cierre mostró claras similitudes con la de los receptores de músculo (ver resultados y conclusiones de Armisén et al., 1996, en prensa). Ry (nM) generó un subestado de conductancia de alta P_o característico (Fill et al., 1991). Estas propiedades así como la unión de [3 H]-Ry demuestran que los canales registrados son canales de liberación de calcio del retículo endoplasmático de la neurona de Purkinje identificados como RyR.

3.1. Efecto de agonistas en la fracción de tiempo abierto

3.1.1. Efecto de cafeína sobre P_o

Los estudios previos que han determinado la sensibilidad a cafeína de reservorios de calcio en neuronas han llevado a postular la existencia de RyRs en esas neuronas. Sólo recientemente se ha intentado asociar los reservorios sensible a ryanodina con canales de liberación neuronales (Hernandez-Cruz et al., 1995). En este trabajo se ha demostrado la presencia de RyR sensibles a calcio y cafeína en tejido neuronal, caracterizando los efectos de la

concentración de cafeína y el efecto de la concentración de calcio en la activación por cafeína en los canales de cerebelo de pollo.

Los experimentos presentados en esta tesis demuestran que en esta preparación la cafeína a bajas concentraciones de calcio no aumenta P_o del canal por si sola. Por el contrario, el calcio actúa sinérgicamente con la cafeína aumentando su eficacia como agonista, pero sin modificar la forma de la curva de dependencia de calcio. Como se observa en la **figura 25** (activación por cafeína) la cafeína activa al canal pero solo lo hace de manera medible a concentraciones de calcio que son activadoras por si mismas. Una explicación posible para el efecto de cafeína es que **cafeína requiere que el canal esté abierto para ejercer su efecto**. Si esto es así, la eficacia de cafeína dependerá directamente de la concentración de calcio que es el agonista que efectivamente activa el canal. Esta proposición debiera reflejarse en modos de activación diferentes producidos por calcio y cafeína. Los resultados cinéticos discutidos más adelante apoyan esta proposición.

3.1.2. Efecto de calcio sobre el tiempo fraccional abierto

El efecto de calcio sobre P_o reveló una interesante heterogeneidad. Los canales pudieron clasificarse en al menos dos poblaciones de acuerdo al tipo de sensibilidad al calcio de su P_o . Estos se diferenciaron en su sensibilidad al calcio, su inactivación por calcio mayor que 100 μM y por su cooperatividad.

En receptores de músculo de vertebrados no mamíferos (rana, peces y aves) se ha asociado la existencia a nivel molecular de dos isoformas musculares de RyR, con distintas dependencias de calcio de la unión (O'Brien et al., 1995; Murayama y Ogawa, 1992) y de P_o (Percival et al., 1994; Bull y Marengo, 1993; O'Brien et al., 1995). La existencia de estas dos dependencias de calcio en cerebelo de ave, donde se ha demostrado la presencia de al menos dos isoformas de RyR (Ellisman et al., 1990; Ouyang et al., 1993), sugiere que las poblaciones de canales con una dependencia de calcio definida están compuestas por una única isoforma de RyR.

Las constantes medias de activación para las dos isoformas encontradas en esta tesis (0,86 μM y 3,7 μM) mostraron similitud con las descritas para músculo de rana (1 μM y 4,5 μM ; Bull y Marengo, 1993). Sin embargo, a diferencia de los RyR de cerebelo de ave, la población más sensible al calcio no se inactivó a altas concentraciones de calcio, mientras que la menos sensible sí lo hizo. En el caso de RyR de peces, las dos poblaciones descritas sólo difirieron en la inactivación por calcio y no en la activación que se produjo a concentraciones similares (alrededor de 1 μM ; O'Brien et al 1995). Las isoformas α y β purificadas de RyR de músculo de ave mostraron constantes de activación menores a las encontradas en RyR de cerebelo y en músculo de rana y peces. La isoforma α presentó una constante de activación cercana a 28 μM con inactivación por calcio a concentraciones milimolares. La isoforma β

presentó una constante de activación de 14 μM con una constante de inactivación de 1,4 mM. Estas constantes de activación que son menores a las observadas en canales nativos de diferentes especies sugieren, que las diferencias observadas son efecto del proceso de purificación. Por otro lado los diferentes patrones de dependencias de calcio para las distintas especies coincide con la apreciación a nivel molecular e inmunológico de una diversidad entre especies en las isoformas α y β .

En esta Tesis y gracias a la observación directa de dos poblaciones de canales clasificados por su dependencia al calcio, se puede postular que a nivel de SNC la heterogeneidad revelada por técnicas inmunológicas (Ellisman et al., 1990; Ouyang et al., 1993) tiene como correlato funcional la presencia de canales con distintas propiedades.

4. Análisis cinético del efecto de agonistas.

Los efectos de cafeína y de calcio en las constantes cinéticas en esta tesis se estudiaron analizando las constantes de tiempos abiertos y cerrados y los parámetros cinéticos de "burst" o estallidos. Se encontró que la cafeína afectó principalmente las constantes de tiempos abiertos. Los efectos observados sobre las constantes de tiempos cerrados se originaron principalmente por una disminución del número de eventos cerrados de mediana duración sin alteración del número de eventos cerrados de larga duración (excepto a 5 mM de cafeína en que hubo un aumento del número de

eventos con tiempos cerrados lentos). El análisis de tiempos cerrados promedios dentro de los "bursts" demostró que había una sola población de eventos cerrados de breve duración. Por ello se puede inferir que los eventos cerrados de mediana y larga duración corresponden a eventos que ocurren entre los "burst" y no dentro de ellos. La disminución del número de eventos cerrados "interburst" implica que la duración promedio de los "burst" aumentó. El aumento de las constantes de tiempos abiertos fue confirmado por análisis de "bursts".

Este análisis mostró la presencia de dos tipos de "burst", de alto y bajo P_o , independiente de la concentración de cafeína. Ambos mostraron un aumento en las constantes de tiempo de las distribuciones de tiempos abiertos promedios "intraburst" por efecto de cafeína. Este aumento no se saturó a la concentración en que se produjo la saturación en el valor de P_o . En otras palabras, la cafeína a todas las concentraciones estudiadas aumentó la fracción de tiempo abierto de los dos tipos de "burst" y su duración (disminución de la proporción de eventos cerrados "interburst")

El calcio produjo efectos distintos a la cafeína, disminuyendo especialmente las constantes de tiempos cerrados, siendo la constante de tiempo cerrada "interburst" más larga la más afectada. El cambio en este sólo parámetro puede explicar casi todo el efecto de calcio en P_o . A diferencia del

efecto de cafeína el aumento de P_o . "intraburst" ocurre sólo para algunas concentraciones de calcio y afecta especialmente a los "bursts" de alto P_o .

Este efecto de calcio es análogo al descrito por Sitsapesan y Williams (1990) para RyR cardíaco, (efecto principalmente a nivel de las constantes de tiempos cerrados). Sin embargo, estos autores determinaron que la cafeína tenía el mismo efecto que el calcio, resultado aparentemente contradictorio al encontrado en este trabajo. Estas diferencias podrían deberse a las características específicas del tejido y la especie, o al hecho que el análisis de "burst" realizado en esta tesis arroja información más detallada sobre las diferencias en los mecanismos de acción de estos dos agonistas.

Estos resultados indican que los efectos de cafeína y calcio que se traducen en un aumento de P_o global, no pueden ser explicados por el mismo mecanismo de activación. Nuestros resultados contradicen la hipótesis que el efecto de cafeína es aumentar la sensibilidad al calcio (Rousseau et al., 1988) ya que el calcio modifica parámetros cinéticos distintos a los que afecta la cafeína. Si la cafeína sólo aumentara la sensibilidad al calcio, esto debería verse reflejado en cambios en las mismas constantes cinéticas afectadas por calcio. Los resultados sugieren que estos agonistas están actuando en sitios distintos y afectando etapas diferentes del proceso de apertura del canal.

5. Asociación entre unión a [3H]-Ry y grado de activación del canal.

Las diferencias observadas en este trabajo en el efecto de cafeína sobre P_o y en la unión de [^3H]-Ry hacen objetable para esta preparación la hipótesis propuesta que correlaciona P_o y unión de Ry (Chu et al., 1990).

El efecto de cafeína a nivel de canal único (**Figuras 25 y 26**) es diferente al que se observa en los experimentos de ligamen presentados en esta tesis (**Figuras 14 y 16**). En primer lugar los efectos de cafeína, aún a concentración óptima de calcio no llevan el P_o del canal al 100% (saturación). Las máximas probabilidades de apertura observadas en presencia de cafeína y calcio, fueron del orden de 60%. Por otro lado, y a diferencia de los experimentos de ligamen, la cafeína fue más efectiva a altas concentraciones de calcio.

Existe consenso que la apertura del canal es un requerimiento para la unión de Ry. Sin embargo, resultados de otros autores no concuerdan con esta correlación propuesta. Ogawa y Harafuji (1990a) demostraron que la velocidad de asociación de Ry por su sitio dependía fuertemente de la temperatura con un Q_{10} de 3 y, sin embargo, que la afinidad no era tan drásticamente afectada por la temperatura. Esto sugiere dos etapas distintas para la unión de Ry a su sitio. La primera etapa sería un cambio conformacional que requiere energía (por ejemplo apertura del canal más allá de un cierto P_o) y la segunda, no dependiente de la temperatura, involucraría la unión misma con participación de interacciones de tipo hidrofóbicas (Ogawa y Harafuji, 1990a; Ogawa, 1994)

Otro dato contradictorio lo representa la dependencia de la fuerza iónica de la unión de [^3H]-Ry que se ve favorecida por un aumento en la fuerza iónica (Ogawa y Harafuji 1990 a y b; Imagawa et al., 1987, 1989; Michalak et al., 1988; Meissner y El-Hashem, 1992; Padua et al 1994, pero ver Zimanyi y Pessah, 1991). Sin embargo los canales purificados, registrados en KCl o NaCl creciente (concentraciones hasta 1M) aumentan su conductancia pero no su cinética ni P_o . (Smith et al, 1988).

Ogawa y Harafuji demostraron que en músculo de rana el efecto de KCl 1M puede ser reemplazado por NaCl o sacarosa sugiriendo que lo importante para el aumento de la unión era la osmolaridad y no la fuerza iónica. (Ogawa y Harafuji, 1990b). Esta evidencia estaría favoreciendo la hipótesis de la existencia de interacciones hidrofóbicas en el sitio de unión o en la vía para llegar a él.

En consecuencia, los resultados de esta tesis y otros trabajos no apoyan la relación directa que se ha establecido en la literatura entre P_o y unión de Ry (Chu et al., 1990) sugiriendo una mayor complejidad que podría estar dada por las interacciones hidrofóbicas que rodean el sitio de unión de Ry y que podrían ser la base de las diferencias entre las isoformas.

6. Son los RyR de cerebelo las isoformas α y β de músculo esquelético de ave?

Evidencias encontradas en esta tesis apoyan la proposición que las dos poblaciones de canales registradas en cerebelo de pollo corresponderían o serían

semejantes a las isoformas α y β de músculo esquelético de ave. Entre esas evidencias se encuentran: 1) Los canales presentaron inactivación a potenciales positivos, efecto equivalente al reportado por Percival et al., (1994) para las dos isoformas purificadas de músculo esquelético de pollo. 2) La razón de conductancias entre bario y cesio concuerda con lo reportado por la literatura para canales de músculo esquelético de pollo en condiciones equivalentes (Percival et al 1994). 3) Anticuerpos monoclonales contra la isoforma α de músculo esquelético reconocen una banda de alto peso molecular en las membranas de cerebelo de pollo.

A pesar de estas evidencias que apoyan que las isoformas que se expresan en cerebelo son semejantes a las de músculo esquelético, las dependencias de calcio y la variabilidad de las conductancias no son equivalentes. Para el caso de los canales de cerebelo no fue posible correlacionar las distintas conductancias con las dos poblaciones de dependencias de calcio de P_o como ocurre en músculo de peces. En este caso a las dos dependencias de calcio descritas es posible asociarles una conductancia diferente (O'Brien et al., 1995). Por el contrario las isoformas de músculo presentan conductancias no distinguibles entre si en presencia de K^+ (~780 pS) y de Cs^+ (450 pS). Las diferencias observadas entre los canales de músculo y los de cerebelo podrían explicarse por el hecho que se están comparando canales nativos (esta Tesis) con canales purificados (Percival et al., 1994) y la purificación podría eliminar proteínas reguladoras necesarias para la

regulación por calcio. Sin embargo no se puede descartar que las proteínas de cerebelo y de músculo sean en realidad distintas pero presenten inmunidad cruzada con las isoformas de músculo.

7. Significado funcional de la heterogeneidad molecular

Un resultado fundamental de esta tesis es revelar algunas de las bases moleculares que podrían intervenir en la formación de las elevaciones transitorias de calcio en neuronas. Las diferencias entre las dos poblaciones de canales de activación a bajas concentraciones de calcio y de inactivación a altas, hacen atractivo especular acerca de la posible función de ellas a nivel de la célula entera. Hay que tener en cuenta, sin embargo, la gran distancia que existe entre los resultados de experimentos de tipo molecular logrados en esta tesis y la complejidad de las funciones a las que se pretende asociarlos. A esto se suma, además, la escasa información que aún existe acerca de la participación de los almacenes intracelulares de calcio en la función neuronal. Tomando en cuenta estas limitaciones y usando la información que se dispone de la neurona de Purkinje y de otros sistemas análogos, es posible discutir el tipo de participación de las dos poblaciones de canales descritas en esta tesis en la función de la neurona de Purkinje. Primero se sugerirá la participación de la población de tipo no inactivante en el fenómeno de plasticidad cerebelar de LTD y después se comentará la posible existencia de ondas de calcio en la neurona de Purkinje y la participación de la población de canales de tipo

inactivante en la formación y propagación de estas ondas a nivel del soma neuronal.

7.1. Posible papel de los RyR en la depresión de larga duración (LTD)

El fenómeno de plasticidad sináptica en el cerebelo más estudiado es el LTD. Este se define como una atenuación de la conexión sináptica entre las fibras paralelas y la neurona de Purkinje que es inducida cuando las fibras paralelas y las fibras trepadoras son activadas en fase y a baja frecuencia (1-4 Hz).

Las evidencias farmacológicas y electrofisiológicas demuestran que hay tres eventos postsinápticos necesarios para la inducción de LTD en el cerebelo. 1. Entrada de calcio vía canales dependientes del potencial de la membrana plasmática (normalmente activados por la estimulación de las fibras trepadoras) 2. activación de receptores de glutamato de tipo metabotrópico (por activación de fibras paralelas) y 3. entrada de sodio por el receptor ionotrópico de glutamato (también por la activación de fibras paralelas) o por activación de canales de sodio dependientes de potencial.

Linden (1994) sugiere que los estrictos requerimientos de estos eventos en la producción de el LTD es un reflejo de la necesidad que se activen fuentes diversas de calcio tales como reservorios intracelulares, intercambiador Na/Ca y canales de calcio dependientes de potencial. Este autor sugiere que los compartimientos de calcio activados por las dos vías (fibras trepadoras y fibras

paralelas) son compartimientos subcelulares independientes. Estos podrían ubicarse en las dendritas de la neurona de Purkinje y serían independientes de aquellos presentes en las espinas dendríticas.

Es muy sugerente que en cerebelo de pollo los RyR se ubiquen en el soma y las dendritas pero no en las espinas dendríticas, a diferencia de los receptores de IP_3 que se encuentran en todos los compartimientos celulares. Esto ha sido confirmado por los experimentos de medición de liberación de calcio inducida por calcio en dendritas y soma de las neuronas de Purkinje de cerebelo de mamífero (Llano et al., 1994). Estos hallazgos sugieren la existencia de una base estructural a la proposición de Linden que considera la presencia de dos compartimientos intracelulares de calcio que se diferencian en su distribución y en su forma de activación. Esto implicaría que el compartimiento sensible a calcio presente en las dendritas debería ser activado en forma independiente y preferencialmente por las estimulación de las fibras trepadoras. Por otra parte los compartimientos sensibles a IP_3 presentes en las espinas dendríticas podrían ser activados por la estimulación de los receptores metabotrópicos de glutamato por la estimulación de las fibras paralelas.

Esta hipótesis de activación diferencial requeriría que en el compartimiento de calcio presente en las dendritas se encontrara un receptor de Ry con propiedades tales que permitiera aumentos sostenidos y elevados de calcio como los requeridos para la inducción de LTD. Estos requisitos los

cumple el canal de tipo no inactivante encontrado en esta tesis. Esto es apoyado por el hecho que los potenciales de acción dendríticos, a diferencia de los somáticos, son producidos básicamente por canales de calcio dependientes de potencial, con escasa intervención de canales de sodio dependientes de potencial. Llano et al., (1994) comprobaron que los aumentos transitorios de calcio se hacían progresivamente mayores durante un tren de estímulos repetitivos de alrededor de 1 Hz (que es la frecuencia de descarga de las fibras trepadoras), sin un aumento en la corriente de calcio activada por potencial. Esto sugiere que este tipo de estímulo está activando la liberación de calcio inducida por calcio desde reservorios intracelulares que no son inactivados por altas concentraciones de calcio. Una proposición verificable que se desprende de esta discusión es que el canal de tipo inactivante es un canal de distribución dendrítica.

7.2. Ondas de calcio

Además de las consecuencias funcionales del patrón temporal de la elevación de la concentración citosólica de calcio, existen evidencias que la distribución espacial de los incrementos de la concentración de este catión pueden participar en la regulación diferencial de procesos celulares.

Se ha comprobado que el modo o la ruta por la cual los niveles de calcio intracelular aumentan son responsables del gatillamiento diferencial de ciertas respuestas neuronales. Por ejemplo se sabe que los aumentos de calcio muy

localizados y transitorios permiten la liberación de neurotransmisores clásicos, tales como catecolaminas, glutamato, etc., mientras que los aumentos más difusos permiten la liberación de péptidos y la generación de varias formas de plasticidad sináptica (Verhage et al., 1991 Swandula et al., 1991). Otros eventos que están relacionados con la vía de entrada de calcio son los cambios a nivel de expresión génica gatillados por la entrada de calcio, ya sea por canales dependientes de potencial o por receptores de tipo NMDA. Se ha demostrado que estas dos maneras de entrada de calcio son cinética y regionalmente distintas y que gatillan vías que permiten la expresión de genes distintos (Gallin y Greenberg, 1995, revisión).

Por otro lado, en distintos tipos celulares se ha caracterizado la generación de cambios propagados de la concentración citosólica de calcio (ondas de calcio). En células no excitables esta propagación parece ser el resultado de la activación de IP_3R (Berridge y Dupont, 1994, revisión). En neuronas, especialmente en neuronas grandes en el cerebro de ave (Ouyang et al., 1993), la presencia de RyR sugiere que estos canales serían necesarios para la transmisión de la señal del calcio desde la membrana plasmática a otras zonas neuronales. El canal de tipo inactivante descrito en esta tesis cumple las características de activación por bajo calcio e inactivación a altas concentraciones de calcio que permitirían su participación en la formación y propagación de estas ondas (ver introducción). No se puede olvidar, sin

embargo, que las neuronas de Purkinje contienen altas concentraciones de IP_3R , cuya función parece subyacer a las ondas de calcio estudiadas en muchos tipos celulares. Luego, el compartimiento de calcio liberable por IP_3 y el compartimiento de calcio liberable por calcio asociado al RyR de tipo inactivante descrito en esta tesis pueden generar estas señales. Una posibilidad es que ambos compartimientos interactúen permitiendo la formación y propagación de ondas. Entre las evidencias que apoyan la importancia de los compartimientos sensibles a RyR en el soma neuronal se cuentan: 1) la respuesta de los receptores de tipo metabotrópico disminuye con el desarrollo encontrándose que en neuronas adultas se encuentra respuesta a agonistas selectivos sólo en dendritas no en el soma (Llano et al., 1991; Yuzaki y Mikoshiba, 1992), sólo en dendritas. 2) en neuronas en cultivo inmaduras, donde la respuesta somática a la activación por quisqualato (agonista selectivo de receptores metabotrópicos) es fuerte, se demuestra que el compartimiento sensible a quisqualato es independiente del compartimiento sensible a cafeína. Así, en condiciones de ausencia de calcio extracelular y de depleción del compartimiento de calcio sensible a IP_3 por repetidas aplicaciones de quisqualato, la cafeína aún es capaz de inducir una señal de calcio. Por el contrario, cuando se ha depletado el compartimiento de calcio sensible a calcio por repetidas aplicaciones de cafeína la neurona aún responde con una señal de calcio a la aplicación de quisqualato. 3) la evidencia morfológica sugiere que

los IP_3R del soma serían en su mayoría no funcionales, específicamente aquellos que están formando los apilamientos de membrana.

En suma se demuestra que en la neurona de Purkinje no solo coexisten los receptores de Ry y los de IP_3 , dos canales de liberación de calcio activados por segundos mensajeros distintos, si no que además los RyR son heterogéneos pudiendo activarse por calcio en forma diferencial. Esta dependencia de calcio diferencial de los RyR descritos en esta tesis, sugiere que la neurona de Purkinje tendría la posibilidad de una regulación muy fina de los flujos de calcio necesarios para la función neuronal.

REFERENCIAS

Airey J.A., C.F. Beck, K. Murakami, S.J. Tanksley, T.J. Deerinck, M.H. Ellisman y J.L. Sutko. (1990). Identification and localization of two triad junctional foot protein isoforms in mature avian fast twitch skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 265: 14187-14194

Airey, J., M Grinsell, L. Jones, J. Sutko y D. Witcher. (1993). Three ryanodine receptor isoforms exist in avian striated muscles. *Biochemistry* 32, 5739-5745.

Alderson, B., y J. Feher. (1987). The interaction of calcium and ryanodine with cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* 900: 221-229.

Amundson, J. y D. Clapham. 1993. Calcium waves. *Current Opinion in Neurobiology.* 3:375-382

Anderson, K., F. Lai, Q-Y. Liu, E. Rousseau, H. Erickson, y G. Meissner. (1989). Structural and functional characterization of the purified cardiac ryanodine receptor- Ca^{2+} release channel complex. *J. Biol. Chem.* 264: 1329-1335.

Armisen, R., J. Sierralta, P. Vélez, D. Naranjo y B. Suárez-Isla. (1996) Modal gating in neuronal and skeletal muscle ryanodine-sensitive Ca^{+2} release channels. Am. J. of Physiol. en prensa.

Ashley, R. (1989). Activation and conductance properties of ryanodine-sensitive calcium channels from brain microsomal membranes incorporated into planar lipid bilayers. J. Membrane Biol. 111, 179-189.

Ashley, R., y A. Williams. (1990). Divalent cation activation and inhibition of single calcium release channels from sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. J. Gen. Physiol. 95: 981-1005.

Auerbach, A., y C. Lingle. (1986). Heterogeneous kinetic properties of acetylcholine receptor channels in *Xenopus* myocytes. J. Physiol. 378: 119-140.

Augustine, G., y E. Neher. (1992). Neuronal Ca^{2+} signalling takes the local route. Curr. Opin. Neurobiol. 2: 302-307.

Barnard, E. (1992). Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. Trend Biochem. Sci. 17: 368-374.

Barry, V.A. y T.R. Cheek. (1994) A caffeine- and ryanodine-sensitive intracellular Ca^{+2} store can act as a Ca^{+2} source and a Ca^{+2} sink in PC12 cells. *Biochem. J.* 300: 589-597.

Bennet, J.P. y H.I Yamamura. (1985). Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods. En Yamamura, H., S. Enna y M. Kuhar (editores). *Neurotransmitter receptor binding*. Raven Press, New York. capítulo 3, páginas 61-89.

Berridge, M.J. y G. Dupont. (1994). Spatial and temporal signalling by calcium. *Current Opininion in Cell Biology* 6: 267-274.

Bezprozvanny, I., J. Watras, y B. Ehrlich. (1991). Bell-shaped calcium-response curves of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ - and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351: 751-754.

Blackstone, C. S. Supattapone, y S. Snyder. (1989). Inositol phospholipid-linked glutamate receptors mediate cerebellar parallel-fiber-Purkinje-cell synaptic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4316-4320.

Brorson, J., D. Bleakman, S. Gibbons, and R. Miller. (1991). The properties of intracellular Ca^{2+} stores in cultured rat cerebellar neurons. *J. Neurosci.* 11: 4024-4043.

Buck, E., I. Zimanyi, J.J. Abramson y I.N. Pessah. (1992). Ryanodine stabilizes multiple conformational states of the skeletal muscle calcium release channel. *J. Biol. Chem.* 267: 23560-23567

Bull R., J.J. Marengo, B.A. Suárez-Isla, P. Donoso, J.L. Sutko, C. Hidalgo. (1989). Activation of calcium channels in sarcoplasmic reticulum from frog muscle by nanomolar concentrations of ryanodine. *Biophys. J.* 56:749-756.

Bull, R. y J.J. Marengo. (1993). Sarcoplasmic reticulum release channels from frog skeletal muscle display two types of calcium dependence. *FEBS Letters* 331: 223-227.

Bylund, D. y H.Yamamura. (1990). Methods for receptor binding. En *Methods in neurotransmitter receptor analysis*. Yamamura, H. S. Enna y M. Kuhar (editores). Raven Press. New York. capítulo 1 páginas 1-35.

Callaway, C., A., Seryshev, J-P. Wang, K. Slavik, D. Needleman, C. Cantu III, Y. Wu, Th. Jayaraman, A. Marks, y S. Hamilton. (1994). Localization of high and low affinity [³H]Ryanodine binding sites on the skeletal muscle Ca²⁺ release channel. *J. Biol. Chem.* 269: 15876-15884.

Carroll, S., J. Gómez-Skarmeta, X. Yu, K. Collins, y G. Inesi. (1991) Interdependence of ryanodine binding, oligomeric receptor interactions, and Ca^{2+} release regulation in junctional sarcoplasmic reticulum. *Arch. Biochem. Biophys.* 290: 239-247.

Coronado R., J. Morissette, M. Sukhareva y D. Vaughan. (1994). Structure and function of ryanodine receptors. *Am. J. Physiol* 266 (Cell Physiol. 35): C1485-C1504.

Cheek, T., M. Berridge, R. Moreton, K. Stauderman, M. Murawsky, y M. Bootman. (1994). Quantal Ca^{2+} mobilization by ryanodine receptors is due to all or none release from functionally discrete intracellular stores. *Biochem. J.* 301: 879-883.

Chu, A., M. Díaz-Muñoz, M. Hawkes, K. Brush, y S. Hamilton. (1990). Ryanodine as a probe for the functional state of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Molecular Pharmacol.* 37: 735-741.

Chu A, M. Fill, E. Stefani y M.L. Entman. (1993). Cytoplasmic Ca^{2+} does not inhibit the cardiac muscle sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor Ca^{2+} channel, although Ca^{2+} -induced Ca^{2+} inactivation of Ca^{2+} release is observed in native vesicles. *J. Membr. Biol.* 135: 49-59.

Damiani, E., G. Tobaldin, P. Volpe, y A. Margreth. (1991). Quantitation of ryanodine receptor of rabbit skeletal muscle, heart and brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 175: 858-865.

Ellisman, M., Th. Deerinck, Y. Ouyang, C. Beck, S. Tanksley, Ph. Walton, J. Airey, y J. Sutko. (1990). Identification and localization of ryanodine binding proteins in the avian central nervous system. *Neuron* 5: 135-146.

Endo, M., M. Tanaka y Y. Ogawa. (1970). Calcium induced release of calcium from sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature* 228: 34-36.

Fairhurst, A., y W. Hasselbach. (1970). Calcium efflux from heavy sarcotubular fraction: effects of ryanodine, caffeine, and magnesium. *Eur. J. Biochem.* 13: 504-509.

Fairhurst, A. (1973). Effect of ryanodine on skeletal muscle reticulum calcium adenosine triphosphatase (CaATPase) *Biochem. Pharmacol.* 22: 2815-2827.

Fill M., R. Coronado, J.R. Mickelson, J. Vilven, J. Ma, B.A. Jacobson y CF. Louis. (1990). Abnormal ryanodine receptor channels in malignant hyperthermia. *Biophys. J.* 50:471-475.

- Fill, M., R. Mejía-Alvarez, F. Zorzato, P. Volpe, y E. Stefani. (1991). Antibodies as probes for ligand gating of single sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channels. *Biochem. J.* 273: 449-457.
- Franzini-Armstrong, C. (1970). Studies of the triad. I. Structure of the junction in frog twitch fibers. *J. Cell Biol.* 47: 488-499.
- Franzini-Armstrong, C. (1975). Membrane particles and transmission at the triad. *Fed Proc.* 34: 1382-1389.
- Fleischer, S., E. Ogunbunmi, M. Dixon, y E. Fleer. (1985). Localization of Ca^{2+} release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7256-7259.
- Freil D. y R. Tsien. (1992) Phase-dependent contributions from Ca^{+2} entry and Ca^{+2} release to caffeine-induced $[\text{Ca}^{+2}]_i$ oscillations in bullfrog sympathetic neurons. *Neuron* 8:1109-1125.
- Furuichi, T., S. Yoshikawa, A. Miyawaki, K. Wada, N. Maeda, y K. Mikoshiba. (1989). Primary structure and functional expression of the inositol 1,4,5-trisphosphate-binding protein P_{400} . *Nature* 342:23-38.

- Furuichi, T., D. Furutama, Y. Hakamata, J. Nakai, H. Takeshima y K. Mikoshiba. (1994). Multiple types of ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J. Neurosci.* 14: 4794-4805.
- Gallin, W.J. y M.E. Greenberg. (1995). Calcium regulation of gene expression in neurons: the mode of entry matters. *Current Opinion in Neurobiology.* 5:367-374.
- Ghez, C. (1991). The Cerebellum. En Kandel, E., J. Schwartz y T. Jessell (editores). *Principles of neural Science.* Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York. Capítulo 41, pag. 626-630.
- Ghosh, A. y M. Greenberg. (1995) Calcium signaling in neurons: Molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268:231-247.
- Gyorke S.P. y M. Fill. (1993). Ryanodine receptor adaptation: control mechanisms of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in heart. *Science* 260: 807-809.
- Gyorke S.P., P. Velez, B.A. Suárez-Isla y M. Fill. (1994). Activation of single cardiac and skeletal ryanodine receptor channels by flash photolysis of caged Ca^{2+} . *Biophys. J.* 66: 1879-1886.

- Hakamata Y., J. Nakai, H. Takeshima y K. Imoto. (1992). Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS lett.* 312: 229-235.
- Henzi, V., y MacDermott. (1992). Characteristics and function of Ca^{2+} - and inositol 1,4,5-trisphosphate-releasable stores of Ca^{2+} in neurons. *Neurosci.* 46: 251-273.
- Hernández-Cruz, A., F. Sala, y P. Adams. (1990). Subcellular calcium transients visualized by confocal microscopy in a voltage-clamped vertebrate neuron. *Science* 247: 858-862.
- Hernández-Cruz, A., M. Díaz Muñoz, M. Gómez-Chaverín, R. Cañedo-Merino, D. Protti, A. Escobar, J. Sierralta, B. Suárez-Isla. (1995). Properties of the ryanodine-sensitive release channels that underlie caffeine-induced Ca^{2+} mobilization from intracellular stores in mammalian sympathetic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 7:1684-1699.
- Hess, P., J. Lansman, y R. Tsien. (1984). Different modes of Ca^{2+} channel gating behavior favoured by dihydropyridine Ca^{2+} agonists and antagonists. *Nature* 311: 538-544.

Hidalgo, C., C. Parra, G. Riquelme, y E. Jaimovich. (1986). Transverse tubules from frog skeletal muscle. Purification and properties of vesicles sealed with the inside-out orientation. *Biochi. Biophys. Acta.* 855: 79-88.

Hidalgo, C., J. Jorquera, V. Tapia, y P. Donoso. (1993). Triads and tranverse tubules isolated from frog skeletal muscle contain high levels of inositol 1,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 268: 15111-15117.

Hilgemann D., M. Delay, y G. Langer. (1983). Activation-dependent cumulative depletions of extracellular free calcium in guinea pg atrium measured with antipyrylazo III and tetramethylmurexide. *Circ. Res.* 53: 779-793.

Hillyard, I, y L Procita. (1959). The effect of ryanodine on the contractile strength of mammalian cardiac (atrial) muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 127: 22-28.

Holliday, J., R. Adams, T. Sejnowski, y N. Spitzer. (1991). Calcium-induced release of calcium regulates differentiation of cultured spinal neurons. *Neuron* 7: 787-796.

Holmberg, S., y A. Williams. (1990). The cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel: modulation of ryanodine binding and single-channel activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 1022: 187-193.

Imagawa T., J. Smith, R. Coronado y K. Campbell. (1987). Purified ryanodine receptor from muscle sarcoplasmic reticulum is the Ca^{2+} permeable pore of the calcium release channel. *J. Biol. Chem.* 262: 16636-16643.

Imagawa, T., T. Takasago, y M. Shigekawa. (1989). Cardiac ryanodine receptor is absent in type I slow skeletal muscle fibers: immunochemical and ryanodine binding studies. *J. Biochem. Tokyo* 106: 342-348.

Inui, M., A. Saito, y S. Fliescher. (1987a). Purification of the ryanodine receptor and identity with feet structures of junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum from fast skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 262: 1740-1747.

Inui, M., A. Saito, y S. Fliescher. (1987b). Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J. Biol. Chem.* 262: 15637-15642.

Ito, M. (1989). Long-term depression. *Ann. Rev. Neurosci.* 12: 85-102.

Jenden, D., y A. Fairhurst. (1969). The pharmacology of ryanodine. *Pharmacol. Rev.* 21: 1-25.

Johnston, D. (1996). The calcium code. *Biophys. J.* 70:1095.

Kaprielian, Z., A. Campbell, y D. Fambrough. (1989). Identification of a Ca^{2+} -ATPase in cerebellar Purkinje cells. *Mol. Brain Res.* 6: 55-60.

Kawai, T., y M. Watanabe. (1989) Effects of ryanodine on the spike after-hyperpolarization in sympathetic neurons of the rat superior cervical ganglion. *Pflüger's Arch.* 413: 470-475.

Kawai, T., Y. Ishii, Y. Imaizumi, y M. Watanabe. (1991). Characteristics of [^3H]Ryanodine binding to the rabbit cerebral microsomes. *Brain Res.* 540: 331-334.

Kuba K., M. Nohmi y S. Hua. (1992). Intracellular Ca^{+2} dynamics in response to Ca^{+2} influx and Ca^{+2} release in autonomic neurons. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 70: S64-72.

Kuwajima, G., A. Futatsugi, M. Ninobe, S. Nakanishi, y K. Mikoshiba. (1992). Two types of ryanodine receptors in mouse brain: skeletal muscle type exclusively in Purkinje cells and cardiac muscle type in various neurons. *Neuron* 9: 1133-1142.

Lai, F.A., H. Erickson, E. Rousseau, Q. Liu, y G. Meissner. (1988). Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature Lond.* 331: 315-319.

Lai, F.A., M. Misra, L. Xu, A. Smith, y G. Meissner. (1989). The ryanodine receptor- Ca^{2+} release channel complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 264: 16776-16785.

Lai, F.A., M. Dent, C. Wickenden, L. Xu, G. Kumari, M. Misra, H.B. Lee, M. Sar y G. Meissner. (1992). Expression of a cardiac Ca^{2+} -release channel isoform in mammalian brain. *Biochem. J.* 288, 553-564.

Lai, F., Q.-Y. Liu, L. Xu, A. El-Hashem, N. Kramarcy, R. Sealock, y G. Meissner. (1992b). Amphibian ryanodine receptor isoforms are related to those of mammalian skeletal or cardiac muscle. *Am. J. Physiol.* 263: C365-C372.

Lattanzio, F., R. Schalatterer, M. Nicar, K. Campbell, y J. Sutko. (1987). The effects of ryanodine on passive calcium fluxes across sarcoplasmic reticulum membranes. *J. Biol. Chem.* 262: 2711-2718.

Linden, D.J. (1994) Long-term synaptic depression in the mammalian brain. *Neuron* 12:457-472.

Linden, D. y J. Connor. (1993). Cellular mechanisms of long-term depression in the cerebellum. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3: 401-406.

Liu, Q.-Y., F. Lai, E. Rousseau, R. Jones, y G. Meissner. (1989). Multiple conductance states of the purified calcium release channel complex from skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* 55:415-424.

Llano, I., J. Dreesen, M. Kano, y A. Konnerth. (1991). Intradendritic release of calcium induced by glutamate in cerebellar Purkinje cells. *Neuron* 7: 577-583.

Llano, I., R. DiPolo, y A. Marty. Calcium-induced calcium release in cerebellar Purkinje cells. (1994). *Neuron* 12: 663-673.

Llinás, R. y M. Sugimori. (1980a). Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices. *J Physiol.* 305: 171-195.

Llinás, R. y M. Sugimori. (1980b). Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. *J Physiol.* 305: 197-213.

Lynch, G., J. Larson, S. Kelso, G. Barrionuevo, y F. Schottler. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Neurosci. Lett.* 84: 291-296.

Lytton, J., y S. Nigam. (1992). Intracellular calcium: molecules and pools . Curr. Opinion. in Cell Biol. 4: 220-226.

Maeda, N., M. Niinobe, K. Mikoshiba. (1990). A cerebellar Purkinje cell marker P₄₀₀ protein is an inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptor protein. Purification and characterization of InsP₃ receptor complex. EMBO J. 9:61-67.

McGrew, S., Ch. Wolleben, P. Siegl, M, Inui, y S. Fleischer. (1989). Positive cooperativity of ryanodine binding to the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from heart and skeletal muscle. Biochem. 28: 1686-1691.

McManus, O., y K. Magleby. (1988). Kinetics states and modes of a large conductance calcium-activated potassium channels in cultured rat skeletal muscle. J. Physiol. 402: 79-120.

McPherson, G.A. (1985) Kinetic, Ebdá, Ligand, Lowry. A collection of radioligand binding analysis programs. Elsevir Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.

McPherson, P. y K. Campbell. (1990). Solubilization and biochemical characterization of the high affinity [³H]Ryanodine receptor from rabbit brain membranes. J. Biol. Chem. 265: 18454-18460.

McPherson, P. Y-K. Kim, H. Valdivia, C.M. Knudson, H. Takekura, C. Franzini-Armstrong, R. Coronado, y K. Campbell. (1991). The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron* 7: 17-25.

McPherson, P. y K. Campbell. (1993). Characterization of the major brain form of the ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel. *J. Biol. Chem.* 268, 19785-19790.

Meissner, G. (1986) Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 261: 6300-6306.

Meissner, G., y J. Henderson. (1987). Rapid calcium release from cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles is dependent on Ca^{2+} and is modulated by Mg^{2+} , adenine nucleotide, and calmoduline. *J. Biol. Chem.* 262: 3065-3073.

Meissner, G., y A. El-Hashem. (1992). Ryanodine as a functional probe of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel. *Moll Cell Biochem.* 114: 119-123.

Meissner, G. (1994). Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channels and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 485-508.

Meldolesi, J., A. Villa, P. Volpe, y T. Pozzan. (1992). Cellular sites of IP_3 action. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 26: 187-208.

Michalak, M., Ph. Dupraz, y V. Shoshan-Barmatz. (1988). Ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum membrane; comparison between cardiac and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 939: 587-594.

Miyazaki, S. (1995). Inositol trisphosphate receptor mediated spatiotemporal calcium signalling. *Curr. Opinon in Cell Biol.* 7: 190-196

Moczydlowsky, E. y R. Latorre. (1983). Gating kinetics of Ca^{2+} -activated K^+ channels from rat muscle incorporated into planar lipid bilayers: evidence for two voltage-dependent Ca^{2+} binding reactions. *J. Gen. Physiol.* 82: 511-542.

Murayama T. y Y. Ogawa. (1992). Purification and characterization of two ryanodine-binding protein isoforms from sarcoplasmic reticulum of bullfrog skeletal muscle. *J. Biochem. tokyo* 112: 514-522.

Nabauer, M., G. Callewaert, L. Cleemann, y M. Morad. (1989). Regulation of calcium release is gated by calcium current, not gating charge, in cardiac myocytes. *Science* 244: 800-803.

Nakai J., T. Imagawa, Y. Hakamata, M. Shigekawa, H. Takeshima y S. Numa. (1990). Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/ calcium release channel. FEBS lett. 271: 169-177.

Nakanishi, S., G. Kwajima, y K. Mikoshiba. (1992). Immunohistochemical localization of ryanodine receptor in mouse central nervous system. Neurosci. Res. 15: 130-142.

Naranjo, D, y P. Brehm. (1993). Modal shifts in Ach. receptor channel gating confer subunit-dependent desensitization. Science 260:1811-1814.

Nguyen P., T. Abel, E. Kandel. (1994). Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. Science 265: 1104-1107.

Nori, A., A. Villa, P. Podini, D. Witcher, y P. Volpe. (1993). Intracellular Ca²⁺ stores of rat cerebellum: heterogeneity within and distinction from endoplasmic reticulum. Biochem. J. 291: 199-204.

Obenaus, A., Y. Mody, y K. Baimbridge. (1989). Dantrolene-Na (dantrium) blocks induction of long-term potentiation in hippocampal slices. Neurosci. Lett. 948: 172-178.

O'Brien, J., H. Valdivia y B. Block. (1995) Physiological differences between the α and β ryanodine receptors of fish skeletal muscle. *Biophysical J.* 68, 471-482.

Ogawa, Y., y H. Harafuji. (1990a). Effect of temperature on [3 H]Ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum from bullfrog skeletal muscle. *J. Biochem.* 107: 887-893.

Ogawa, Y., y H. Harafuji. (1990b). Osmolarity-dependent characteristics of [3 H]Ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem.* 107: 894-898.

Ogawa Y. (1994). Role of Ryanodine receptors. *Critical Rev. in Biochem. and Molec. Biol.* 29: 229-274.

Olivares E., S.J. Tanksley, J. A. Airey, C. F. Beck, Y. Ouyang, T.J. Deerinck M.H. Ellismann y J.L. Sutko. (1991). Nonmammalian vertebrate skeletal muscle express two triad junctional foot protein isoforms. *Biophys. J.* 59: 1153-1163.

Otsu, K., H. Willard, V. Khanna, F. Zorzato, N. Green, y D. MacLennan. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of rabbit cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265: 13472-13483.

Ouyang, Y., Th. Deerinck, Ph. Walton, J. Airey, J. Sutko y M. Ellisman. (1993). Distribution of ryanodine receptors in the chicken central nervous system. *Brain Res.* 620: 269-280.

Oyamada, H., T. Murayama, T. Takagi, M. Iino, N. Iwabe, T. Miyata, Y. Ogawa, y M. Endo. (1994) Primary structure and distribution of ryanodine-binding protein isoforms of the bullfrog skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 269: 17206-17214.

Padua, R., W. Wan, J. Nagy. y J. Geiger, (1991). [³H]Ryanodine binding sites in rat brain demonstrated by membrane binding and autoradiography. *Brain Res.* 542: 135-140.

Padua, R., T. Yamamoto, D. Fyda, M. Sawchuk, J. Geiger, y J. Nagy. (1992). Autoradiographic analysis of [³H]Ryanodine binding sites in rat brain: regional distribution and the effects of lesions on sites in the hippocampus. *J. Chem. Neuroanat.* 5: 63-73.

Padua, R., J. Nagy. y J. Geiger. (1994). Ionic strength dependence of calcium, adenine nucleotide, magnesium, and caffeine actions on ryanodine receptors in rat brain. *J. Neurochem.* 62: 2340-2348.

Patlak, J., K. Gration, y P. Usherwood. (1979). Single glutamate activated channels in locust muscle. *Nature* 278: 643-645.

Percival, A., A. Williams, J. Kenyon, M. Grinsell, J. Airey y J. Sutko. (1994). Chicken skeletal muscle ryanodine receptor isoforms: ion channel properties. *Biophysical Journal* 67, 1834-1850.

Pessah I., A. Waterhouse y J. Casida. (1985). The calcium-ryanodine receptor complex of skeletal and cardiac muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 128: 449-456.

Pessah I., A. Francini, D. Scales, A. Waterhouse y J. Casida. (1986). Calcium-ryanodine receptor complex. *J. Biol. Chem.* 261: 8643-8648.

Pessah I.N., R.A. Stambuck y J.E. Cassida. (1987). Ca^{2+} -activated ryanodine binding: mechanisms of sensitivity and intensity modulation by Mg^{2+} , caffeine and adenine nucleotides. *Mol. Pharmacol.* 31: 232-238.

Pessah I. y I. Zimanyi. (1991). Characterization of multiple [^3H]Ryanodine binding sites on the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal and cardiac muscle: evidence for a sequential mechanism in ryanodine action. *Molecular Pharmacol.* 39: 679-689.

Pietrobon, D., F. DiVirgilio, y T. Pozzan. (1990). Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* 193: 599-622.

Pozzan, T., R. Rizzuto, P. Volpe, y J. Meldolesi. (1994). Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol. Rev.* 74: 595-636.

Ríos, E., J. Ma, y A. Gonzalez. (1991). The mechanical hypothesis of excitation-contraction (E-C) coupling in skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 12: 127-135.

Rogers E., F. Koniuszy, J. Shavel, y K. Folkers. (1948). Plant insecticides. I. Ryanodine, a new alkaloid from *Ryana speciosa*. *J. Am. Chem. Soc.* 70:3086-3088.

Roseblatt, M., C., Hidalgo, C. Vergara y N. Ikemoto. (1981). Immunological and biochemical properties of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J. Biol Chem.* 256: 8140-8148.

Rousseau E., J.S. Smith y G. Meissner. (1987). Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca^{2+} release channel. *Am. J. Physiol.* 253 (Cell Physiol.22): C364-C368.

Rousseau E., J. Ladine, Q.-Y. Liu, y G. Meissner. (1988). Activation of the Ca^{2+} release channel of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 267: 75-86.

Rousseau E., y G. Meissner. (1989). Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -release channel: activation by caffeine. *Am J. Physiol.* 256 (Heart Circ. Physiol.): H328-H333.

Rusakov, D.A., P. Podini, A. Villa y J. Meldolesi. (1993). Tridimensional organization of Purkinje neuron cisternal stacks, a specialized endoplasmic reticulum subcompartment rich in inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J. Neurocytology.* 22: 273-282.

Satoh, T., C. Ross, A. Villa, S. Supattapone, T. Pozzan, S. Snyder, y J. Meldolesi. (1990). The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in cerebellar Purkinje cells: quantitative immunogold labeling reveals concentration in an ER subcompartment. *J. Cell. Biol.* 111: 615-624.

Seifert, J., y J. Casida. (1986). Ca^{2+} -dependent ryanodine binding site: soluble preparation from rabbit cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys. Acta* 861: 399-405.

Sigworth, F. y M. Sine. (1987). Data transformations for improved display and fitting of single channel dwell time histograms. *Biophys. J.* 57: 1047-1054.

Simpson, P., R. Challiss, y S. Nahorski. (1995). Neuronal Ca^{2+} stores: activation and function. *Trends in Neurosci.* 18: 289-327.

Sitsapesan, R., y A. Williams. (1990). Mechanisms of caffeine activation of single calcium-release channels of sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Physiol.* 423: 425-439.

Sitsapesan, R., y A. Williams. (1994). Regulation of the gating of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{+2} -release channel by luminal Ca^{+2} . *J Membr. Biol.* 137: 215-226.

Sharp, A., P. McPherson, T. Dawson, Ch. Aoki, K. Campbell, y S. Snyder. (1993). Differential immunohistochemical localization of Inositol 1,4,5-trisphosphate- and ryanodine-sensitive Ca^{2+} release channels in rat brain. *J. Neurosci.* 13: 3051-3063.

Sheperd . *The Synaptic Organization of the Brain.* Oxford University Press. 2th edition 1979. Capítulo 10.

Smith, S., y R. Nahorski. (1993). Characterization and distribution of Inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors in rat brain. *J. Neurochem.* 60: 1605-1614.

Smith, P., R. Krohn, G. Hermanson, A. Mallia, F. Gartner, M. Provenzano, E. Fujimoto, N. Goeke, B. Olson, and D. Klenk. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.

Smith, J., T. Imagawa, J. Ma, M. Fill, K. Campbell, y R. Coronado. (1988). Purified ryanodine receptor from rabbit skeletal muscle is the calcium-release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* 92: 1-26.

Sutko, J., J. Willerson, G. Templeton, L. Jones, y H. Besch.(1979). Ryanodine its alteration of cat capillary muscle contractile state and responsiveness to inotropic interventions and a suggested mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 209: 37-47

Suarez- Isla B.A., V. Iribarra, A Oberhauser, L. Larralde, R. Bull, C. Hidalgo y E. Jaimovich. (1991). Inositol (1,4,5)-Trisphosphate activates a calcium channel in isolated sarcoplasmic reticulum (SR) membranes. *Biophys. J.* 54: 737-741.

Swandulla, D., M. Hans, K. Zipser y G. Augustine. (1991). Role of residual calcium in synaptic depression and posttetanic potentiation: fast and slow calcium signalling in nerve terminals. *Neuron* 7: 1-20.

Takei, K., H. Stukenbrok, A. Metcalf, G. Mignery, T. Sudhof, P. Volpe, y P. De Camilli. (1992). Ca^{2+} stores in Purkinje neurons: endoplasmic reticulum subcompartments demonstrated by the heterogeneous distribution of the $InsP_3$ receptor, Ca^{2+} -ATPase, and calsequestrin. *J Neurosci.* 12: 489-505.

Takekuma S., S. Nishimura, T. Matsumoto, H. Ishida, K. Kangawa, N. Minamino, H. Matsuo, M. Ueda, M. Hanaoka, T. Hirose y S. Numa. (1989). Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature Lond.* 339: 439-445.

Thomas, P., y W. Almers. (1992). Exocytosis and its control at the synapse. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2: 308-311.

Tsien, R., D. Lipscombe, D. Madison, K. Bley, y A. Fox. (1989). Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* 11: 431-438.

Verhage, M., H.T. McMahon, W.E. Ghijsen, F. Boomsma, G. Scholten, V.M. Wiegant, y D.G. Nicholls. (1991). Differential release of amino acids , neuropeptides and catecholamines from isolated nerve terminals. *Neuron* 6:517-524.

Villa, A., P. Podini, D. Clegg, T. Pozzan y J. Meldolesi. 1991. Intracellular Ca^{2+} stores in chicken Purkinje neurons: differential distribution of the low affinity-high capacity Ca^{2+} binding protein, calsequestrin, of Ca^{2+} ATPase and of the ER luminal protein, BIP. *J. Cell Biology* 113: 779-791.

Villa, A., A. Sharp, G. Racchetti, P. Podini, D. Bole, W. Dunn, T. Pozzan y S. Snyder. (1992). The endoplasmic reticulum of Purkinje neuron body and dendrites: molecular identity and specializations for Ca^{2+} transport. *Neuroscience* 49:467-477.

Volpe, P., B. Alderson-lang, L. Madeddu, E. Damiani, J. Collins, y A. Margreth. (1990). Calsequestrin, a component of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store of chicken cerebellum. *Neuron* 5: 713-721.

Volpe, P., A. Villa, E. Damiani, A. Sharp, P. Podini, S. Snyder y J. Meldolesi. (1991). Heterogeneity of microsomal Ca^{2+} stores in chicken Purkinje neurons. *EMBO J.* 10, 3183-3189.

Volpe, P., A. Nori, A. Martini, R. Sacchetto y A. Villa. (1993). Multiple/heterogeneous Ca^{2+} stores in cerebellum Purkinje neurons. *Comp. Biochem. Physiol.* 105A: 205-211.

Walton, P., J. Airey, J. Sutko, C. Beck, G. Mignery, T. Sudhof, T. Deerinck, y M. Ellisman. (1991). Ryanodine and inositol trisphosphate receptors coexist in avian cerebellar Purkinje neurons. *J. Cell. Biol.* 113: 1145-1157.

Wang, J., D. Needleman, y S. Hamilton. (1993). Relationship of low affinity [3H]Ryanodine binding sites on the skeletal muscle Ca^{2+} release channel. *J. Biol. Chem.* 268: 20974-20982.

Weir, W.G. y L. Blatter. (1991). Ca^{+2} -oscillations and Ca^{+2} -waves in mammalian cardiac and vascular smooth muscle cells. *Cell Calcium* 12: 241-254.

Yuzaki, M., y K. Mikoshiba. (1992). Pharmacological and immunocytochemical characterization of metabotropic glutamate receptors in cultured Purkinje cells. *J. Neurosci.* 12: 4253-4263.

Zahradníková, A., y Y. Zahradník. (1995). Description of modal gating of the cardiac calcium release channel in planar lipid membranes. *Biophys. J.* 69: 1780-1788.

Zimanyi I. y I.N. Pessah. (1991a) Comparison of [^3H]Ryanodine receptors and Ca^{2+} release from rat cardiac and rabbit skeletal muscle sarcoplasmic. J. Pharmacol. Exp. Ther. 256: 938-946.

Zimanyi I. y I.N. Pessah. (1991b). Pharmacological characterization of the specific binding of [^3H]Ryanodine to rat brain microsomal membranes. Brain Res. 561: 181-191.

Zimanyi I. E. Buck, J. Abramson, M. Mack, y I.N. Pessah. (1992). Ryanodine induces persistent inactivation of the Ca^{2+} release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Molecular Pharmacol. 42: 1049-1057.

Zorzato, F., J. Fujii, K. Otsu, M. Philips, N. Green, F. Lai, G. Meissner, y D. MacLennan. (1990). Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 256: 2244-2256.

Zupanc, G., J. Airey, L. Maler, J. Sutko, y M. Ellisman. (1992). Immunohistochemical localization of ryanodine binding proteins in the central nervous system of gymnotiform fish. J. Comp. Neurol. 325: 135-151.