

UCH - FC
P415
c1

**CARACTERIZACION EN BICAPAS DE LA
ACTIVIDAD DE CANALES DE LIBERACION DE
CALCIO DE ANFIBIOS Y OVOCITOS DE ERIZO
DE MAR: EFECTO DE ADP-RIBOSA CICLICA**

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

Facultad de Ciencias

CLAUDIO FERNANDO PÉREZ MONTOYA

1998

DIRECTORES DE TESIS :

DRA. CECILIA HIDALGO T.

DR. RICARDO BULL S.

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACION DE TESIS DE
DOCTORADO EN CIENCIAS MENSION BIOLOGIA**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

Claudio Fernando Pérez Montoya

ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el 29 de Diciembre de 1998.

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. Cecilia Hidalgo

Dr. Ricardo Bull

Handwritten signature of Cecilia Hidalgo in blue ink, written over a horizontal line.

COMISION INFORMANTE DE TESIS:

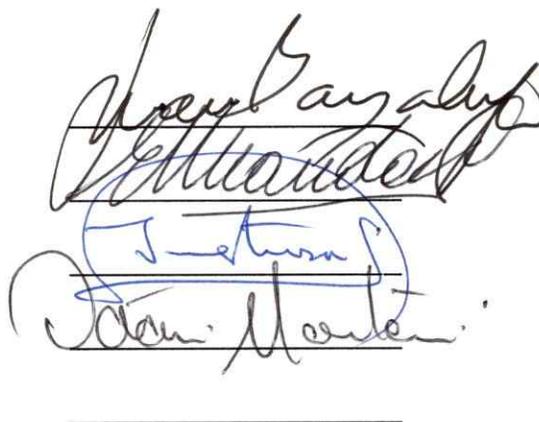
Dr. Juan Bacigalupo (Presidente)

Dr. Enrique Brandán

Dr. Nivaldo Inestrosa

Dr. Octavio Monasterio

Dr. Daniel Wolff

Handwritten signatures of the thesis committee members in blue ink, written over horizontal lines. The signatures are: Juan Bacigalupo, Enrique Brandán, Nivaldo Inestrosa, Octavio Monasterio, and Daniel Wolff.

A mis padres, mi mayor orgullo

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con el apoyo económico de los proyectos FONDECYT: 193/1053, 197/0246, 197/0914, 8980009 y el proyecto 295/0037 de termino de tesis. Adicionalmente, se contó con fondos del proyecto para término de tesis DTI (PG017) de la Universidad de Chile. Deseo agradecer a la beca CONICYT para estudiantes de doctorado, la que me permitió contar con la necesaria ayuda económica durante gran parte de mi programa de doctorado

Deseo expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, Dra. Cecilia Hidalgo y Dr. Ricardo Bull, por su constante apoyo y gran compromiso con este trabajo de tesis. Su aporte creativo y agudeza intelectual contribuyeron de forma importante a mi formación científica y profesional.

Quiero también expresar mi más sincera gratitud a todos aquellos amigos que con su constante apoyo, amistad y experiencia hicieron de estos años uno de los momentos más enriquecedores de mi vida científica y personal. Mi especial gratitud a mi amigo Juan José Marengo, y mis amigos Marianela Beltrán, Ursula Wyneken, Paulina Donoso, Genaro Barriento, Dagoberto Soto, Frits Kamp y María Angélica Carrasco. Especial mención quiero hacer al Dr. Claudio Barros quien me acogió en su laboratorio y me favorecido con su amistad y sabios consejos.

Mi más profunda gratitud y amor a mi hija Francisca y mi esposa Ana Luisa, quienes fueron mi mayor fuente de fortaleza e inspiración durante el desarrollo de este trabajo. Su paciencia y sacrificio desinteresado fueron el apoyo decisivo para que esta tesis llegara a feliz termino. Finalmente, mi recuerdo y agradecimiento a mi familia: Adolfo, Marco, Oscar, Rubén y sus hijos.

INDICE

	<i>Página</i>
- RESUMEN	I
- SUMMARY	III
- INTRODUCCION	1
- Liberación de calcio en ovocitos de erizo de mar	3
- Liberación de calcio mediada por RyR en vertebrados	6
- Moduladores farmacológicos de los RyR: Ryanodina, Cafeína, Rojo de Rutenio	7
- Modulación de los RyR por compuestos intracelulares: Calcio, Magnesio, ATP y cADPR	8
- Calcio	8
- Magnesio	9
- ATP	10
- ADP ribosa cíclica (cADPR)	10
- Receptor de cADPR	14
- Hipótesis	16
- Objetivos Específicos	16
- MATERIALES Y METODOS	17
- Preparación de microsomas de ovocitos de erizo de mar	17
- Aislamiento de vesículas de retículo sarcoplasmático de anfibio	18
- Purificación del RyR de RS de músculo esquelético de anfibio	18
- Marcación de los RyR con [³ H]-Ryanodina	18
- Solubilización de RyR de RS de anfibio	19
- Experimentos de bicapas	20
- Incorporación y registro de canales únicos	20

- <i>Adquisición y análisis de datos</i>	22
- <i>Materiales</i>	23
- <i>Abreviaciones</i>	23
- RESULTADOS	
I-CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CANALES DE	
Ca²⁺ DE MICROSOMAS DE OVOCITOS DE ERIZO DE MAR	24
- <i>Estudios de liberación de calcio en microsomas de ovocitos de erizo de mar</i>	24
- <i>Microsomas de ovocitos de erizo de mar presentan canales de Ca²⁺ sensibles a cafeína</i>	26
- <i>Efecto de cADPR sobre la actividad de los canales de calcio</i>	26
- <i>IP₃ y heparina no afectan la actividad de los canales sensibles a cADPR de ovocito de erizo</i>	28
- <i>Efecto de calmodulina y Rojo de Rutenio sobre la actividad de los canales sensibles a cADPR</i>	29
- <i>Efecto de la [Ca²⁺] citoplasmática sobre la actividad del canal sensible a cADPR</i>	30
- <i>Efecto de ATP en la actividad de los canales sensibles a cADPR</i>	31
- <i>Efecto de Mg²⁺ sobre los canales activados por cADPR</i>	32
- <i>Efecto de antagonistas de calmodulina sobre la actividad de canales sensibles a cADPR</i>	33
II-MODULACION DE LA ACTIVIDAD DE CANALES RyR	
PURIFICADOS DE MUSCULO ESQUELÉTICO DE ANFIBIO	34
- <i>Modulación de la actividad de canal de RyR purificados por la [Ca²⁺] citoplasmática</i>	34
- <i>El efecto de cADPR depende del tipo de respuesta a la [Ca²⁺] de los canales-RyR purificados</i>	35

- DISCUSION	38
I. Canales de calcio de ovocitos	38
- <i>Los canales sensibles a cADPR del ovocito de erizo no son canales activados por IP₃</i>	38
- <i>Dependencia de calcio de la actividad de los canales de ovocitos de erizo en ausencia y en presencia de cADPR</i>	39
- <i>Efecto de Mg²⁺ en la actividad de los canales de ovocitos de erizo de mar</i>	42
- <i>Comparación con los canales-RyR de vertebrados</i>	42
II. Canales de liberación de calcio RyR me músculo esquelético de anfibio	45
- <i>Los canales-RyR purificados de músculo esquelético de anfibio presentan tres tipos de dependencia de [Ca²⁺], que se modifica según el estado de oxidación del canal</i>	45
- <i>cADPR induce activación de canales-RyR purificado de músculo esquelético de anfibio</i>	46
- <i>Implicaciones fisiológicas</i>	48
- <i>Conclusiones</i>	49
- REFERENCIAS	50

RESUMEN

En condiciones fisiológicas, los cambios transitorios en la concentración de calcio celular se producen por entrada de calcio desde el medio extracelular y/o liberación de calcio desde depósitos intracelulares, principalmente del retículo endoplasmático. Se han descrito dos vías principales de liberación de calcio desde depósitos intracelulares, los canales receptores de inositol 1,4,5-trisfosfato y los canales receptores de ryanodina. Si bien existe bastante información en relación al agonista fisiológico de los canales activados por inositol 1,4,5-trisfosfato, las propiedades del activador fisiológico de los receptores de ryanodina no han sido igualmente descritas, se ha propuesto que la ADP ribosa cíclica es el activador endógeno de todos los receptores de ryanodina. En esta tesis, se evaluaron las propiedades funcionales de los canales de calcio activados por cADPR de ovocitos de erizo de mar y el efecto de este agonista sobre receptores de ryanodina purificados de músculo esquelético de anfibio. Con este fin, se fusionaron microsomas aislados de homogeneizados de ovocitos de erizo de mar en bicapas planas para analizar su actividad de canal. Los canales de ovocitos de erizo de mar activados por ADP ribosa cíclica presentaron activación por cafeína, ATP e inhibición por Rojo de Rutenio. Estos canales presentaron activación por la concentración de Ca^{2+} citoplasmático en forma de campana, caracterizada por activación e inhibición en el rango de concentraciones micromolares y milimolares, respectivamente. La activación por ADP ribosa cíclica de los canales de calcio de los ovocitos de erizo de mar fue dependiente de la presencia de calmodulina y fue modulada por la $[\text{Mg}^{2+}]$ libre. No se observó activación por ADP ribosa cíclica a bajas concentraciones de calcio ($< 1 \mu\text{M}$).

Los receptores de ryanodina purificados de músculo esquelético de anfibio presentaron tres tipos de dependencias de calcio diferentes: canales que tuvieron una baja actividad (canales tipo **Bajo P_o**) a todas las concentraciones de Ca²⁺ ensayadas, canales con dependencia de Ca²⁺ en forma de campana, tal como fue descrito originalmente en el músculo esquelético de mamífero (canales tipo **MEM**), y canales con activación de tipo cooperativo a bajas [Ca²⁺] y sin inhibición por altas [Ca²⁺] (canales tipo **C**). A [Ca²⁺] cercanas a las concentraciones de reposo solo se observó activación significativa con ADP ribosa cíclica sobre canales de calcio del tipo **MEM**. Sin embargo, los canales de calcio del tipo **Bajo P_o** fueron activados por ADP ribosa cíclica después de cambiar su dependencia de calcio al tipo **MEM** por oxidación con timerosal.

Estos resultados indican que los ovocitos de erizo de mar poseen canales de calcio que son sensibles a la activación por ADP ribosa cíclica y que presentan propiedades en común con los receptores de ryanodina de vertebrados. Mas aún, ADP ribosa cíclica activó los canales receptores de ryanodina purificados de músculo esquelético de anfibio; sin embargo, el estado redox de estos receptores determinó tanto la respuesta del canal a Ca²⁺ como la activación por ADP ribosa cíclica. Tal es así que sólo canales de anfibio con un estado de oxidación que genera una dependencia de calcio del tipo **MEM** fueron activados por ADP ribosa cíclica, observándose activación incluso a concentraciones de calcio submicromolares. Estos hallazgos indican que ADP ribosa cíclica actúa como un agonista de los canales de vertebrados sólo en ciertas condiciones de óxido reducción.

SUMMARY

Under physiological conditions, transient increments in cellular calcium concentration take place due to calcium influx from the extracellular milieu and/or calcium release from intracellular stores, primarily the endoplasmic reticulum. Two main calcium releasing pathways from intracellular stores have been described, the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and the ryanodine receptors. While significant information exists in the literature regarding the physiological agonist of inositol-1,4,5-trisphosphate activated channels, the properties of the physiological activator of ryanodine receptors have not been adequately described. The novel calcium releasing agent from sea urchin eggs, cyclic ADP ribose, has been proposed as the endogenous activator for all ryanodine receptors. In this thesis, the functional properties of cyclic ADP ribose-activated calcium channels from sea urchin eggs and its effects over purified ryanodine receptor from frog skeletal muscle were evaluated. To this end, isolated microsomes from sea urchin eggs homogenates were fused into planar lipid bilayers in order to record single channel activity. Cyclic ADP ribose-activated calcium channels from sea urchin eggs that displayed activation by caffeine, ATP and inhibition by Ruthenium Red. These channels, like the skeletal muscle ryanodine receptor, displayed activation by cytosolic Ca^{2+} concentration in a bell-shaped fashion, characterized by stimulation and inhibition in the micromolar and millimolar concentration range, respectively. Cyclic ADP ribose activation of calcium channels from sea urchin eggs was dependent on the presence of calmodulin and was modulated by free $[\text{Mg}^{2+}]$. No channel activation by cyclic ADP ribose was observed at low calcium concentrations ($< 1 \mu\text{M}$).

Ryanodine receptor purified from frog skeletal muscle displayed three different calcium dependencies: channels that had low activity (**Low P_o channels**) at all Ca^{2+} concentrations tested,

channels with bell-shaped Ca^{2+} dependence as was early described in mammalian skeletal muscle (MEM channels), and channels with cooperative stimulation at low $[\text{Ca}^{2+}]$ and lack of inhibition by high Ca^{2+} (C channels). At $[\text{Ca}^{2+}]$ near the resting concentration, only significant channel activation by cyclic ADP ribose was observed in the MEM calcium channels. However, Low P_o calcium channels became activated by cyclic ADP ribose after changing their calcium dependence to MEM by oxidation with thimerosal.

These results indicate that sea urchin eggs present cyclic ADP ribose activated calcium channels that display some properties similar to those of the vertebrate ryanodine receptors. Moreover, ryanodine receptors purified from frog skeletal muscle were activated by cyclic ADP ribose; however, the redox state of these channels determined both the channel response to Ca^{2+} and the activation induced by cyclic ADP ribose. Thus, only MEM channels were activated by cyclic ADP ribose. Furthermore, this activation was observed even at submicromolar calcium concentrations. These results indicate that only in certain channel redox states cyclic ADP ribose acts as an agonist in vertebrates.

INTRODUCCION

El ion calcio es un mensajero intracelular que controla prácticamente todo nuestro quehacer: como nos movemos, como nos late el corazón y como nuestro cerebro procesa información y la almacena en la memoria (Coronado y cols., 1994; Zucchi y Ronca-Testoni, 1997; Kuba, 1994). Los aumentos transitorios de la concentración intracelular de Ca^{2+} , que se conocen como señales de calcio, son también responsables del inicio de la vida durante la fecundación, controlan el desarrollo y la diferenciación de las células en formas especializadas (Whitaker y Swann, 1995) y están involucrados en la muerte celular (Berridge y cols., 1998). Para coordinar todas estas funciones las señales de Ca^{2+} deben ser finamente reguladas, ya que un aumento sostenido de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma es tóxico para las células.

La concentración intracelular de calcio libre ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se regula por la acción concertada de diversos y complejos mecanismos. En condiciones de reposo, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se mantiene en valores cercanos a 10^{-7} M, debido principalmente al transporte activo de Ca^{2+} hacia el medio extracelular que lleva a cabo la bomba de Ca^{2+} , y en menor grado, al transporte por el intercambiador sodio-calcio de la membrana plasmática. Contribuyen también la unión de Ca^{2+} a tampones intracelulares y la acumulación de Ca^{2+} en depósitos intracelulares como las mitocondrias y el retículo sarcoplasmático (RS) del músculo o endoplasmático (RE) de ovocitos y otros tipos celulares.

Durante la actividad celular, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ aumenta en forma transitoria dando lugar a señales de Ca^{2+} , que pueden durar desde milisegundos a minutos, y que generan los diversos efectos del Ca^{2+} sobre las funciones celulares. Estos aumentos transitorios de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ocurren debido a que ingresa Ca^{2+} desde el fluido extracelular a través de canales o transportadores de Ca^{2+} de la

membrana plasmática, o a que se libera Ca^{2+} desde depósitos intracelulares de almacenamiento. Existen, de hecho, canales selectivos a Ca^{2+} presentes en las membranas del RE o del RS (Berridge M, 1993; Furuichi y cols., 1994; Bezprozvanny y Ehrlich, 1994).

Comprender cómo las células pueden diferenciar entre las distintas señales que originan movilización de Ca^{2+} es una cuestión de importancia fundamental. Actualmente existe acuerdo en que diferentes clases de señales producirían diferentes mensajeros que actuarían a través de diferentes vías de liberación. Estudios moleculares y bioquímicos han permitido identificar y clonar dos familias de genes que codifican canales de Ca^{2+} que median la liberación desde depósitos intracelulares. Ellas son la familia de receptores de Inositol 1,4,5 trisfosfato (R-IP₃) y la familia de canales de Ca^{2+} que unen al alcaloide vegetal ryanodina, por lo que se les ha denominado receptores de ryanodina (RyR) o canales-RyR (Furuichi y col., 1994).

Las células excitables de distintas especies animales expresan diferentes isoformas de RyR y de R-IP₃, y utilizan estas dos vías de liberación con diferente preponderancia. En músculos esquelético y cardíaco la contracción se inicia por la liberación de calcio mediada por los RyR. En músculo liso y neuronas, en cambio, tanto los RyR como los R-IP₃ participan en la liberación de calcio para generar diversas respuestas celulares.

En diversos tipos celulares se ha demostrado que el mecanismo responsable de la activación fisiológica de los R-IP₃ es la unión de IP₃ al canal, el cual se genera a través de una cascada de eventos moleculares claramente determinados (Berridge, 1993; Marshall y Taylor, 1993). Por el contrario, la determinación del o los agonistas y del mecanismo fisiológico de activación de los RyR presentes en distintos tejidos es aun motivo de estudio, y no se ha establecido hasta la fecha un mecanismo común para la iniciación de la liberación de Ca^{2+} mediada por los RyR en todas las células que los expresan. Sólo en el músculo cardíaco se ha

demostrado que el mecanismo de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) causa la liberación fisiológica de Ca^{2+} desde el RS, ya que en este tejido el Ca^{2+} que ingresa desde el medio extracelular durante el potencial de acción cardíaco activa directamente los RyR presentes en el RS (Fabiato, 1983). Sin embargo, los estudios realizados en ovocitos de erizo de mar que se presentan a continuación, sugieren que los canales RyR podrían responder también a otros agonistas endógenos.

Liberación de calcio en ovocitos de erizo de mar

Durante la fecundación de los ovocitos el espermatozoide induce la propagación de ondas de liberación de Ca^{2+} intracelular, generadas principalmente por la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares, un fenómeno que se observa desde los invertebrados a los mamíferos (Jaffe, 1991). Sin embargo, se desconoce el significado de esta onda de liberación y también se desconoce cómo se genera el aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durante la fecundación. En ovocitos de erizo de mar se han identificado, además de los R-IP_3 , proteínas que son reconocidas por anticuerpos específicos contra el canal de calcio RyR1 del músculo esquelético (McPherson y cols., 1992). La presencia de RyRs en los ovocitos de erizo, unida al hecho de que las características que presentan las ondas de liberación de Ca^{2+} inducidas por fecundación son reminiscentes de la liberación de calcio inducida por calcio (CICR) observada en músculo cardíaco, apoyan la idea de que el mecanismo de CICR puede tener un papel general en la producción de señales de Ca^{2+} regenerativas en los distintos tipos celulares.

El descubrimiento de que ADP ribosa cíclica (cADPR) libera Ca^{2+} desde depósitos intracelulares de ovocitos de erizo de mar, que presentan una farmacología de liberación de Ca^{2+} similar a los RyR y distinta a los R-IP_3 , ha sustentado la hipótesis de que cADPR sería el

agonista fisiológico de los canales-RyR de ovocitos. De esta manera las dos vías de liberación de Ca^{2+} , la vía mediada por los R- IP_3 y la mediada por los RyR, estarían presentes en ovocitos de erizo de mar y se activarían en respuesta a dos agonistas distintos.

Los primeros hallazgos que indican que cADPR podría activar canales-RyR provienen de estudios de liberación de Ca^{2+} en ovocitos de erizo de mar (Clapper y cols., 1987; Lee y cols., 1989; Galione y cols., 1991; Lee, 1991). Utilizando homogeneizados crudos de estos ovocitos y fluo-3 como indicador de calcio, se demostró que $\beta\text{-NAD}^+$ induce liberación de Ca^{2+} pero en una forma retardada (Clapper y cols., 1987). Posteriormente, se demostró que este retardo se debía a la conversión enzimática de $\beta\text{-NAD}^+$ a un metabolito activo. La purificación y caracterización funcional de este metabolito, utilizando marcación con precursores radiactivos, cromatografía líquida de alta resolución y resonancia nuclear magnética, lo identificaron como ADP ribosa cíclica (Lee y cols., 1989).

El método utilizado comúnmente para demostrar la presencia funcional de CICR en células esta basado en la farmacología del canal-RyR, la cual difiere claramente de la farmacología de los canales de calcio receptores de IP_3 . Utilizando este tipo de análisis se han examinado las similitudes entre la liberación de calcio sensible a cADPR y la liberación sensible a ryanodina/cafeína en homogeneizados de ovocitos de erizo de mar.

Ryanodina y cafeína liberan Ca^{2+} desde homogeneizados de ovocitos de erizo de mar en forma dependiente de la concentración (Galione y cols., 1991). En tanto que el Rojo de Rutenio y la procaina, inhibidores de la liberación de Ca^{2+} desde el RS, selectivamente bloquean en ovocitos la liberación de Ca^{2+} inducida por cafeína pero no la inducida por IP_3 . Estos resultados, sumados al hecho de que concentraciones submáximas de cafeína sensibilizan la liberación de

Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Lee, 1993), sugieren que los homogeneizados de ovocitos de erizo de mar poseen canales-RyR funcionales.

Adicionalmente, el pretratamiento del homogeneizado con altas concentraciones de cADPR lo desensibilizan a posteriores adiciones de cADPR o de agonistas del RyR (ryanodina y cafeína). Sin embargo, los homogeneizados retienen su capacidad de liberar Ca^{2+} en respuesta a IP_3 . De igual forma, altas concentraciones de ryanodina y cafeína desensibilizan tanto al homogeneizado (Lee, 1993), como a los ovocitos (Buck y cols., 1994) al efecto de cADPR pero no al de IP_3 . En este sentido, el cADPR parecería funcionar en forma similar a la cafeína, excepto que el cADPR sería 5 ordenes de magnitud más efectivo. De hecho, concentraciones submáximas de cafeína pueden reducir la concentración media efectiva de cADPR en aproximadamente 10 veces. De igual manera, el efecto liberador de Ca^{2+} de la cafeína puede ser igualmente potenciado por bajas concentraciones de cADPR (Lee, 1993).

A partir de estas observaciones, se ha sugerido que cADPR activa los RyR de ovocitos de erizo de mar. Sin embargo, otros resultados han puesto en duda esta conclusión. En homogeneizados de ovocitos de erizo de mar, la liberación de Ca^{2+} inducida por cADPR presenta propiedades peculiares, ya que se ha reportado que esta requiere necesariamente de la presencia de calmodulina (Lee y cols., 1994a; 1995; Tanaka y Tashjian, 1995) y que no sería activada por ATP (Graeff y cols., 1995), dos propiedades que difieren de la liberación mediada por RyR en mamíferos y anfibios. Adicionalmente, el derivado de cADPR, 8-amino-cADPR, que en ovocitos antagoniza la liberación de Ca^{2+} inducida por cADPR, no afecta la liberación de Ca^{2+} inducida por ryanodina (Walseth y Lee, 1993).

No obstante lo anterior, se ha reportado que el efecto de cADPR sobre la liberación de Ca^{2+} en homogeneizados de ovocitos de erizo de mar puede estar modulado por una serie de

factores citoplasmáticos fisiológicos, tales como calmodulina (Lee y cols., 1994a; 1995), Ca^{2+} (Chini y Dousa, 1996a; Gou y Becker, 1997), palmitoil-CoA (Chini y Dousa, 1996b) y el estado redox del RE (Tanaka y Tashjian, 1994). Todos estos factores potencian el efecto liberador de Ca^{2+} inducido por cADPR. Por el contrario, concentraciones milimolares de Mg^{2+} libre (Graeff y cols., 1995; Chini y Dousa, 1996b) y de poliaminas, tales como espermina (Chini y cols., 1995), tienen un efecto inhibitor de la liberación de Ca^{2+} inducido por cADPR. Todos ellos, con la excepción de calmodulina, presentan efectos similares sobre la actividad de los RyR en vertebrados (Coronado y cols., 1994; Zucchi y Ronca-Testoni, 1997).

Liberación de calcio mediada por RyR en vertebrados

Los RyR son proteínas que forman un complejo tetramérico de subunidades homólogas de alto peso molecular (500 a 600 kDa) (Franzini-Armstrong y Protassi, 1997; Zucchi y Ronca-Testoni, 1997). En el caso particular de los RyR de mamíferos, actualmente se conoce la secuencia aminoacídica de las tres isoformas del RyR encontradas a la fecha (RyR1, RyR2 y RyR3), siendo su patrón de expresión característico de cada tejido. En el músculo esquelético y cardíaco las isoformas predominantes son RyR1 y RyR2, respectivamente. En el tejido cerebral, además de RyR1 y RyR2, se expresa la isoforma RyR3. Esta última también se encuentra presente en el diafragma y en el músculo liso de mamíferos (Coronado y cols., 1994; Meissner, 1994; Sutko y Airey, 1996; Zucchi y Rosca-Testoni, 1997; Franzini-Armstrong y Protassi, 1997). Por otra parte, en el músculo esquelético de anfibios, aves y peces se expresan otras dos isoformas del RyR, llamadas α y β (Olivares y cols., 1991; Sutko y Airey, 1996). Estas últimas serían equivalentes a RyR1 y RyR3, respectivamente, debido al alto grado de homología que poseen con estas isoformas de mamíferos (Oyamada y cols., 1994; Ottini y cols., 1996).

Los RyR presentan actividad de canal de Ca^{2+} cuando se reconstituyen en bicapas lipídicas planas. Estos canales se incorporan a las bicapas exponiendo su lado citoplasmático hacia el compartimento en el cual se adicionan las vesículas de RE/RS, denominado compartimento *cis*, de tal forma que es posible modificar tanto el medio que baña la cara citoplasmática del canal como el medio luminal (*trans*). Mediante esta metodología se han estudiado gran parte de las propiedades de los canales de liberación de Ca^{2+} . También se han medido flujos de salida de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares en células o en vesículas aisladas de RS/RE (Coronado y cols., 1994; Meissner, 1994). Estos estudios han demostrado que los canales de liberación poseen una conductancia para Ca^{2+} de 100-110 pS (Smith y cols., 1986; Lai y Meissner, 1989) y han establecido la modulación de los canales por una serie de agentes farmacológicos y compuestos endógenos que se encuentran normalmente en la célula, como se detalla a continuación.

Moduladores farmacológicos de los RyR: Ryanodina, cafeína y Rojo de Rutenio

El alcaloide de origen vegetal ryanodina es el compuesto que más ha contribuido al estudio y caracterización de los RyR. Debido a su capacidad de unión con alta afinidad a estos canales, se ha utilizado la ryanodina como herramienta para la purificación de RyR y para la identificación farmacológica del proceso de liberación de calcio mediado por los RyR. En estudios de canales únicos se ha demostrado que ryanodina ejerce un efecto múltiple. Tal es así que concentraciones nanomolares activan al canal (Bull y cols., 1989), concentraciones submicromolares inducen la aparición de estado de subconductancia característica, con una probabilidad de apertura en ese estado cercana a 1 (Rousseau y cols., 1987), y concentraciones micromolares lo cierran completamente (Meissner, 1986; Bull y cols., 1989).

Clásicamente, la cafeína se ha utilizado como agonista para el reconocimiento de vías de liberación de Ca^{2+} mediadas por RyR. La cafeína, en concentraciones milimolares, incrementa la actividad de canales de liberación provenientes de músculo esquelético y cardíaco, sin modificar su conductancia (Coronado y cols., 1994; Zucchi y Ronca-Testoni, 1997). De igual forma, induce la liberación de Ca^{2+} desde el RS/RE en células (Muller y Daly., 1993; Steenbergen y Fay, 1996) y en vesículas aisladas (Palade, 1987; Rousseau y cols., 1988, Liu y Meissner, 1997).

Otro compuesto que ha sido utilizado como herramienta farmacológica para la identificación de vías de liberación mediadas por los RyR es el Rojo de Rutenio. En registros de canal único este compuesto induce el cierre irreversible del canal (Ma, 1993).

Modulación de los RyR por compuestos intracelulares: Calcio, Magnesio, ATP y cADPR.

En estudios de canal único y de liberación de Ca^{2+} desde vesículas aisladas, se ha descrito que una serie de agentes endógenos son capaces de activar o inhibir los RyR. Sin embargo, con la excepción del músculo cardíaco, aún no se sabe si alguno de estos compuestos induce o regula la liberación de Ca^{2+} mediada por RyR en condiciones fisiológicas.

Calcio: Todos los canales-RyR que se han estudiado al nivel de canal único manifiestan modulación por Ca^{2+} . Se han descrito tres tipos de respuesta frente a los cambios de $[\text{Ca}^{2+}]$ en la cara citoplasmática de canales-RyR. El primero de ellos se caracteriza por una dependencia de Ca^{2+} en forma de campana, con activación por Ca^{2+} en el intervalo 1-30 μM (Smith y cols., 1986) e inhibición a concentraciones mayores de Ca^{2+} , entre 100 y 500 μM (Fill y cols., 1990; Chu y cols., 1993). Esta forma de respuesta fue descrita inicialmente en canales RyR provenientes de músculo esquelético de mamíferos, por lo que se le ha denominado dependencia

tipo MEM (Marengo y cols., 1998). El segundo tipo de respuesta a Ca^{2+} de los canales RyR se caracteriza por una activación por Ca^{2+} de tipo sigmoideal en el intervalo de $[\text{Ca}^{2+}]$ de 0,1 a 10 μM , sin inhibición al aumentar la concentración hasta 1 mM (Rousseau y cols., 1986; Anderson y cols., 1989; Holmberg y Williams, 1990; Chu y cols., 1993). Este tipo de respuesta fue descrito inicialmente en canales RyR provenientes de músculo cardíaco, razón por la cual recibe el nombre de dependencia del tipo C. Finalmente, se ha descrito un tercer tipo de respuesta a Ca^{2+} , en forma de campana y con un P_o máximo que no sobrepasa 0,10 (Marengo y cols 1996; Marengo y col., 1998); debido a esta última característica ésta se ha denominado dependencia de calcio del tipo Bajo P_o .

Recientemente, se ha demostrado que los canales-RyR nativos de músculo esquelético de mamíferos (RyR1), anfibios (α y β) y de neuronas (RyR1, RyR2 y RyR3) presentan los tres tipos dependencias de calcio (MEM, C y Bajo P_o). En tanto que los canales-RyR nativos del músculo cardíaco (RyR2) manifiestan sólo dos de ellas, la dependencia tipo MEM y la de tipo C (Marengo y cols., 1998).

Más aun, los distintos tipos de dependencia de Ca^{2+} que manifiestan los canales-RyR están determinados por el estado de oxidación de la proteína canal o de alguna otra proteína asociada con el canal en la bicapa. Así, los canales con dependencia tipo Bajo P_o se encuentran con mayor frecuencia en condiciones de reducción, en tanto que los canales con dependencia tipo C se encuentran con mayor frecuencia en condiciones de oxidación (Marengo y cols., 1998).

Magnesio: Estudios de actividad de canal único han demostrado que Mg^{2+} libre a concentraciones milimolares en el compartimento citosólico inhibe tanto los canales-RyR esqueléticos (Rousseau y cols 1986, Smith y cols., 1986, Laver y cols., 1997) como los cardíacos

incorporados en bicapas planas (Ashley y Williams, 1990, Laver y cols., 1997). Aun cuando los RyR cardíacos son significativamente menos sensibles a la inhibición por Mg^{2+} que los esqueléticos (Michalak y cols., 1988), en ambos canales el efecto inhibitorio de Mg^{2+} es dependiente de $[Ca^{2+}]$, indicando que ambos iones compiten por el mismo sitio (Laver y cols., 1997).

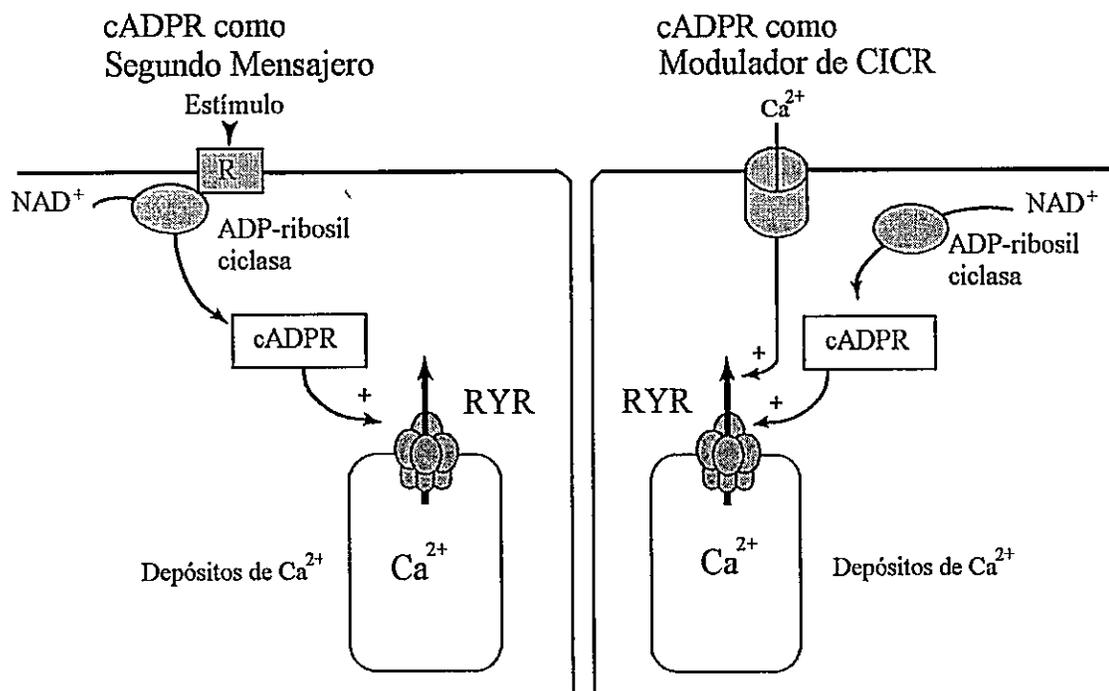
ATP: El ATP, en su forma libre y en el rango de concentración milimolar aumenta la actividad de los canales RyR en todos los tejidos de vertebrados en que se ha estudiado su efecto (Meissner, 1984; Smith y cols., 1986; Suárez-Isla y cols., 1988). Además, en músculo esquelético de mamíferos y anfibios es necesaria la presencia de ATP para lograr la completa activación del canal por Ca^{2+} ; lo mismo ocurre con los flujos de liberación en vesículas (Smith y cols, 1986; Moutin y Dupont, 1988; Donoso e Hidalgo, 1993). En la célula, sin embargo, la mayor parte del ATP se encuentra como el complejo Mg-ATP, que no tiene el mismo efecto activador que el ATP libre.

ADP ribosa cíclica (cADPR): Actualmente se proponen dos posibles papeles para cADPR en la regulación celular del calcio: 1) como un segundo mensajero clásico, análogo a IP_3 y 2) como un modulador de CICR (Galione y White, 1994; Fig. 1).

En el primer modelo se plantea que en respuesta a un estímulo extracelular se activaría la síntesis de cADPR produciendo un aumento de $[cADPR]_i$, como resultado de lo cual se activarían los canales de Ca^{2+} RyR del RE o RS. En ovocitos de erizo de mar existen reportes que señalan que la enzima responsable de la síntesis de cADPR, ADP-ribosil ciclasa, puede ser activada por mecanismos dependientes del cGMP, los cuales se generan por acción directa del

mensajero gaseoso oxido nítrico (NO) sobre la enzima guanilato ciclasa (Galione y cols., 1993). Mas aún, la exposición de ovocitos de erizo de mar intactos a NO aumenta al doble los niveles intracelulares de cGMP e induce liberaciones de Ca^{2+} que son independientes de los niveles de Ca^{2+} extracelular, pero que son bloqueadas por antagonistas de cADPR (Willmontt y cols., 1996).

Fig. 1 Esquema de los papeles propuestos para cADPR en la regulación del calcio celular. (según Galione y White, 1994)



El segundo modelo propone que la presencia de cADPR en el citoplasma produce la sensibilización de los canales de liberación a la activación por Ca^{2+} , de tal forma que en presencia de cADPR bastarían pequeños incrementos de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, por ejemplo inducidos por IP_3 , para gatillar el proceso de CICR. Este modelo requiere que el metabolito esté siempre presente

en las células a bajas concentraciones, lo cual es consistente con los niveles de cADPR endógenos (1-3 pmol/mg de proteína) medidos en distintos tejidos (Rusinko y Lee, 1989; Walseth y cols., 1991).

Este nuevo agonista también ha sido identificado en la mayoría de los tejidos de mamíferos (Rusinko y Lee, 1989), por lo que se ha postulado como el agonista responsable de la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares. Los hallazgos que señalan a este compuesto como el posible agonista fisiológico del canal-RyR de vertebrados se describen a continuación.

La liberación de Ca^{2+} intracelular inducida por cADPR se ha reportado en varios tejidos y tipos celulares. Estos incluyen neuronas (Currie y cols., 1992; White y cols., 1993), células pituitarias (Koshiyama y cols., 1991), células β e islotes pancreáticos (Takasawa y cols., 1993; Noguchi cols., 1997), células linfoides (Bourguignon y cols., 1995; Guse y cols., 1996), músculo liso (Kannan y cols., 1996; Prakash y cols., 1998) y preparaciones de RS de músculo esquelético y cardíaco (Mészáros y cols., 1993; Morrissette y cols., 1993). También se ha descrito que cADPR modula los RyR. En células linfoides, cADPR 1 μM aumentó la afinidad por [^3H]-Ryanodina en cinco veces (Bourguignon y cols., 1995), en tanto que en vesículas de RS de músculo cardíaco se ha reportado que concentraciones de cADPR de 1 a 2 μM incrementan tanto la unión de [^3H]-Ryanodina como la actividad de los canales de calcio RyR incorporados en bicapas planas (Mészáros y cols., 1993). Un efecto similar se observó en vesículas de RE provenientes de cerebro pero no en RS de músculo esquelético (Mészáros y cols., 1993).

Por otra parte, Fruen y cols. (1994) reportaron que ni cADPR (0,1 a 5 μM), ni ADPR o metabolitos relacionados a $\beta\text{-NAD}^+$, tienen efecto sobre la unión de [^3H]-Ryanodina a vesículas de RS de músculo cardíaco y esquelético de cerdo; de igual forma, cADPR 1 μM no tuvo efecto sobre el P_o de los canales incorporados en bicapas planas. No obstante, se ha descrito activación

de los canales-RyR por concentraciones de cADPR $\geq 1 \mu\text{M}$ en vesículas de RS aisladas de músculo cardíaco (Sitsapesan y cols., 1994) o esquelético (Sitsapesan y Williams, 1995; Sitsapesan y cols., 1995) de oveja. Este efecto, que ocurre a concentraciones micromolares de Ca^{2+} citoplasmático, fue inducido además por ADPR y $\beta\text{-NAD}^+$ y no fue detectado en presencia de concentraciones fisiológicas de ATP y Mg^{2+} . Basándose en estos resultados, estos autores concluyen que cADPR interactuaría con el sitio de unión a nucleótidos presente en el RyR. Finalmente, Morrissette y cols. (1993) también reportaron que concentraciones micromolares (1 a $17 \mu\text{M}$) de cADPR inducen liberación de Ca^{2+} desde vesículas de RS de músculo esquelético, pero no observaron cambios en el P_o de estos canales por acción de cADPR al ser incorporados en bicapas planas. Sin embargo, estos resultados pueden ser explicados por la baja concentración de Ca^{2+} intraluminal (*trans*) utilizada en este estudio, ya que se ha reportado que la activación de los canales-RyR por cADPR requiere concentraciones de $\text{Ca}^{2+} > 40 \mu\text{M}$ en el compartimento *trans* (Sitsapesan y Williams, 1995).

De lo anterior se desprende que aunque está claro que cADPR puede movilizar Ca^{2+} intracelular en muchos tipos celulares, su mecanismo y su sitio de acción están poco comprendidos. Se ha sugerido que cADPR, al menos en condiciones fisiológicas, no tendría una acción directa sobre RyR ya que la fotólisis de cADPR enjaulado (a concentraciones superiores a $100 \mu\text{M}$) no induce liberación de Ca^{2+} en células cardíacas en cultivo (Guo y cols., 1996), pero sí gatilla la liberación de Ca^{2+} en ovocitos de erizo de mar (Guo y cols., 1996; Gou y Becker, 1997). Sin embargo, no se debe excluir la posibilidad de que el efecto activador de cADPR sobre los RyR *in vivo* esté regulada por factores citoplasmáticos, especialmente tomando en cuenta la considerable modulación por los distintos compuestos citoplasmáticos o interacciones proteína-proteína que presenta el RyR en condiciones fisiológicas (Zucchi y Ronca-Testoni,

1997). En este sentido, el efecto de cADPR sobre los canales RyR purificados, que carecen de interacción con proteínas moduladoras del RS, es un aspecto que aun no ha sido estudiado.

Un hecho adicional que contribuye a la controversia del efecto de cADPR sobre el RyR es la poca claridad que se tiene respecto del subtipo de RyR que presenta el ovocito de erizo de mar ya que no existen en la literatura descripciones detalladas de estos. Se sabe, sin embargo, que los ovocitos de erizo tienen una proteína de 380 kDa que presenta reacción cruzada con anticuerpos anti RyR1 (McPherson y cols., 1992).

Receptor de cADPR. Conocer cuales son las proteínas que interactúan con cADPR resulta fundamental para la comprensión de los mecanismos por los cuales este agonista regula la liberación de Ca^{2+} . Una variedad de técnicas, incluyendo estudios de unión, efecto de antagonistas y marcación con agentes fotoactivos han sido utilizadas para identificar al receptor de cADPR. Estudios de unión de [^{32}P]cADPR han mostrado la presencia de receptores específicos para cADPR en microsomas de ovocitos de erizo (Lee, 1991). Análisis de Scatchard de esta unión en microsomas de ovocitos de erizo *L. Pictus* han revelado la presencia de un sitio de alta afinidad, con una constante de unión de 1,6 nM. Sin embargo, en ovocitos de *S. Purpuratus* se han identificado dos sitios de unión a cADPR, uno de alta y otro de baja afinidad (Lee y cols., 1994b; Lee, 1997). El significado de la presencia de estos dos sitios de unión aun se desconoce.

En los únicos intentos para identificar el receptor de cADPR que se han realizado a la fecha se ha utilizado el análogo 8-azido-cADPR como sonda fotosensible. Este derivado fotosensible compite con cADPR por el receptor y es también un antagonista. Mediante esta técnica se han identificado en microsomas de ovocitos de erizo de mar dos proteínas, de 140 kDa

y 100 kDa que unen específicamente 8-azido-cADPR (Walseth y cols., 1993). Sólo la marcación de la proteína de 100 kDa fue desplazada por la presencia de concentraciones milimolares de cafeína.

Cabe destacar que las dos proteínas identificadas por fotoafinidad presentan un peso molecular menor a los 380 kDa reportados para el RyR de ovocitos de erizo de mar, identificado utilizando anticuerpos anti-RyR esquelético (McPherson y cols., 1992), y claramente menor a los ≈ 560 kDa que presentan los RyR de vertebrados. Se desconoce si estas proteínas de 140 kDa y 100 kDa interactúan con el RyR o si ellas representan un nuevo tipo de canal de calcio.

Por esto en esta tesis se propone hacer un estudio comparativo del efecto de cADPR en canales de calcio de dos sistemas experimentales distintos, pero que presentan vías de liberación de calcio activadas por agonistas de los RyR. Uno, los microsomas de ovocitos de erizo de mar, cuya liberación de Ca^{2+} inducida por cADPR ha sido ampliamente caracterizada, pero en los cuales las propiedades de los canales únicos sensibles a cADPR no están descritas. Más aun, al inicio de esta tesis se desconocía si en el ovocito de erizo de mar existían canales de calcio sensibles a la activación por cADPR, aunque se especulaba que podrían ser canales de calcio tipo-RyR.

El otro sistema, los RyR de músculo esquelético de anfibio, representa uno de los sistemas celulares en los cuales existe el mayor número de reportes contradictorios respecto del efecto activador de cADPR sobre los RyR, siendo este sistema el principal responsable del cuestionamiento que se hace a cADPR como el agonista endógeno de los RyR en vertebrados. En contrapartida, este sistema presenta la ventaja de poseer uno de los canales de calcio-RyR mejor caracterizados en su fisiología y biofísica.

HIPOTESIS

Sobre la base de los antecedentes presentados se propone que los ovocitos de erizo de mar presentan canales de Ca^{2+} sensibles a la activación por cADPR que se pueden caracterizar al nivel de canales únicos. Adicionalmente, se propone que los canales de Ca^{2+} del ovocito presentan un perfil de modulación farmacológica similar al de los RyR de vertebrados. Consecuentemente se propone por analogía que los RyR de vertebrados son activados directamente por cADPR.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aislar una fracción microsomal, a partir de un homogeneizado de ovocitos de erizo de mar (*Tetrapigus nyger*), que presente liberación de Ca^{2+} sensible a cADPR.
2. Utilizar bicapas planas para el estudio de canales de Ca^{2+} presentes en los microsomas de ovocitos de erizo de mar. Caracterizar la actividad de canal único y estudiar el efecto de cADPR.
3. Estudiar el efecto de distintos agonistas (Ca^{2+} , cafeína, ATP) y bloqueadores (Rojo de Rutenio, Mg^{2+}) clásicos de los RyR sobre la actividad de los canales de Ca^{2+} de erizo de mar.
4. Estudiar el efecto de cADPR sobre la actividad de canales RyR de vertebrados, purificados de músculo esquelético de anfibio.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de microsomas de ovocitos de erizo de mar

Se aislaron microsomas de ovocitos del erizo de mar *Tetrapigus nyger* utilizando técnicas convencionales de fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial. Se recolectaron directamente en agua de mar (AM) filtrada los ovocitos de erizo de mar por electroestimulación de ejemplares vivos en su cavidad celómica a temperatura ambiente; todos los pasos siguientes se realizaron a 4 °C. Los ovocitos decantados por gravedad (ovocitos empacados) se lavaron dos veces con AM por dilución de 10-20 veces, y dos veces con agua de mar artificial sin calcio (AMASC: NaCl 470 mM, Mg Cl₂ 27 mM, MgSO₄ 28 mM, KCl 10 mM, NaHCO₃ 2,5 mM, pH 8,0). Para remover la cubierta vitelina, se resuspendieron 100 ml de ovocitos empacados y lavados en 400 ml de AMASC, pH 9,0, conteniendo DTT 1mM y se agitaron constantemente por 15 min. (Epel y col. 1970). Luego de un lavado en AMASC, los ovocitos se sedimentaron dos veces x 30 s a baja velocidad (2000 x rpm) en tampón sacarosa (MOPS 20 mM, pH 7,0, Sacarosa 0,3 M, KCl 0,1 M, más inhibidores de proteasas: Leupeptina 10 µg/ml, Pepstatina A 2 µg/ml, Benzamidina 5 mM, SBTI 100 µg/ml) y el sedimento resultante se resuspendió en 4 volúmenes del mismo tampón. Los ovocitos fueron homogeneizados en homogeneizador vidrio-vidrio por 15 pasadas a mano, fueron sedimentados a 2.000 x g por 20 minutos y el sobrenadante resultante fue sedimentado a 12.000 x g por 20 minutos. El nuevo sobrenadante obtenido fue sedimentado a 100.000 x g por 60 minutos para coleccionar los microsomas, que tras la centrifugación fueron resuspendidos en tampón sacarosa a una concentración final de proteína de 10 mg/ml y fraccionados en columna de agarosa (Bio-Gel A-0.5 m, Bio-Rad) para extraer el pigmento ovocitario equinocromo. Las fracciones excluidas de la columna, conteniendo los microsomas,

fueron sedimentadas a 100.000 x g por 60 minutos y el sedimento fue resuspendido en tampón sacarosa, congelado en N₂ líquido y guardado a -80 °C por no más de 2 semanas.

Aislamiento de vesículas de retículo sarcoplasmático de anfibio

La preparación de vesículas de retículo sarcoplasmático (RS) de músculo esquelético de rana se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Hidalgo y cols. (1993). Brevemente, los músculos limpios y finamente picados se homogeneizaron en una licuadora comercial en dos ciclos alternados de 30 y 20 segundos en 4 volúmenes de una solución que contenía KCl 0,15 M, MgCl₂ 5 mM, MOPS/Tris 20 mM, pH 6,8, Leupeptina 1 µg/ml, Benzamidina 0,8 mM, Pepstatina 1 µg/ml y PMSF 1 mM a 4°C. El homogeneizado se sedimentó a 1.500 x g por 25 minutos. El sobrenadante resultante se sedimentó a 17.000 x g por 20 minutos y el sedimento obtenido fue homogeneizado en 4 volúmenes de tampón de homogeneización en homogeneizador de vidrio. Luego de una centrifugación a 1.250 x g por 25 minutos el sobrenadante se sedimentó a 17.000 x g por 30 minutos y el sedimento final se homogeneizó en tampón de congelación (sacarosa 0,3 M, MOPS/Tris 20 mM, pH 7,0, Leupeptina 1 µg/ml, Benzamidina 0,4 mM). Las vesículas se congelaron rápidamente por inmersión en N₂ líquido y se guardaron congeladas a -80 °C, por períodos no superiores a un mes.

Purificación del RyR de RS de músculo esquelético de anfibio

Marcación de los RyR con [³H]-Ryanodina

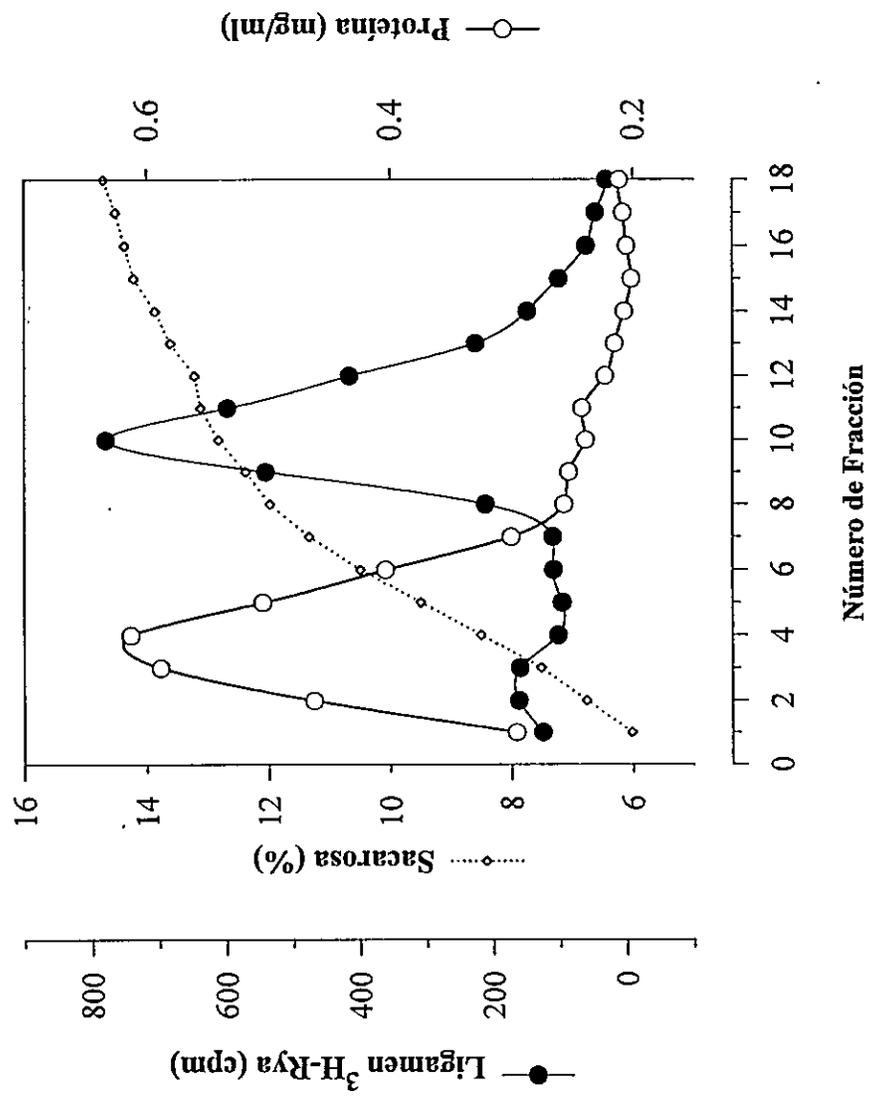
Para la purificación del receptor se utilizó [³H]-Ryanodina (Dupont, New-England Nuclear) como sonda marcadora del RyR presente en las vesículas de RS. Las tríadas obtenida de acuerdo al método ya descrito y sin congelar, fueron diluidas a 1 mg/ml de proteína en una solución que

contenía: KCl 0,5 M, AMP-PNP 0,5 mM, MOPS/Tris 20 mM, pH 7,0 en presencia de [³H]-Ryanodina 10 nM y fueron incubadas a 22-25 °C por 90 min. (Bull y cols. 1989). Para eliminar el excedente de [³H]-Ryanodina libre tanto las vesículas control como las incubadas con [³H]-Ryanodina se sedimentaron y se resuspendieron en tampón de solubilización.

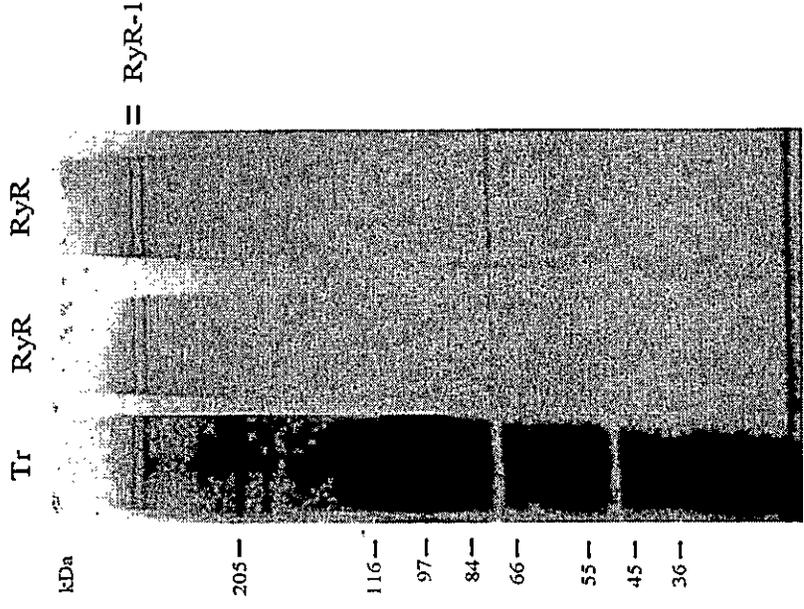
Solubilización de RyR de RS de anfibio

La purificación del RyR de anfibio se realizó de acuerdo a una modificación de los métodos descritos por Lai y cols. (1989) y Zhang y cols. (1997). Se tomaron 15 mg de vesículas de RS de músculo esquelético de anfibio, previamente incubadas con y sin [³H]-Ryanodina, y se resuspendieron en 3 ml de tampón de solubilización (CHAPS 3% [p/v], NaCl 1 M, DTT 5 mM, Sacarosa 0,25 M, CaCl₂ 0,2 mM, MOPS 20 mM, pH 7,2, fosfatidilcolina 5 mg/ml, Leupeptina 10 µg/ml, Pepstatina A 2 µg/ml, Benzamidina 8 mM). Tras agitar constantemente por 60 minutos en hielo, se sedimentó las vesículas solubilizadas por 60 minutos. El sobrenadante obtenido fue diluido en un volumen igual de tampón gradiente (NaCl 1 M, DTT 2 mM, Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, más inhibidores de proteasas), y fue cargado en gradiente discontinua de sacarosa y sedimentado 15-16 horas a 22.000 r.p.m. en un rotor Beckman SW25.1. Se utilizó un gradiente discontinuo de sacarosa de 10% (5 ml), 13% (10 ml), 15% (10 ml); todas las soluciones de sacarosa fueron preparadas en tampón gradiente conteniendo 1% CHAPS y 5 mg/ml de fosfatidilcolina. Se colectaron fracciones de 1,5 ml y se analizaron los siguientes parámetros: *a*) radiactividad correspondiente a [³H]-Ryanodina unida de una alícuota de 10 µl de cada fracción, para evaluar el perfil de migración del RyR, *b*) concentración de proteínas (Bradford, 1976) y *c*) concentración de sacarosa a través de métodos de refractometría (Fig. 2A). Aquellas fracciones que presentaron la mayor unión de [³H]-Ryanodina fueron combinadas y dializadas en tampón de diálisis (NaCl 0,1 M, Tris/HCl 20 mM,

A



B



pH 7,4 más inhibidores de proteasas) para remover el CHAPS. Las proteínas así incorporadas en los fosfolípidos fueron posteriormente sedimentadas a 100.000 x g por 60 minutos y finalmente resuspendidas en tampón de congelación, congeladas en N₂ líquido y guardadas a -80 °C. Análisis de geles de poliacrilamida en SDS de los liposomas formados, teñidos con tinción argéntica (Wray y cols., 1981), confirman la presencia del RyR como la proteína mayoritaria (Fig.2B)

Rutinariamente se realizaron en paralelo tres gradientes por experimento; una marcada con [³H]-Ryanodina y dos sin [³H]-Ryanodina, de las cuales se obtuvieron las fracciones que contenían el RyR, que fueron utilizadas en los experimentos de bicapas tras dializarlas.

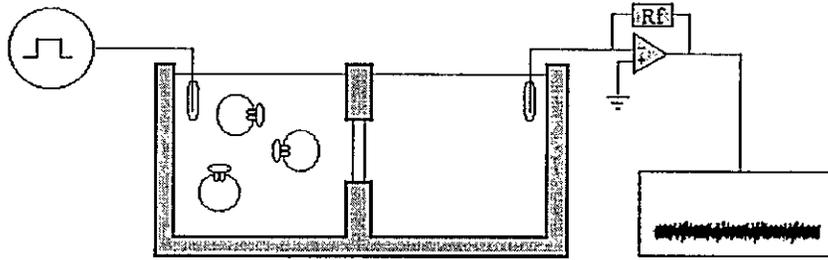
Experimentos de bicapas

Incorporación y registro de canales únicos

Para el estudio de corrientes de canal único, incorporados en bicapas planas de fosfolípidos, se procedió de acuerdo a los métodos previamente descritos (Bull y cols., 1989). Se fusionaron vesículas de membrana con bicapas planas de fosfolípidos, pintadas con una mezcla de palmitoiloleil fosfatidiletanolamina (POPE), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilcolina (PC) en proporción POPE : PS : PC = 5 : 3 : 2 (Avanti Polar Lipids Co.), disueltos en decano a una concentración final de 33,3 mg/ml. Para la fusión, se agregaron 10–20 µg de proteínas de vesículas de microsomas ovocitos de erizo de mar, o 1-5 µg de proteínas, de los liposomas conteniendo el RyR purificado de anfibio, al compartimento citoplasmático (*cis*) que contenía 5 ml de una solución de CsCl 200 mM, CaCl₂ 100 µM, HEPES/Tris 25 mM, pH 7,4. El compartimento luminal (*trans*) contenía una solución de HEPES/Tris 25 mM, pH 7,4 (Fig. 3A).

Manteniendo la membrana a 0 mV, se evidenció la fusión de los canales por la aparición de fluctuaciones de corriente pocos minutos después de la adición de las vesículas. Tras la fusión de

A. Condición de fusión

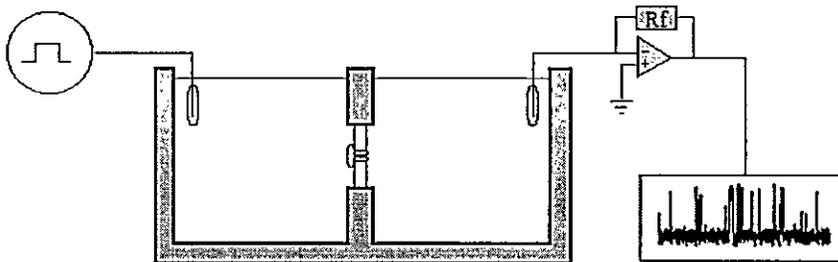


Cis *Trans*

Hepes/Tris 25 mM
CsCl 200 mM
CaCl₂ 100 μM
Vesículas 10-20 μg prot.
pH 7,4

Hepes/Tris 25 mM
pH 7,4

B. Condición de registro para los ovocitos de *T. nyger*

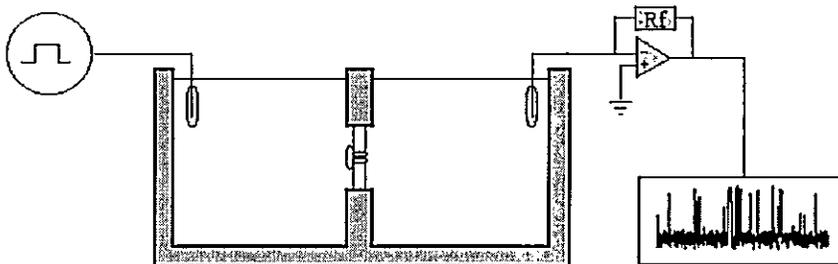


Cis *Trans*

Hepes/Tris 25 mM
CsMs 200 mM
Ca²⁺ / HEDTA o EGTA
pH 7,4

Hepes/Tris 25 mM
CsMs 50 mM
pH 7,4

C. Condición de registro para el RyR de anfibio



Cis *Trans*

Hepes/Tris 225 mM
Ca²⁺ / HEDTA o EGTA
pH 7,4

Hepes/Tris 25 mM
Ca²⁺ 37 mM
pH 7,4

los microsomas de ovocitos de erizo de mar el compartimento *cis* fue perfundido con 5 volúmenes de HEPES/Tris 25 mM, pH 7,4, suplementado con Metanosulfonato de Cesio (CsCH_3SO_3) 200 mM, en tanto que el compartimento *trans* se suplementó con CsCH_3SO_3 50 mM (Fig. 3B). Para los experimentos de fusión del RyR purificado de anfibio, el compartimento *cis* fue perfundido con 5 volúmenes de HEPES/Tris 225 mM, pH 7,4, en tanto que el compartimento *trans* fue perfundido con 1,5 ml de una solución de HEPES/Ca 100 mM, pH 7,4, quedando a una concentración final de Ca^{2+} de 37 mM (Fig. 3C). Para estudiar la modulación de la actividad de los canales por calcio se modificó la $[\text{Ca}^{2+}]$ en el compartimento *cis* adicionando Ca^{2+} /HEPES 0,5 mM y HEDTA o EGTA, dependiendo del nivel de calcio a tamponar, a pH 7,4. En aquellos experimentos en los que se evaluó el efecto de Mg^{2+} sobre la actividad de los canales se utilizó EGTA como tampón de Ca^{2+} para evitar variaciones de las $[\text{Ca}^{2+}]$ posteriores a la adición de Mg^{2+} . Rutinariamente la $[\text{Ca}^{2+}]$ del compartimento *cis* fue controlada con un electrodo de calcio.

En las condiciones de registro utilizadas para determinar actividad de canal de microsomas de ovocito la amplitud de la I_{max} observada en Cs^+ fue cuatro veces mayor a la observada en Ca^{2+} , haciendo más fácilmente visibles los distintos *niveles* de subconductancia e incrementando la diferencia entre el *nivel* de subconductancia menor y el ruido de la señal basal (ver, Fig. 7A de Resultados). Por esta razón, a menos que se indique lo contrario todos los experimentos de ovocitos de erizo fueron registrados en soluciones asimétricas de Cs^+ .

El compartimento *trans*, conectado a un conversor corriente-voltaje, correspondió a tierra virtual. La señal de corriente filtrada se grabó con un sistema PCM (Pulse Code Modulation) en una grabadora de cintas de vídeo, para el análisis ulterior. Todos los registros se efectuaron a un potencial de 0 mV y a temperatura ambiente (22 - 24°C). Después de cada adición de agonista,

modulador o bloqueador, se agitó en forma continua el lado *cis* durante 30-60 segundos antes de registrar la actividad del canal.

Adquisición y análisis de datos.

Para el análisis, las señales análogas fueron filtradas a 400 Hz usando un filtro de paso bajo de ocho polos tipo Bessel (902 LPF, Frequency Devices Inc., Haverhill, MA, USA) y se digitalizaron a 2 kHz con un conversor análogo digital de 12 bits (interfase Labmaster DMA, Scientific solutions, Inc., Solon, OHA, USA) comandado por computador, usando el programa de adquisición de datos Axotape (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA). Las señales digitalizadas fueron analizadas con el conjunto de programas pClamp 6.0 (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA) o Transit (Baylor College of Medicine, Houston, USA). Debido a que los canales tanto de anfibio como de erizo de mar presentaron distintos niveles de subconductancia, se utilizó la corriente promedio normalizada como índice de actividad de estos canales, calculada según la siguiente ecuación:

$$P_o^* = I_{prom}/I_{max} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde I_{prom} corresponde a la corriente promedio calculada de cada registro utilizando el programa pClamp 6 (razón entre la integral de la corriente y el tiempo total de registro) e I_{max} corresponde a la corriente unitaria máxima del canal. P_o^* se calculó usando registros de una duración superior a 180 segundos.

En todos los casos en los que se hace referencia y en donde el número de experimentos (n) fue mayor que 3 los datos se presentan como promedio \pm error estándar (E.S.). En aquellos casos en que n fue ≤ 2 los datos son presentados como promedio \pm rango.

Materiales

El compuesto [^3H]-Ryanodina fue adquirido de Dupont (New-England Nuclear), y la cADPR se obtuvo de Amersham Int., Buckinghamshire, U.K o de SIGMA Chemical Co., U.S.A. Los fosfolípidos utilizados para las bicapas fueron obtenidos de Avanti Polar Lipids, Inc., Birmingham, AL. U.S.A. Todos los demás reactivos fueron adquiridos en SIGMA Chemical Co., U.S.A.

Abreviaciones

AMP-PNP	:	5'-Adenililimidodifosfato
CHAPS	:	3-[(3-colamidopropil)dimetilamodio]-1-propanosulfonato
DTT	:	Ditiotreitol
EGTA	:	Etilenglicol-bis(β -aminoetil éter) N, N, N', N' - ácido tetraacético
HEDTA	:	N-(2-hidroxietil)-etilendiamina-ácido triacético
HEPES	:	N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-ácido 2-etanosulfónico
MOPS	:	ácido 3-[N-morpholino]-propanesulfónico
SBTI	:	Inhibidor de tripsina de poroto de soya
Tris	:	tris-(hidroximetil) aminometano

RESULTADOS

I. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD DE CANALES DE Ca^{2+} DE MICROSOMAS DE OVOCITOS DE ERIZO DE MAR

Estudios de liberación de calcio en microsomas de ovocitos de erizo de mar

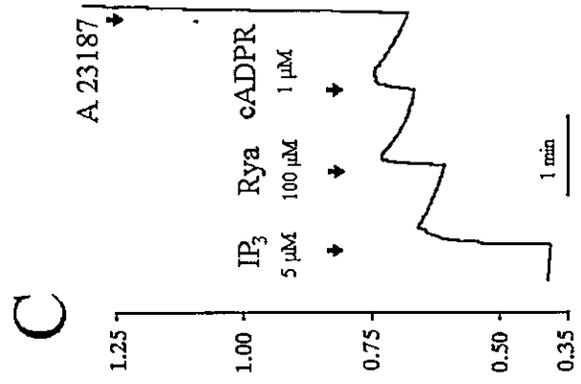
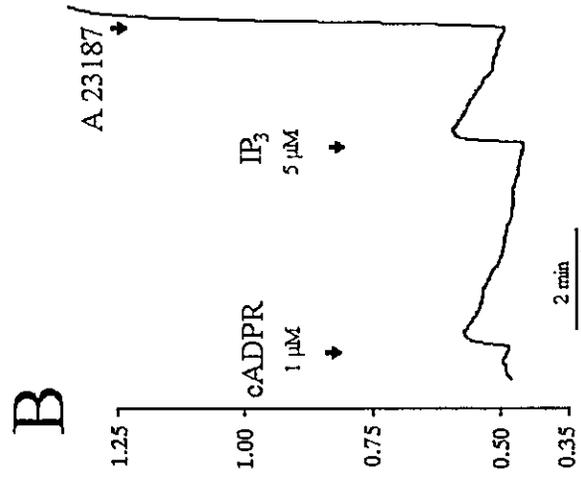
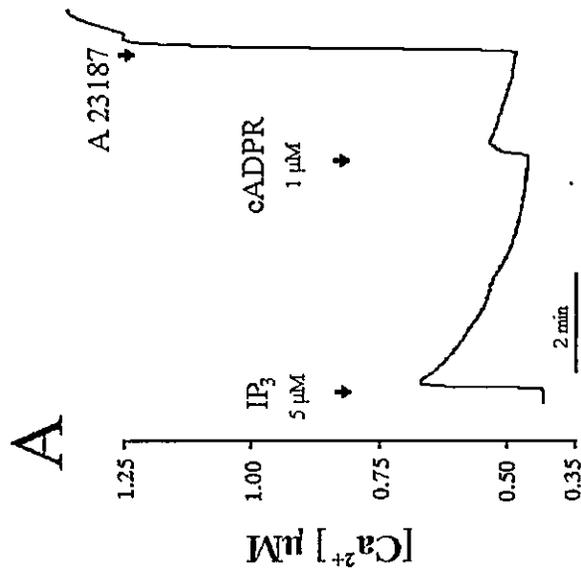
El ovocito de erizo de mar posee un extenso RE liso (Terasaki y Jaffe, 1991) que puede ser fácilmente aislado por homogeneización. Debido a que en éste se concentran los distintos canales intracelulares de calcio del ovocito (McPherson y cols., 1992), los homogeneizados y los microsomas derivados de éstos representan una de las preparaciones más estables y fáciles de obtener para el estudio de los mecanismos de liberación de calcio (ver revisión de Lee, 1997).

Como una etapa previa al estudio de la actividad de canal único en bicapas, se investigó si los microsomas de ovocitos de *T. niger*, aislados bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos, conservan la capacidad de liberar Ca^{2+} en respuesta a la adición de distintos agonistas. Con este propósito, se desarrolló en esta tesis un método de medición de la liberación de calcio desde vesículas activamente cargadas con calcio en celdas de espectrofluorímetro y en presencia del indicador fluorescente de calcio fluo-3 ($\text{C}_{36}\text{H}_{25}\text{C}_{12}\text{K}_5\text{N}_2\text{O}_{13}$, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Se determinó la fluorescencia del indicador excitando a una longitud de onda de 506 nm y registrando la emisión a 526 nm en un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540. Se calibró la fluorescencia de fluo-3 en función de la $[\text{Ca}^{2+}]$ utilizando soluciones de $[\text{Ca}^{2+}]$ conocidas, las que fueron determinadas utilizando un electrodo de calcio, en idénticas condiciones a las existentes en los experimentos de liberación.

Para iniciar la carga activa de las vesículas con calcio, se diluyó 0,5 mg de microsomas en 1 ml de solución que contenía Mg-ATP 1 mM, creatina quinasa 4 unidades/ml, fosfocreatina 8 mM,

KCl 100 mM, fluo-3 0,5 μM y MOPS/Tris 20 mM, pH 7,2. Después de 20-30 min. de incubación a 22 °C, la $[\text{Ca}^{2+}]$ extravésicular disminuyó a una concentración de 0,3 – 0,4 μM , indicando que las vesículas poseen bombas de calcio funcionales. En estas condiciones se evaluó la presencia de los distintos sistemas de liberación Ca^{2+} , descritos en el RE de los ovocitos de erizo de mar, agregando diferentes agonistas de los canales de calcio RyR y/o R-IP₃ y midiendo los cambios de la fluorescencia de fluo-3 en función del tiempo. La adición de IP₃ 5 μM a las vesículas activamente cargadas produjo una liberación transitoria de Ca^{2+} , una posterior adición de cADPR 1 μM indujo una nueva liberación transitoria de Ca^{2+} , pero de menor magnitud (Fig. 4A). En otro experimento, la adición de estos dos agonistas en orden inverso (Fig. 4B) también produjo liberaciones transitorias de Ca^{2+} ; se observó liberación en respuesta a la adición de cADPR 1 μM y una segunda respuesta de liberación tras la adición de IP₃ 5 μM un poco menor que la observada en el experimento de la Fig. 4A. En la Fig.4C, se muestra el efecto de la adición de ryanodina 100 μM a vesículas cargadas activamente. Al igual que en el caso de cADPR, luego de la adición de IP₃ 5 μM , ryanodina también indujo liberaciones transitorias de Ca^{2+} . En estas condiciones la adición subsecuente de cADPR 1 μM indujo una nueva liberación de Ca^{2+} . Estos resultados muestran que nuestra preparación de microsomas de ovocitos de erizo de mar presenta tanto la vía de liberación de Ca^{2+} activada por IP₃ como la activada por cADPR y/o ryanodina.

La adición del ionóforo de Ca^{2+} A-23187 al final de los experimentos produjo siempre un gran incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]$ extravésicular, lo que indica que las vesículas han acumulado importantes cantidades de Ca^{2+} y que el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]$ extravésicular observado después de la adición de los agonistas en efecto corresponde a la liberación de Ca^{2+} a través de las distintos vías de liberación presentes en los microsomas.



Microsomas de ovocitos de erizo de mar presentan canales de Ca^{2+} sensibles a cafeína

Para evaluar la presencia de canales de Ca^{2+} en los microsomas aislados de ovocitos de erizo, se fusionaron los microsomas a bicapas planas de lípidos. Como primera aproximación se utilizaron condiciones experimentales similares a las utilizadas rutinariamente para detectar canales de Ca^{2+} sensibles a ryanodina en vesículas de RS (ver Materiales y Métodos). Bajo estas condiciones los microsomas de ovocitos de erizo de mar presentaron canales de calcio con una I_{max} de 1 a 1,2 pA (ver Fig. 7). Ya que éste valor de I_{max} difiere poco del nivel de ruido basal de la membrana fosfolípídica, el análisis de la actividad de los canales puede verse significativamente afectado. Para evitar este problema se utilizó un gradiente de Cs^+ para registrar los canales, una condición que, según se ha demostrado en los canales RyR de vertebrados, no afecta significativamente la respuesta del canal a agonistas, pero sí aumenta significativamente la amplitud de la corriente que pasa a través de los canales (Williams, 1992).

En estas condiciones estándares de registro (Cs^+ 200 mM *cis* / Cs^+ 50 mM *trans*) y en presencia de la $[Ca^{2+}]$ *cis* a la cual se observó la activación máxima de los canales (12 μ M), sólo se observaron canales que presentaban una I_{max} de 4 a 4,2 pA y un bajo P_o^* . En la Fig. 5A se muestra un registro de canal único que aumentó su P_o^* desde 0,007 en presencia de $[Ca^{2+}]$ 12 μ M a un P_o^* de 0,041 después de la adición de cafeína 2 mM. La activación por cafeína en el rango de concentraciones milimolares (2 a 4 mM) fue observada en todos los canales en los que fue evaluada (n=3).

Efecto de cADPR sobre la actividad de los canales de calcio

Bajo idénticas condiciones iónicas, la adición de concentraciones micromolares de cADPR al compartimento *cis* produjo en todos los casos un grado de activación mayor de los canales que el inducido por cafeína en concentraciones milimolares. En la Fig. 5B se muestra un

A

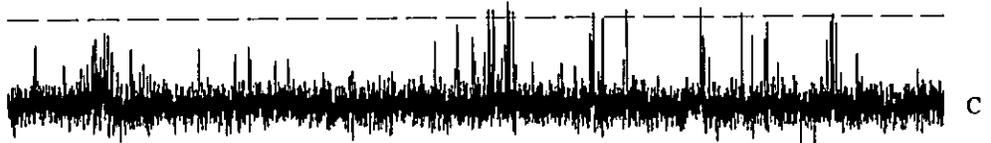
Control: $[Ca^{2+}]$ 12 μ M

$P_o^* : 0,007$



+ Cafeína, 2 mM

$P_o^* : 0,041$



B

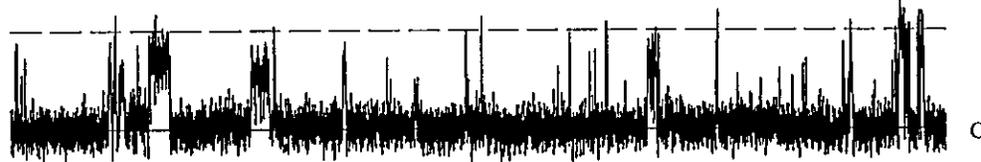
Control: $[Ca^{2+}]$ 12 μ M

$P_o^* : 0,006$



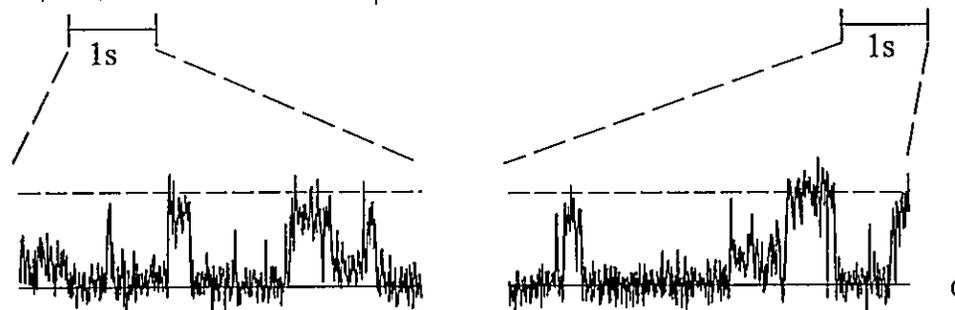
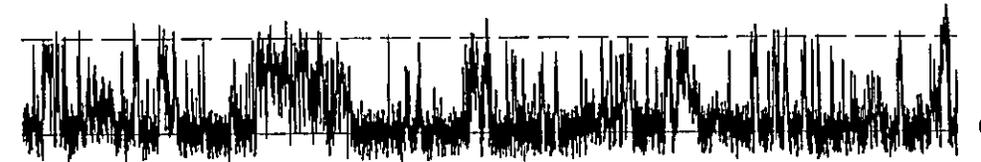
+ cADPR, 2 μ M

$P_o^* : 0,034$



+ cADPR, 5 μ M

$P_o^* : 0,110$



1 s

4 pA

registro del efecto de adiciones sucesivas de cADPR 2 y 5 μM sobre la actividad de un canal único. La actividad del canal aumentó desde un P_o^* basal de 0,006 en presencia de $[\text{Ca}^{2+}]$ 12 μM , a valores de P_o^* de 0,034 y 0,110 tras la adición de cADPR 2 y 5 μM , respectivamente. Estos canales sensibles a cADPR presentaron una cinética de activación en estallidos en los que la corriente fluctuó entre un nivel cerrado y múltiples niveles de subconductancia. Esta conducta del canal se aprecia aun mejor en la Fig. 5B (últimos dos registros) donde se muestra la escala de tiempo ampliada. Estos estados de subconductancia fueron consistentemente observados en todos los canales estudiados.

En presencia de $[\text{Ca}^{2+}]$ 12 μM *cis* el efecto de cADPR sobre el P_o^* fue dosis dependiente, alcanzando un valor de $0,099 \pm 0,014$ en cADPR 5 μM , la concentración de agonista más alta ensayada (Fig. 6). La activación de los canales por sobre la condición control sólo se observó a concentraciones de cADPR $\geq 0,5$ μM (Fig. 6, círculos negros). En presencia de Cs^+ 300 mM en la solución *cis*, concentraciones de cADPR tan bajas como 0,2 μM produjeron un aumento del P_o^* (Fig. 6, símbolos blancos). Este hecho sugiere que el aumento de $[\text{Cs}^+]$ *cis* aumentó la sensibilidad de los canales a la estimulación por cADPR. Este efecto es consistente con reportes previos que indican que la fuerza iónica modula el efecto de agonistas sobre los canales de calcio-RyR de vertebrados (Ogawa y Harafuji, 1990; Zucchi y Ronca-Testoni, 1997).

Para determinar si los canales activados por cADPR eran permeables a Ca^{2+} , se realizaron experimentos utilizando un gradiente de calcio en condiciones similares a las utilizadas en los experimentos de RyR purificado (Ca^{2+} 12 μM *cis* / Ca^{2+} 37 mM *trans*). En estas condiciones los canales fueron también activados por cADPR 1 μM (Fig. 7A, registro superior). Sin embargo, la amplitud máxima de corriente (I_{max}) obtenida con Ca^{2+} como ión portador de la corriente fue cuatro veces inferiores a la observada en Cs^+ (Fig. 7A, registro inferior). Al graficar la variación de la I_{max}

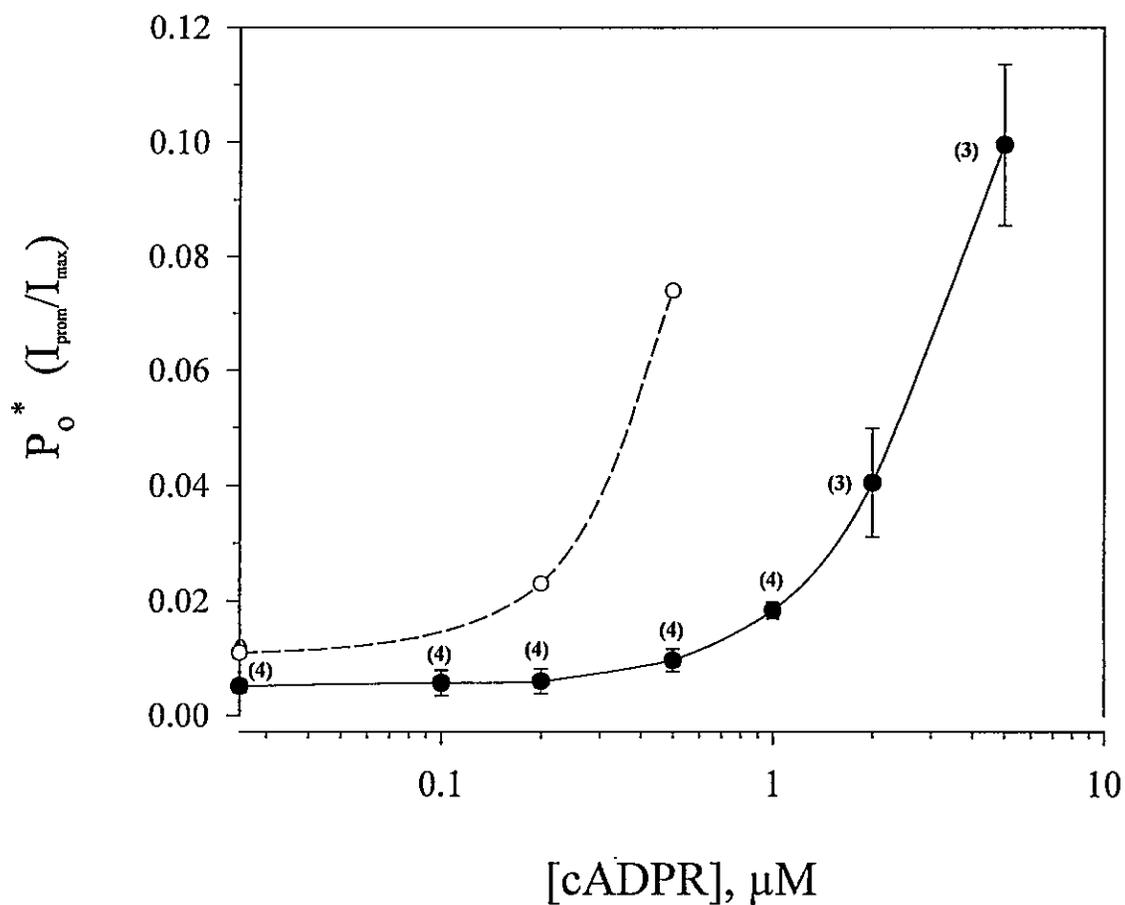


Figura 6

Efecto de la concentración de cADPR sobre la actividad del canal.

El efecto de [cADPR] en el P_o^* fue evaluado en distintos experimentos de canal único ($n = 4$), registrados en soluciones asimétrica de Metanosulfonato de Cesio de 200 mM *cis* / 50 mM *trans* (círculos llenos) y 300 mM *cis* / 50 mM *trans* (círculos vacíos). Los datos se presentan como promedio \pm E.S.

A

Corrientes de Ca^{2+}

$[\text{Ca}^{2+}]$ 12 μM + cADPR 1 μM

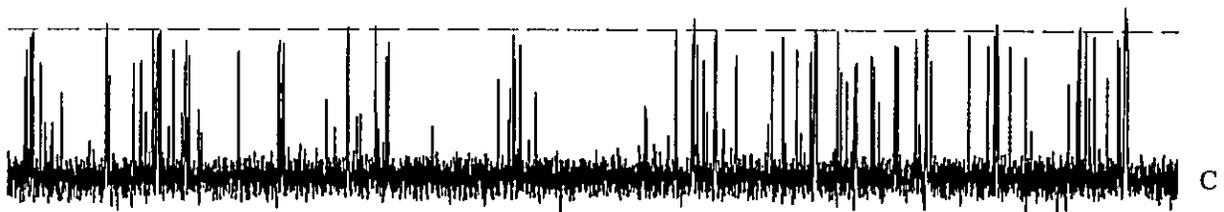
P_o^* : 0,048



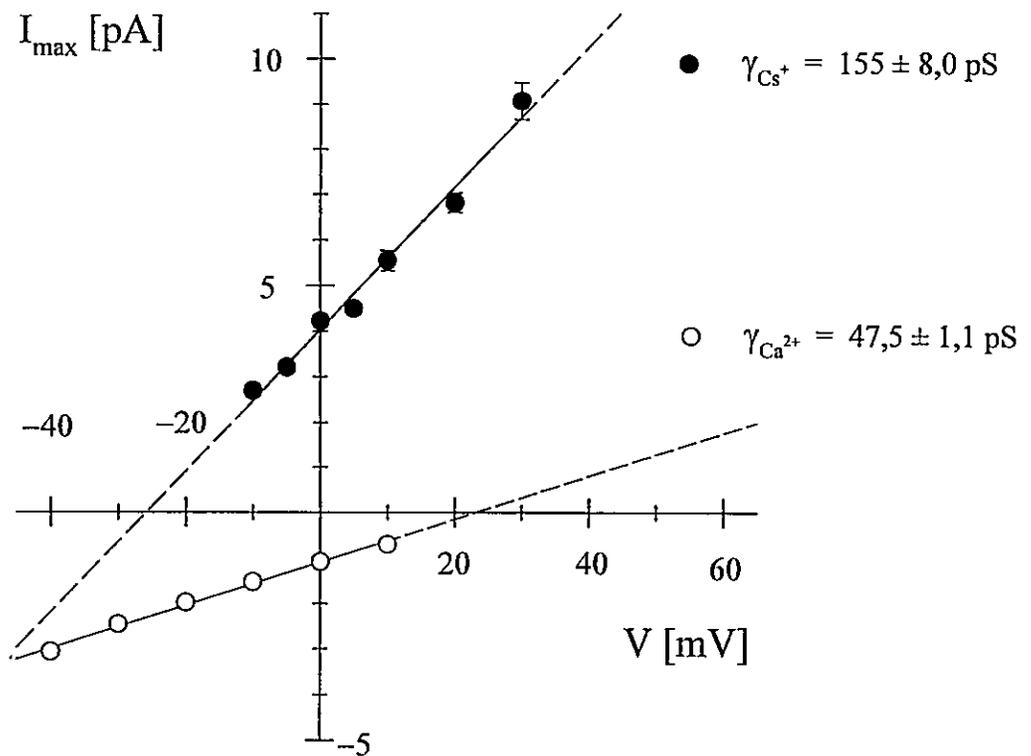
Corrientes de Cs^+

$[\text{Ca}^{2+}]$ 12 μM + cADPR 1 μM

P_o^* : 0,020



B



en relación con el voltaje (V) en los canales activados por cADPR en presencia de $[Ca^{2+}]$ 12 μ M *cis*, se observó que los canales de ovocito de erizo de mar presentaron una conductancia de $47,5 \pm 1,1$ pS para Ca^{2+} y de $155,0 \pm 8,0$ pS para Cs^+ (Fig. 7B). En los canales registrados con una gradiente asimétrica de Cs^+ (200 mM *cis* / 50 mM *trans*) la adición de $[Ca^{2+}]$ submilimolar al compartimento *trans* desplazó la curva I_{max}/V hacia la derecha alcanzándose un potencial positivo de inversión de la corriente, lo que implica que los canales poseen una permeabilidad mayor para Ca^{2+} que para Cs^+ .

IP₃ y heparina no afectan la actividad de los canales sensibles a cADPR de ovocitos de erizo

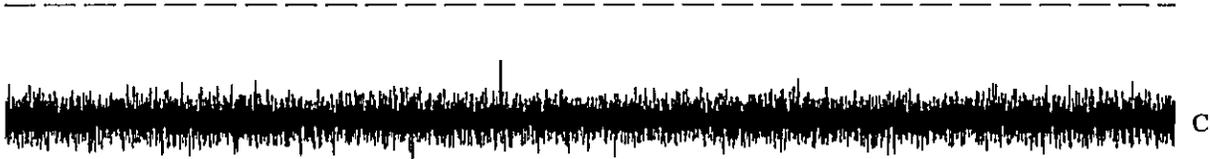
Los experimentos de liberación de Ca^{2+} en microsomas de ovocitos de erizo demostraron la presencia de la vía de liberación inducida por IP_3 . Esto, unido al hecho de que los canales activados por cADPR presentaron una conductancia al calcio de 47 pS, similar a la conductancia de 50 pS descrita para los canales de calcio R- IP_3 de vertebrados (Bezprozvanny y Ehrlich, 1994), hizo necesario evaluar el efecto de este agonista sobre la actividad de canal único. La adición de IP_3 2 μ M a la solución *cis*, en presencia de $[Ca^{2+}]$ 12 μ M, no tuvo efecto alguno sobre la actividad de los canales, ni tampoco interfirió con la posterior activación inducida por cADPR 5 μ M (Fig. 8, segundo y tercer registros). La disminución de la $[Ca^{2+}]$ *cis* desde 12 μ M a 0,72 μ M en la presencia continua de IP_3 2 μ M y cADPR 5 μ M no mostró la aparición de un segundo canal, distinto del activado por cADPR. Mas aún, esta disminución de la $[Ca^{2+}]$ en el compartimento *cis* produjo una disminución significativa de la actividad del canal, bajando el P_o^* desde 0,115 a 0,005 (Fig. 8, último registro). Esta disminución en la actividad, que ocurrió a niveles de $[Ca^{2+}]$ *cis* que favorecen la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 en homogeneizados de ovocitos de erizo de mar (Chini y Dousa, 1996a), demuestra: 1) que bajo las condiciones experimentales, que favorecen la activación de los canales de calcio activados por cADPR, IP_3

1 s

2 pA

Control: $[Ca^{2+}]$ 12 μ M

P_o^* : 0,002



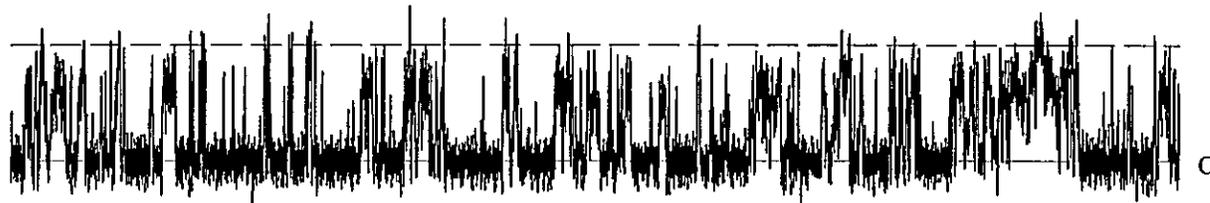
+ IP_3 2 μ M

P_o^* : 0,002



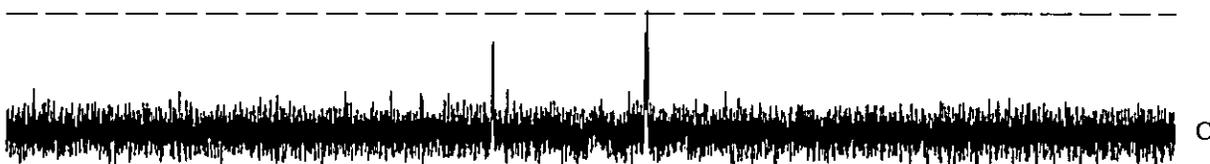
+ IP_3 2 μ M + cADPR 5 μ M

P_o^* : 0,115



$[Ca^{2+}]$ 0,72 μ M + IP_3 2 μ M
+ cADPR 5 μ M

P_o^* : 0,005



no tiene efecto sobre la actividad de estos canales y 2) que la activación de los canales inducida por cADPR requiere de $[Ca^{2+}]_{cis} > 0,72 \mu M$. No se observó efecto de IP_3 en ninguno de los tres experimentos en que se investigó su acción.

La adición de heparina en el rango de concentraciones de 300 a 600 $\mu g/ml$, que inhiben completamente la liberación de calcio inducida por IP_3 en homogeneizados de ovocitos de erizo de mar (Galione y cols., 1993), no afectó significativamente a los canales activados por cADPR 5 μM en presencia de $[Ca^{2+}] 12 \mu M$ (Fig. 9). En cambio, adiciones posteriores de Rojo de Rutenio, un inhibidor de los canales-RyR, disminuyeron significativamente la actividad de los canales ($n=2$) desde un P_o^* de $0,127 \pm 0,028$, en presencia de heparina 600 $\mu g/ml$ y cADPR 5 μM , a un P_o^* de $0,008 \pm 0,004$ tras la adición de 30 μM Rojo de Rutenio (Fig. 9). Estos resultados confirman que bajo las condiciones experimentales utilizadas para observar activación por cADPR de canales de calcio de ovocitos de erizo de mar, los agonistas y bloqueadores de los $R-IP_3$ no afectan significativamente su actividad.

Efecto de calmodulina y Rojo de Rutenio sobre la actividad de los canales sensibles a cADPR

Se ha reportado que la liberación de Ca^{2+} inducida por cADPR en microsomas de ovocitos de erizo de mar tiene un requerimiento absoluto de calmodulina (Lee y cols., 1994a; Tanaka y Tashjian, 1995; Lee y cols., 1995). Para evaluar el efecto de calmodulina sobre la actividad de los canales sensibles a cADPR, se adicionó al lado *cis* 4 $\mu g/ml$ (0,24 μM) de calmodulina a un canal previamente activado por cADPR 2 μM en $[Ca^{2+}] 12 \mu M$ *cis*, sin observarse modificaciones de la actividad del canal (Fig. 10, tercer registro). De igual forma, la calmodulina no tuvo efectos en la actividad de los canales activados por cADPR cuando la $[Ca^{2+}]$ en el compartimento *cis* fue reducida a 0,72 μM (registro no mostrado). Estos resultados sugieren que en nuestros experimentos la calmodulina se encuentra ya asociada con los canales

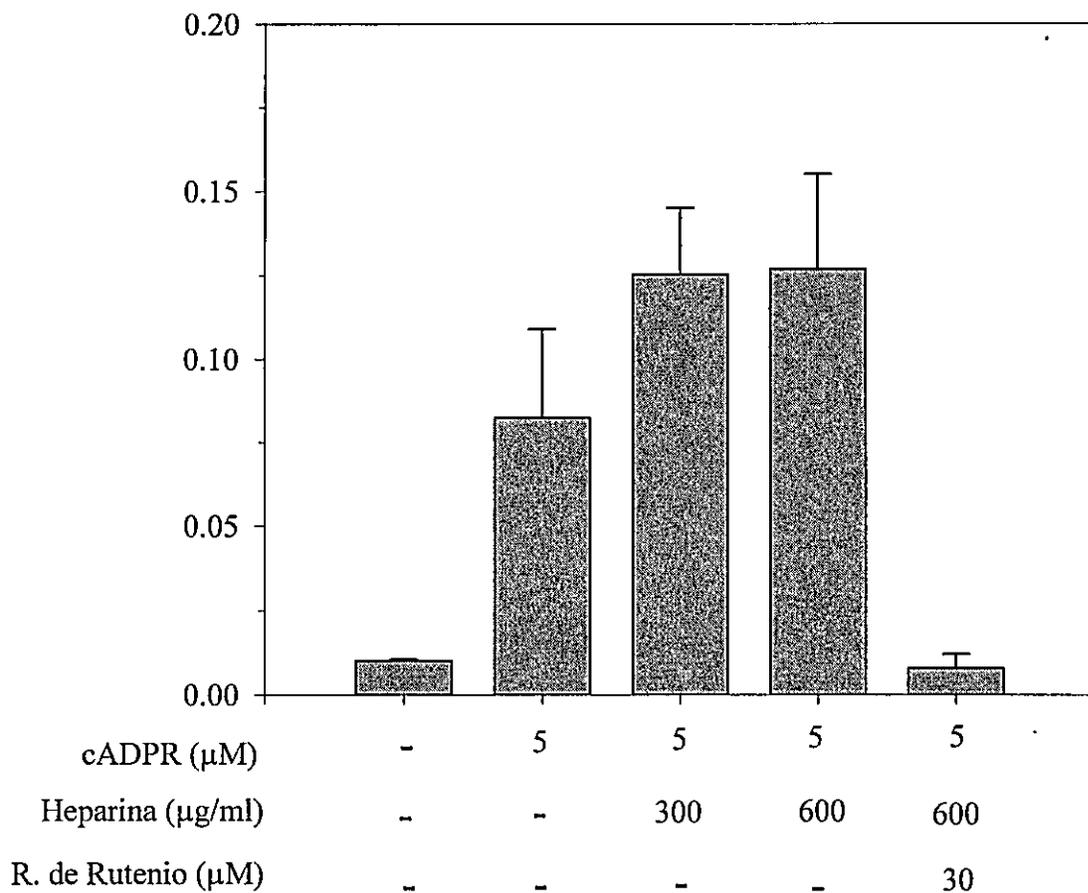


Figura 9

Los canales de ovocitos de erizo sensibles a cADPR no son bloqueados por heparina.

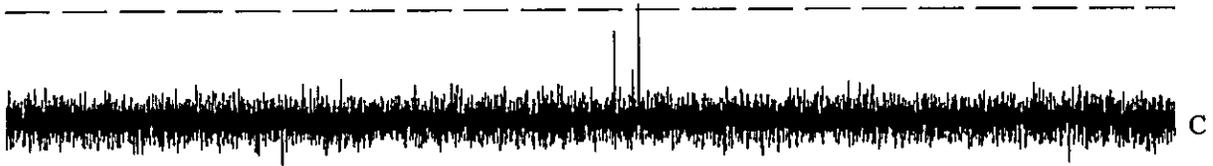
La adición heparina, 300 a 600 μg/ml, que inhiben a los R-IP₃ en homogeneizados de ovocitos de erizo no tuvo efectos significativos sobre los canales activados por cADPR 5 μM. En estas condiciones la subsecuente adición de Rojo de Rutenio 30 μM inhibió significativamente la actividad de los canales (n=2). Los datos están presentados como promedio ± rango

Control : $[Ca^{2+}]$ 12 μ M

P_o^* : 0,005

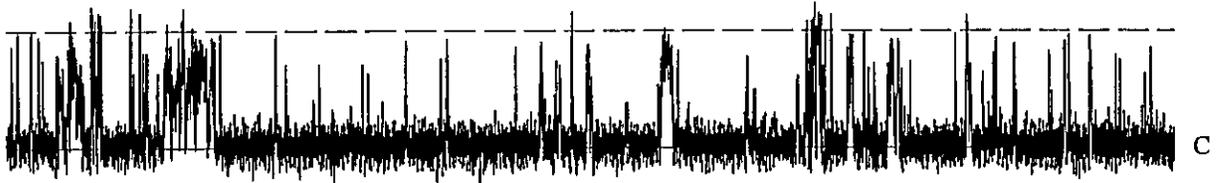
1 s

2 pA



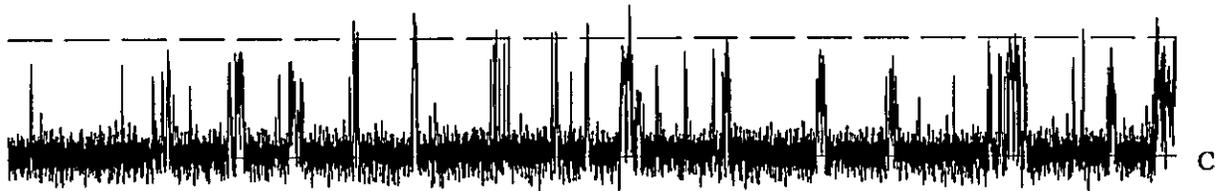
+ cADPR 2 μ M

P_o^* : 0,055



+ cADPR 2 μ M + CaM 4 μ g/ml

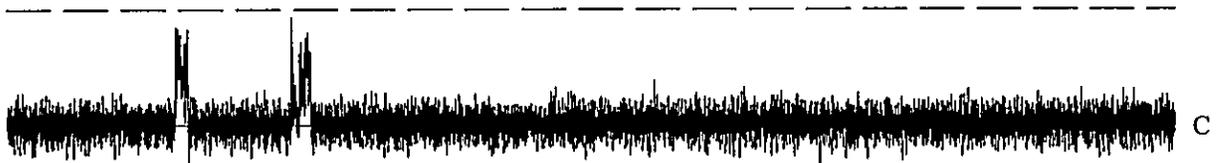
P_o^* : 0,063



+ cADPR 2 μ M + CaM 4 μ g/ml

+ Rojo de Rutenio 20 μ M

P_o^* : 0,005



fusionados en las bicapas. Contrastando con la falta de efecto de calmodulina, la posterior adición de Rojo de Rutenio produjo una marcada inhibición, disminuyendo el P_o^* desde 0,063 a 0,005 (Fig. 10, último registro).

Efecto de la $[Ca^{2+}]$ citoplasmático sobre la actividad del canal sensible a cADPR

En ausencia de cADPR las variaciones de la $[Ca^{2+}]$ *cis* entre 0,7 μ M y 270 μ M tuvieron sólo un modesto efecto activador sobre la actividad del canal (Fig. 11 círculos vacíos); el P_o^* subió desde valores $< 0,003$ en $[Ca^{2+}]$ 0,7 μ M *cis* a valores en el rango de 0,01 a $[Ca^{2+}]$ 12 μ M. No se observaron variaciones de P_o^* al aumentar $[Ca^{2+}]$ *cis* de 12 a 30 μ M. Incrementos mayores de la $[Ca^{2+}]$ hasta 270 μ M indujeron una disminución en la actividad del canal, con un valor de P_o^* promedio de 0,006.

En presencia de cADPR 1 μ M los canales presentaron un perfil de actividad en relación con la concentración de Ca^{2+} similar al observado en ausencia de cADPR, pero con un nivel de activación mayor. Aumentos en la $[Ca^{2+}]$ *cis* por sobre 1 μ M tuvieron un marcado efecto estimulador sobre la actividad del canal (Fig. 11, círculos llenos), como se observa en el aumento del P_o^* a valores cercanos a 0,035. Al igual que en ausencia de cADPR, la actividad del canal permaneció constante en el rango de $[Ca^{2+}]$ *cis* de 12-30 μ M. Aumentos posteriores de la $[Ca^{2+}]$ hasta 60 μ M *cis* produjeron una disminución del P_o^* a valores promedio del orden de 0,020.

En las condiciones experimentales utilizadas para registrar actividad de canales, cADPR 1 μ M no activó los canales a $[Ca^{2+}] \leq 0,7 \mu$ M *cis* (Fig. 11). Sin embargo, como se mostró en la Fig. 4, la adición de cADPR 1 μ M indujo liberaciones de Ca^{2+} desde microsomas de ovocitos cargados activamente con Ca^{2+} y en presencia de $[Ca^{2+}] \approx 0,4 \mu$ M en el medio extravésicular. Más aún, se ha descrito que concentraciones de cADPR tan bajas como 10 nM pueden activar la liberación de

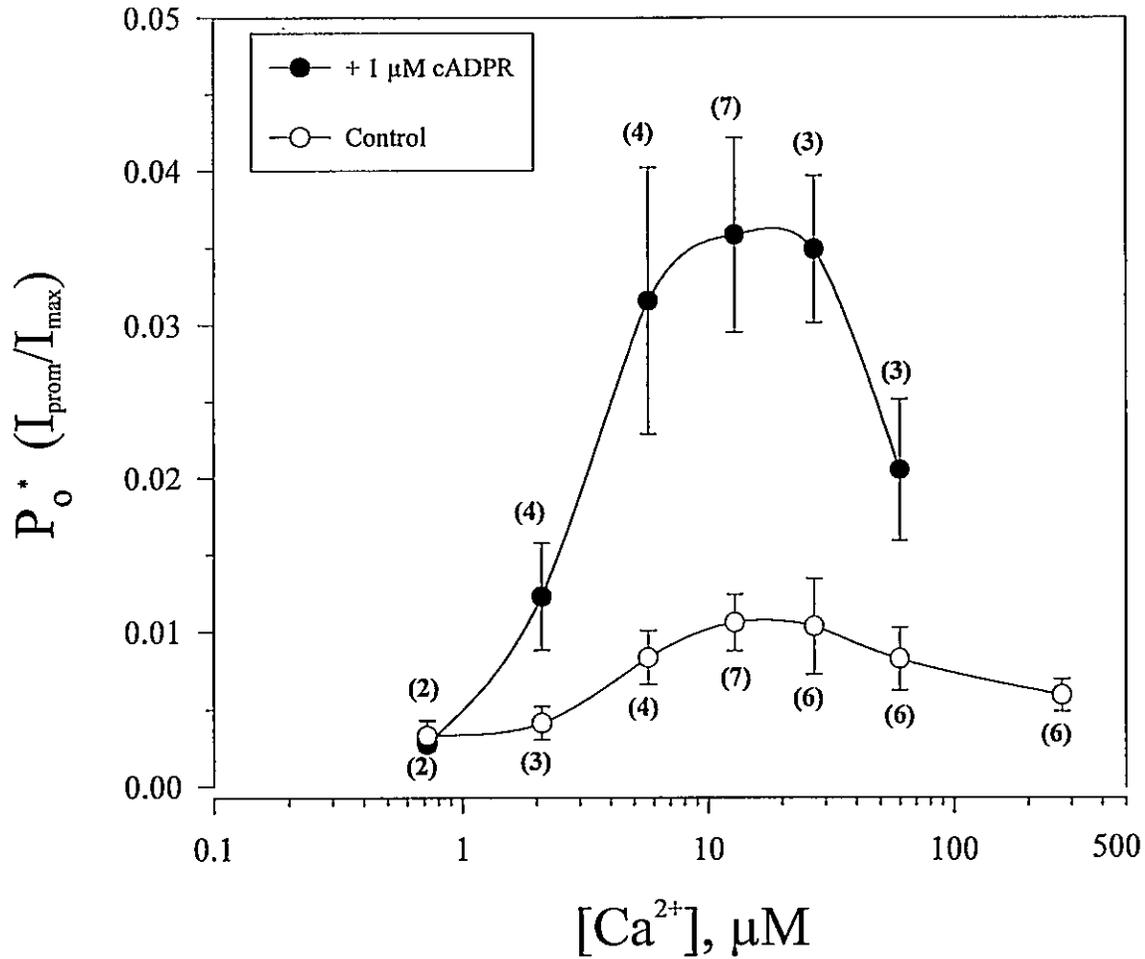


Figura 11

Efecto de la [Ca²⁺]_{cis} sobre el P_o^{} de los canales de calcio de ovocitos de erizo.*

La variación de actividad de los canales en relación a la [Ca²⁺]_{cis} se midió en ausencia (*círculos vacíos*) y en presencia (*círculos llenos*) de cADPR 1 μM en el compartimento *cis*. En ambos casos los canales presentaron un perfil de activación en forma de campana, con un óptimo de activación en el rango [Ca²⁺]_{cis} 10 – 30 μM. Los datos están presentados como promedio ± E.S., con el número de determinaciones hechas en cada condición en paréntesis al lado del símbolo. Las líneas graficadas no representan un ajuste teórico.

Ca^{2+} desde homogeneizados de ovocitos de erizo cargados activamente con Ca^{2+} (Galione y cols., 1993). Debido a que existen importantes diferencias entre las condiciones usadas en los experimentos de liberación de Ca^{2+} y los de bicapas planas, tales como la presencia de concentraciones milimolares de Mg^{2+} y ATP en el medio extravesicular en los experimentos de liberación de Ca^{2+} , se evaluó si la actividad de los canales sensibles a cADPR era modificada por la presencia de ATP o de Mg^{2+} en la solución *cis*.

Efecto de ATP en la actividad de los canales sensibles a cADPR

En la Fig. 12A se muestra que la adición de ATP 2 mM al compartimento *cis*, en presencia de $[\text{Ca}^{2+}]$ 12 μM , indujo una significativa estimulación del canal, aumentando el P_o^* desde 0,007 a 0,022. Adiciones posteriores de cADPR 0,5 μM no incrementaron la actividad del canal sino que indujeron una leve reducción del P_o^* a 0,015 (registro no mostrado). Mas aún, aumentos en la concentración de cADPR hasta 2 μM en presencia de ATP no estimularon la actividad del canal, ya que el P_o^* permaneció en el valor de 0,015 (Fig. 12A, tercer registro). Después de remover el ATP por lavado del compartimento *cis*, y en presencia de $[\text{Ca}^{2+}]$ 12 μM , el canal recuperó la baja actividad obtenida previamente en presencia sólo de Ca^{2+} , con un P_o^* de 0,005. En estas condiciones, la adición de cADPR 1 μM aumentó la actividad del canal hasta un valor de P_o^* de 0,032 (Fig. 12B, últimos dos registros). Estos resultados indican que el efecto del ATP sobre la actividad del canal es totalmente reversible y no es potenciado por cADPR. En concordancia con estos resultados, la adición de ATP 1-2 mM en el compartimento *cis* no indujo activación adicional sobre canales previamente activados por cADPR en ninguno de los experimentos en que se evaluó su efecto (n=3).

Efecto de Mg^{2+} sobre los canales activados por cADPR

Para analizar el efecto de Mg^{2+} en la actividad de los canales de calcio sensibles a cADPR, la $[Ca^{2+}]_{cis}$ fue mantenida en $24 \mu M$; esta concentración está en el rango de $[Ca^{2+}]$ que indujo la mayor activación de los canales (ver Fig. 11). En la Fig. 13 se observa un registro de canal único cuyo P_o^* aumentó desde 0,003 a 0,020 luego de la adición de cADPR $1 \mu M$. La adición posterior de Mg^{2+} $1 mM$ a la solución *cis* no sólo no indujo un efecto inhibitorio, como ocurre con los RyR de músculo esquelético, sino que incrementó significativamente la actividad del canal, aumentando el $P_o^* \approx 13$ veces, desde un valor de 0,020 a 0,256 (Fig. 13). La adición de Mg^{2+} $1 mM$ en ausencia de cADPR no modificó la actividad del canal (registros no mostrados).

Al estudiar el efecto potenciador del Mg^{2+} sobre los canales activados por cADPR se encontró que no todos los canales estudiados presentaron el mismo grado de activación por Mg^{2+} . En la Fig. 14 se muestra un ejemplo de un canal único que en presencia de $[Ca^{2+}]$ $24 \mu M$ *cis* aumentó su actividad desde un P_o^* de 0,009 a 0,012 luego de la adición de cADPR $1 \mu M$ (Fig. 14, primero y segundo registros). Tras la adición de Mg^{2+} $1 mM$ este canal único sólo incrementó en 4,4 veces su actividad, alcanzando a un valor de P_o^* de 0,053 (Fig. 14, último registro).

Un resumen de estos resultados se presenta en la Fig. 15, que ilustra la sensibilidad a cADPR de los canales que presentaron los dos tipos de respuesta a la estimulación por Mg^{2+} $1 mM$. Los canales que presentaron la mayor sensibilidad a cADPR en presencia de Mg^{2+} (Fig. 15, símbolos negros) fueron claramente activados a $[cADPR]$ tan bajas como $0,1 \mu M$, con una aparente saturación a cADPR $1-2 \mu M$. Los canales que en presencia de Mg^{2+} presentaron una menor sensibilidad a cADPR requirieron a su vez mayores $[cADPR]$ ($> 0,5 \mu M$) para ser activados y no fueron saturados en el rango de $[cADPR]$ estudiado (Fig. 15, símbolos vacíos).

1 s

2 pA

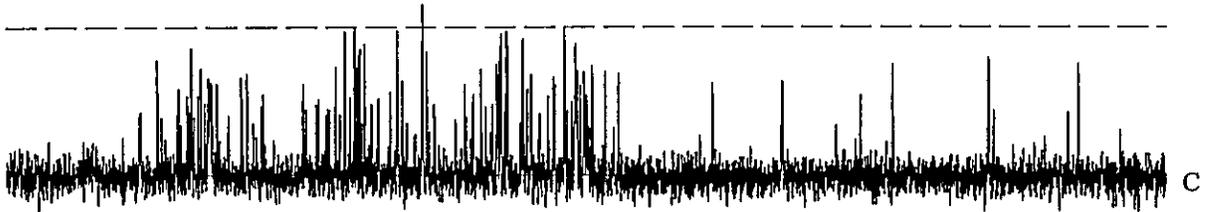
Control : $[Ca^{2+}]$ 24 μ M

P_o^* : 0,003



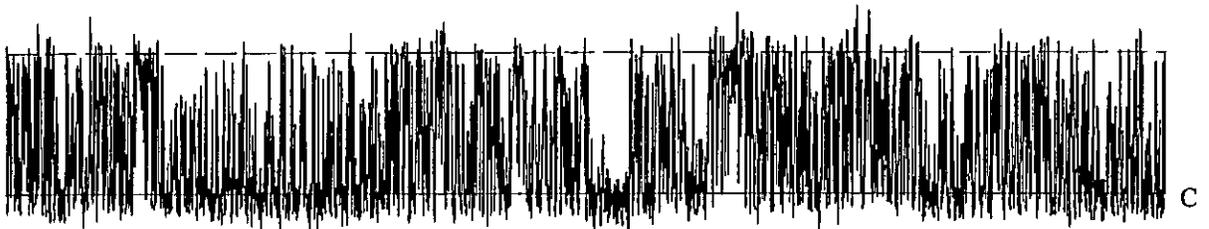
+ cADPR 1 μ M

P_o^* : 0,020



+ cADPR 1 μ M + Mg^{2+} 1 mM

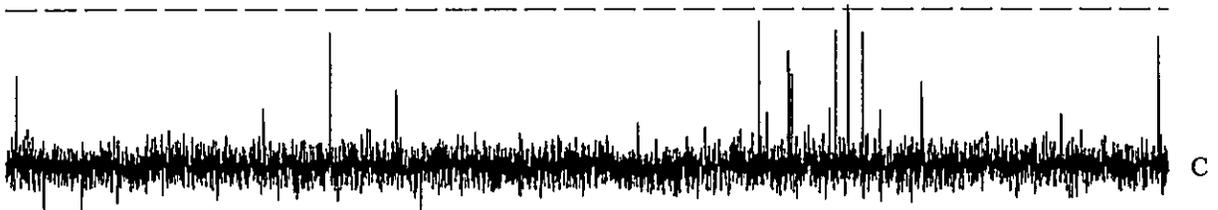
P_o^* : 0,256



1 s
2 pA

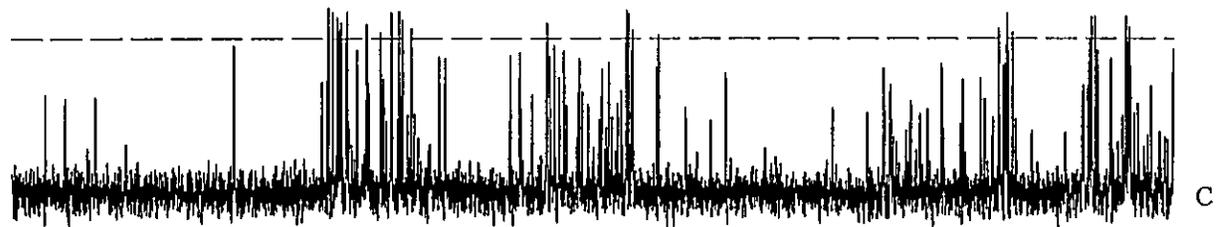
Control : $[Ca^{2+}]$ 24 μ M

P_o^* : 0,009



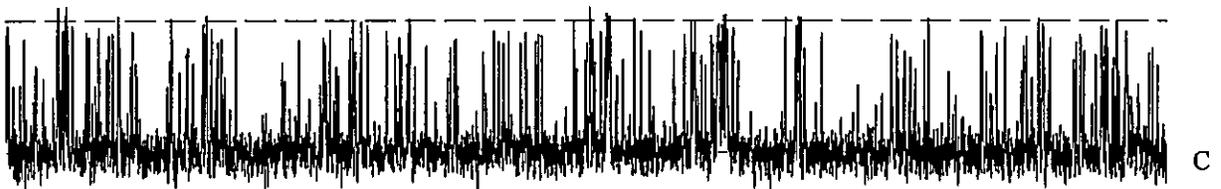
+ cADPR 1 μ M

P_o^* : 0,012



+ cADPR 1 μ M + Mg^{2+} 1 mM

P_o^* : 0,053



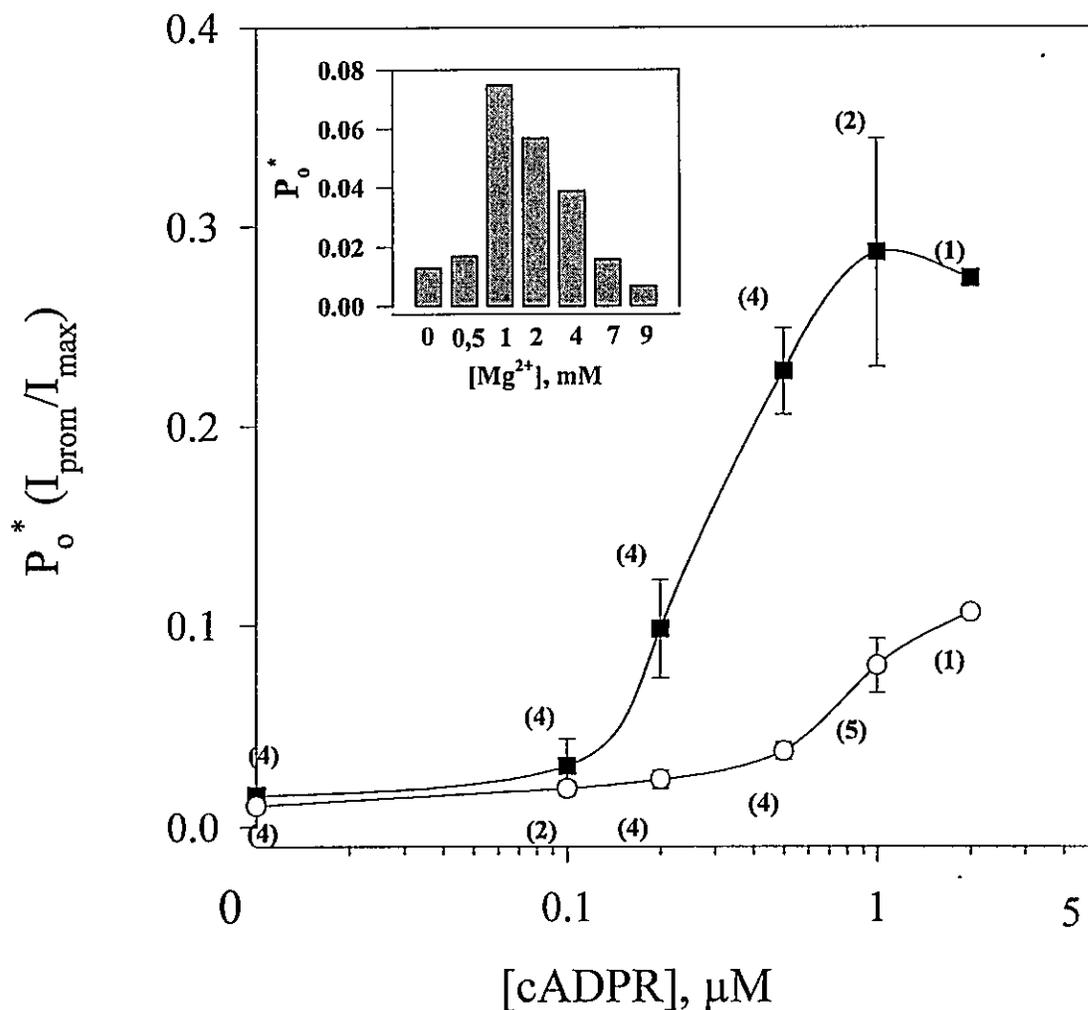


Figura 15

Dosis respuesta de cADPR en presencia de Mg^{2+} de canales de microsomas de ovocito de erizo.

El efecto de $[cADPR]$ *cis* sobre la actividad de canales se determinó en la presencia combinada de Mg^{2+} 1 mM y $[Ca^{2+}]$ 24 μM en la solución *cis*. La actividad de canal está expresada como P_o^* y los datos están presentados como promedio \pm E.S o rango, con el número de determinaciones hechas en cada condición en paréntesis al lado del símbolo. Las líneas graficadas no representan un ajuste teórico. Los símbolos corresponden a los canales que fueron más (*símbolos llenos*) o menos (*símbolos vacíos*) activados tras la adición de Mg^{2+} 1 mM a la solución *cis* que contenía cADPR 1 μM y $[Ca^{2+}]$ 24 μM . **Inserto:** Estudio del efecto de concentraciones crecientes de Mg^{2+} sobre el P_o^* de un canal único activado por cADPR 1 μM . Estos datos corresponden a un canal que presentó baja sensibilidad a la activación por Mg^{2+} 1 mM.

El estudio de la respuesta de los canales menos sensibles a la activación por cADPR en presencia de Mg^{2+} mostró que concentraciones de Mg^{2+} superiores a 1 mM fueron menos efectivas en potenciar el efecto activador de cADPR sobre los canales. Aun más, la activación de los canales por cADPR fue claramente menor en presencia de Mg^{2+} 9 mM que en ausencia del catión (Fig. 15, inserto).

Estos resultados muestran que en la presencia combinada de $[Ca^{2+}]$ μM y de $[Mg^{2+}]$ 1 mM algunos de los canales presentaron un marcado incremento en su sensibilidad a la activación por cADPR. Esto indica que el Mg^{2+} , que es uno de los componentes presentes en los experimentos de liberación de Ca^{2+} en vesículas, puede hacer a los canales más sensibles a la acción de cADPR. Sin embargo, a valores submicromolares de $[Ca^{2+}]$ *cis* los canales no fueron consistentemente activados por la adición de cADPR, aun en presencia de Mg^{2+} 1 mM. Por lo tanto, no es posible atribuir al Mg^{2+} la diferencia en el requerimiento de mayores $[Ca^{2+}]$ *cis* observada en los experimentos de activación de canales por cADPR, en comparación con los experimentos de liberación de Ca^{2+} en microsomas.

Efecto de antagonistas de calmodulina sobre la actividad de canales sensibles a cADPR

Como se presentó en la Fig. 10, los canales sensibles a cADPR no fueron afectados por la presencia de calmodulina, aun a concentraciones (4 $\mu g/ml$) que inducen máxima activación de la liberación de Ca^{2+} en microsomas de ovocitos de erizo de mar (Lee y cols., 1994a; Tanaka y Tashjian, 1995; Lee y cols., 1995). Como se ha demostrado que la calmodulina es esencial para que ocurra la liberación de Ca^{2+} inducida por cADPR en estos microsomas (Lee y cols., 1994a), la falta de efecto de calmodulina en la actividad de canal único podría reflejar la presencia de calmodulina endógena asociada con el canal en la bicapa. Para evaluar esta hipótesis, examinamos el efecto de W-7, un antagonista de calmodulina (Hartshorne, 1985) sobre la

actividad de los canales activados por cADPR. En la Fig. 16 se presenta un ejemplo de registro de canal único activado por cADPR que presenta un valor de P_o^* de 0,274 en condiciones óptimas, esto es, en la presencia combinada de $[Ca^{2+}]$ 24 μ M, $[Mg^{2+}]$ 1 mM y cADPR 2 μ M en la solución *cis*. En estas condiciones, la adición de W-7 10 μ M redujo la actividad del canal a un valor de P_o^* de 0,047 (Fig. 16, segundo registro). Para probar la especificidad de este efecto, se adicionó calmodulina exógena a una concentración de 10 μ M a la solución *cis*, luego de lo cual el canal incrementó su P_o^* a 0,223, un valor similar al valor de P_o^* observado en ausencia de W-7 (Fig. 16, tercer registro). Un efecto inhibitorio comparable al obtenido con W-7 fue observado al utilizar Calmidazolium, otro antagonista de calmodulina (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que los canales de microsomas de ovocitos de erizo de mar fusionados en bicapas contendrían suficiente calmodulina endógena para dar cuenta de la activación del canal por cADPR.

II. MODULACION DE LA ACTIVIDAD DE CANALES RyR PURIFICADOS DE MUSCULO ESQUELETICO DE ANFIBIO

Modulación de la actividad de canales RyR purificados por la $[Ca^{2+}]$ citoplasmática.

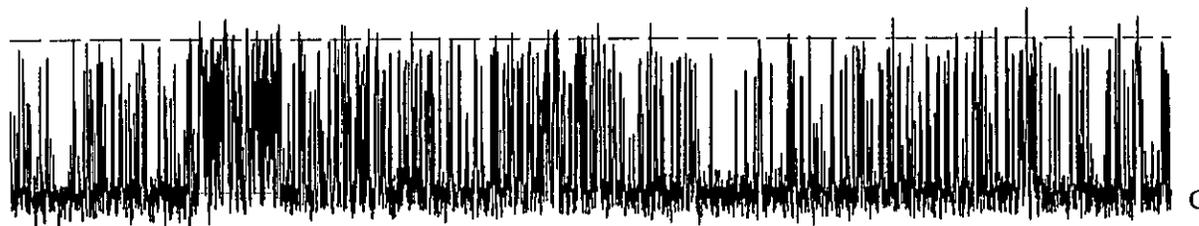
El Ca^{2+} es el agonista fisiológico más importante en la generación del proceso de CICR. Sin embargo, no existen estudios detallados de la dependencia de Ca^{2+} de canales-RyR purificados. El análisis de los registros de canal único mostró que, al igual que los canales nativos, los canales-RyR purificados de músculo esquelético de anfibio cambiaron su P_o^* en función de la $[Ca^{2+}]$ en el compartimento *cis*. Los canales RyR purificados de músculo esquelético manifestaron los tres tipos de respuestas frente al calcio citoplasmático que han sido descritos en canales nativos (Fig. 17). Ellos son:

1 s

2 pA

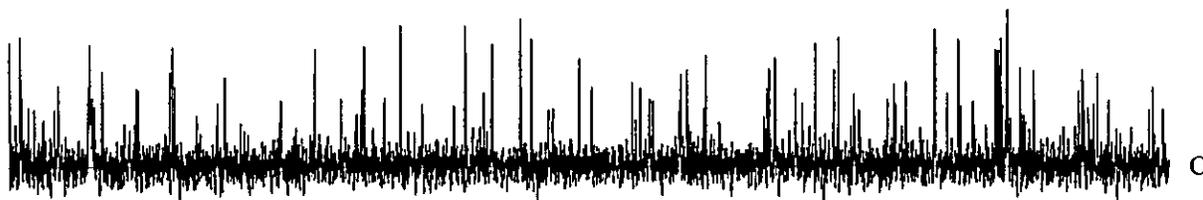
[Ca²⁺] 24 μM + Mg²⁺ 1 mM + cADPR 2 μM

P_o^{*}: 0,274



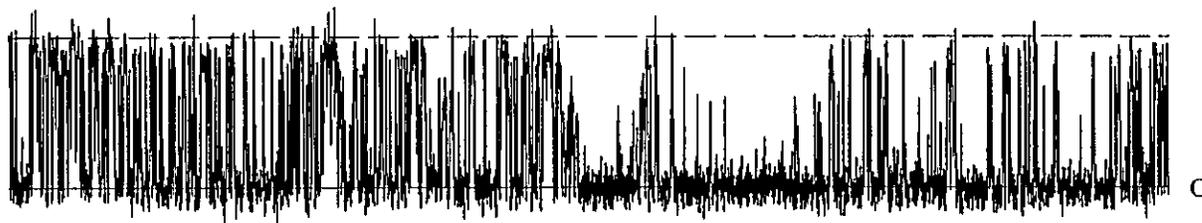
+ Mg²⁺ 1 mM + cADPR 2 μM
+ W-7 10 μM

P_o^{*}: 0,047



+ Mg²⁺ 1 mM + cADPR 2 μM + W-7 10 μM
+ Calmodulina 10 μM

P_o^{*}: 0,223



[Ca²⁺], *cis*

Canal tipo C

$P_o^* : 0,882$



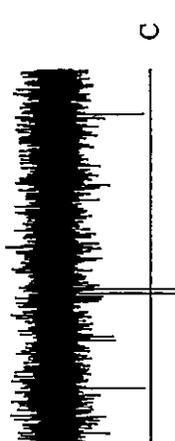
500 μM

$P_o^* : 0,924$



100 μM

$P_o^* : 0,966$



10 μM

$P_o^* : 0,366$



1 μM

$P_o^* : 0,142$



0,1 μM

Canal tipo MEM

$P_o^* : 0,299$



$P_o^* : 0,348$



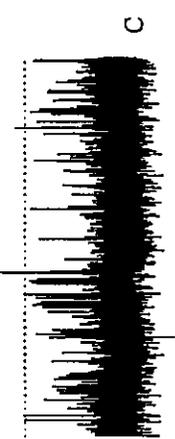
$P_o^* : 0,147$



$P_o^* : 0,128$

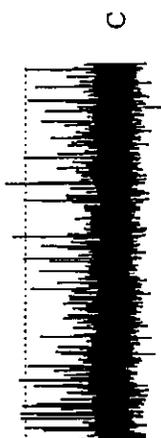


$P_o^* : 0,045$



Canal tipo Bajo P_o

$P_o^* : 0,034$



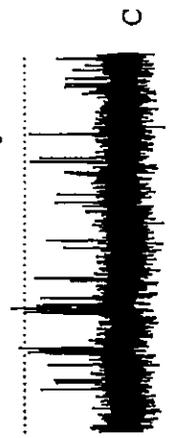
$P_o^* : 0,058$



$P_o^* : 0,038$



$P_o^* : 0,032$



1- Canales tipo **Bajo P_o^*** : Estos son canales que presentaron la menor sensibilidad a la activación por calcio, con valores de P_o^* que no superan 0,10 (Fig.18, cuadrados negros). Esta corresponde a la forma de respuesta observada más frecuentemente (6 canales de un total de 12).

2- Canales tipo **MEM**: Se caracterizaron por presentar un $P_o^*_{max} > 0,1$ y una dependencia de calcio en forma de campana. Presentaron activación en el rango de $[Ca^{2+}]$ *cis* de 0,1 a 30 μM , e inhibición por $[Ca^{2+}]$ en el rango de 100 a 500 μM (Fig. 18, diamantes vacíos, 4 canales de un total de 12).

3- Canales tipo **C**: En el rango de $[Ca^{2+}]$ estudiado no manifestaron inhibición por Ca^{2+} (Figura 18, círculos llenos). Estos canales presentaron mayor actividad que los canales con dependencias del tipo **Bajo P_o^*** y **MEM** en el rango de $[Ca^{2+}]$ *cis* de 1 a 10 μM , llegando a valores de P_o^* cercanos a 1,0. Esta dependencia de calcio corresponde al tipo de respuesta menos frecuentemente encontrada (2 de un total de 12 canales).

El efecto de cADPR depende del tipo de respuesta a la $[Ca^{2+}]$ de los canales-RyR purificados

Para evaluar el efecto de cADPR sobre la actividad de los canales-RyR de músculo esquelético de vertebrados, se estudió el efecto de cADPR sobre canales-RyR purificados de músculo esquelético de anfibio. Con este propósito, se analizó el efecto de cADPR en relación con el tipo de dependencia de Ca^{2+} que ellos manifestaron. En las condiciones de registro utilizadas, no se observó activación por concentraciones micromolares de cADPR de ninguno de los canales-RyR purificados que presentaron dependencia de Ca^{2+} del tipo **Bajo P_o** (6 canales **Bajo P_o** de un total de 12 canales). Un ejemplo de esto se ilustra en la Fig. 19, que muestra que concentraciones crecientes de cADPR (0,5 – 5 μM), en presencia de $[Ca^{2+}]$ 10 μM *cis*, no tuvieron efecto sobre la actividad de

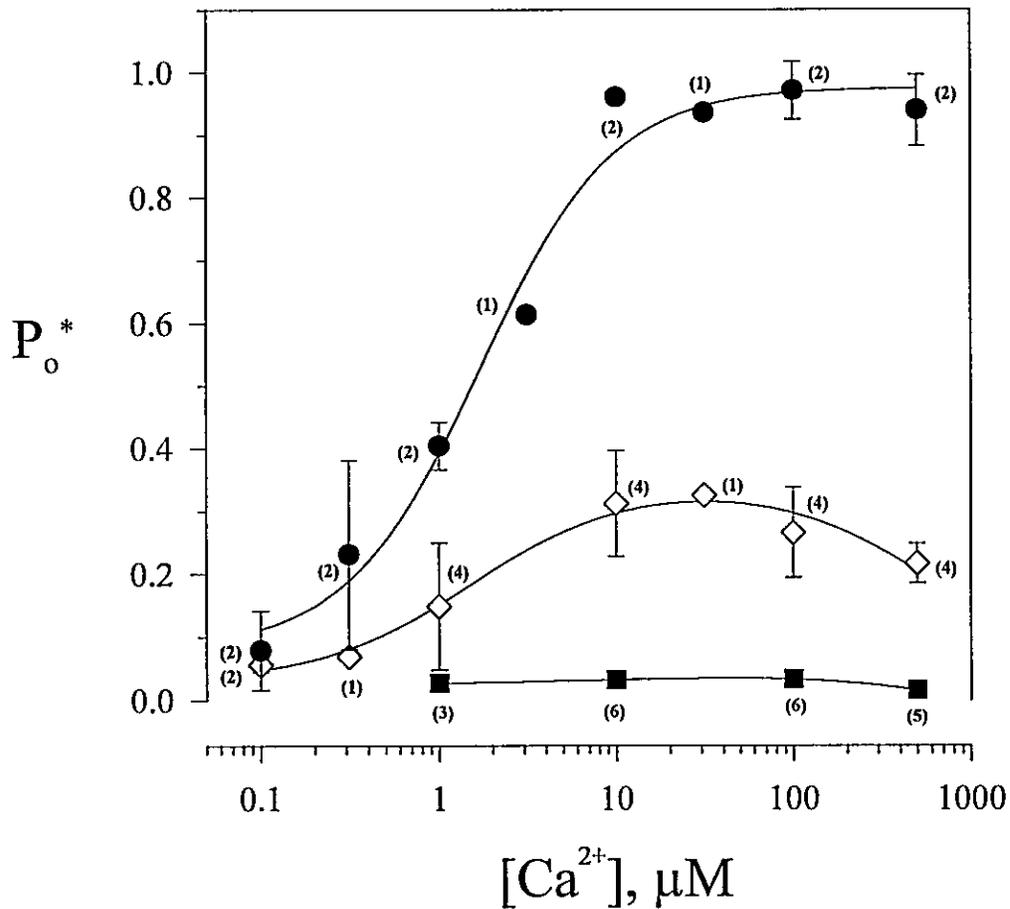


Figura 18

Curvas de dependencia de $[Ca^{2+}]$ de RyR purificados de músculo esquelético de anfibio.

Variación de la actividad de los canales-RyR en relación a la $[Ca^{2+}]$ *cis*. Se reconocieron tres tipos de respuesta frente a la $[Ca^{2+}]$ citosólica: canales tipo **Bajo P_o^*** (*cuadrados negros*), canales tipo **MEM** (*diamantes vacíos*) y canales tipo **C** (*círculos llenos*). La actividad de los canales está expresada como P_o^* y los datos están presentados como promedio \pm E.S. o rango, con el número de determinaciones obtenidas en paréntesis al lado del símbolo. Las líneas graficadas no representan un ajuste teórico.

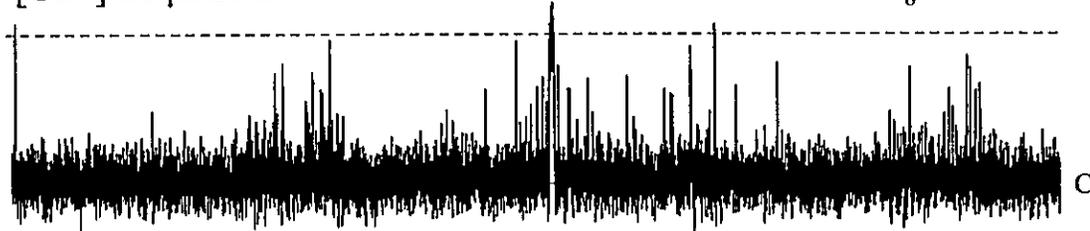
Canales tipo Bajo P_o

500 ms

2 pA

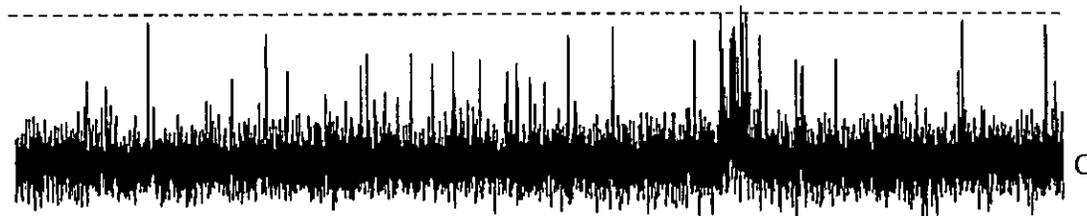
$[Ca^{2+}]$ 10 μM *cis*

P_o^* : 0,026



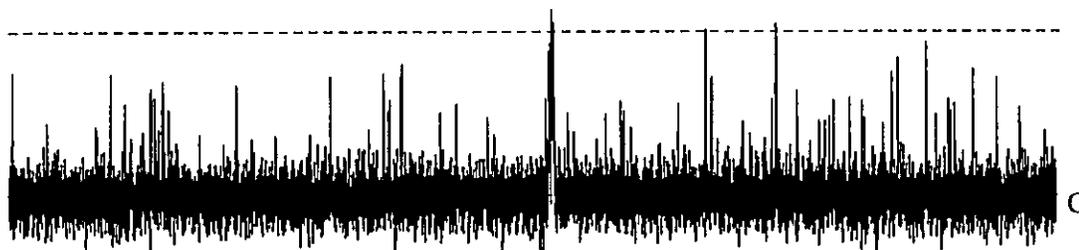
+ cADPR 0,5 μM *cis*

P_o^* : 0,019



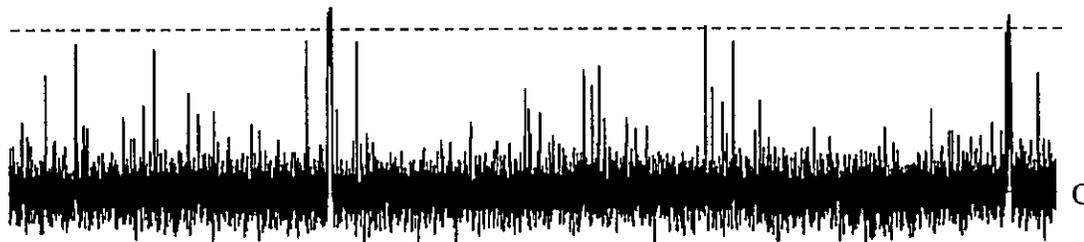
+ cADPR 1 μM *cis*

P_o^* : 0,021



+ cADPR 5 μM *cis*

P_o^* : 0,017



los canales que originalmente presentaron una dependencia de tipo **Bajo P_o^*** . Además, la adición de calmodulina exógena no modificó la actividad de los canales con dependencia de Ca^{2+} del tipo **Bajo P_o^*** en presencia de cADPR en ninguno de los experimentos en que esta se evaluó (n=3). Un ejemplo de esto se presenta en la Fig. 20.

De igual forma, los canales con respuestas a $[Ca^{2+}]_{cis}$ del tipo **C** (2 canales tipo **C** de un total de 12 canales) no fueron activados por concentraciones micromolares de cADPR. En la Fig. 21 se muestran registros de un canal único con dependencia de Ca^{2+} del tipo **C**, que en presencia de $[Ca^{2+}]$ 0,1 μM *cis* tuvo un P_o^* de 0,142. La adición de cADPR 3 μM no afectó la actividad del canal. En un experimento similar la adición de concentraciones crecientes de cADPR (hasta 5 μM) tampoco modificó la actividad del canal. En presencia de cADPR 3 μM la adición de concentraciones crecientes de calmodulina (2 y 4 $\mu g/ml$) no tuvo efecto sobre la actividad de los canales con dependencia de Ca^{2+} tipo **C** en $[Ca^{2+}]$ 0,1 μM *cis* (Fig. 21, dos últimos registros).

A diferencia de los anteriores, todos los canales que presentaron dependencia de calcio del tipo **MEM** (4 canales **MEM** de un total de 12 canales) mostraron una activación significativa por $[cADPR]$ micromolares. En la Fig. 22 se muestra el registro de un canal único con dependencia de Ca^{2+} del tipo **MEM**, que presentó un P_o^* de 0,012 en presencia de $[Ca^{2+}]$ 1 μM *cis*. En estas condiciones adiciones sucesivas de cADPR 0,5 y 1 μM produjeron un aumento significativo de la actividad del canal a valores de P_o^* de 0,058 y 0,103, respectivamente (Fig. 22, últimos dos registros).

Se ha descrito recientemente que el estado redox que presentan las vesículas del RS determina la respuesta del canal al calcio como agonista, modificando el tipo de dependencia de Ca^{2+} de los RyR nativos (no purificados). Basándose en estos antecedentes, se evaluó primero si los canales purificados con dependencia de Ca^{2+} del tipo **Bajo P_o^*** eran también susceptibles de ser

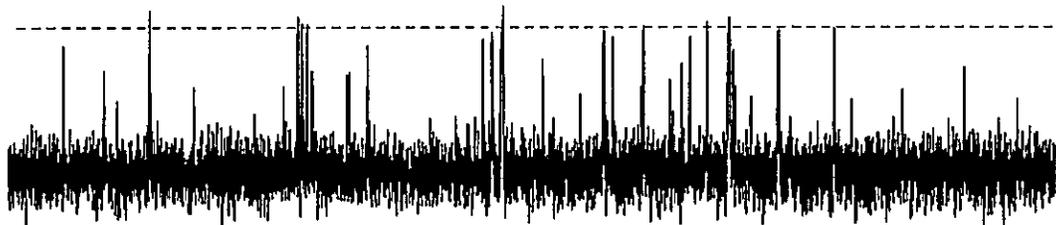
Canales tipo Bajo P_o

500 ms

2 pA

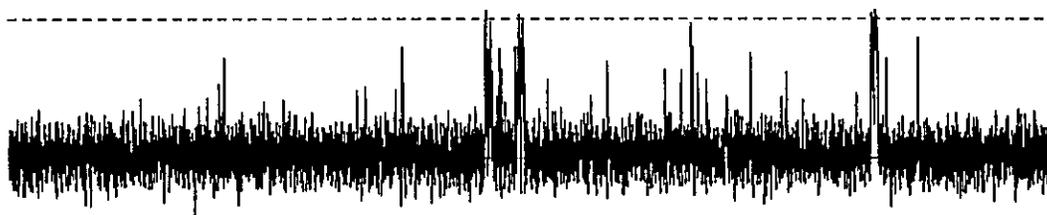
$[Ca^{2+}]$ 10 μ M *cis*

P_o^* : 0,026



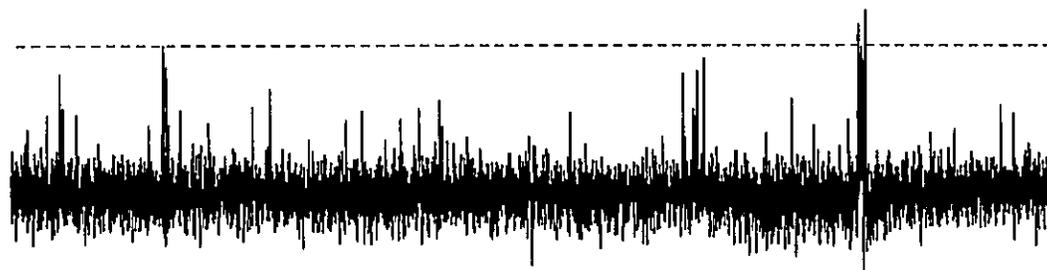
+ cADPR 3 μ M *cis*

P_o^* : 0,024



+ Cam 2 μ g/ml *cis*

P_o^* : 0,024

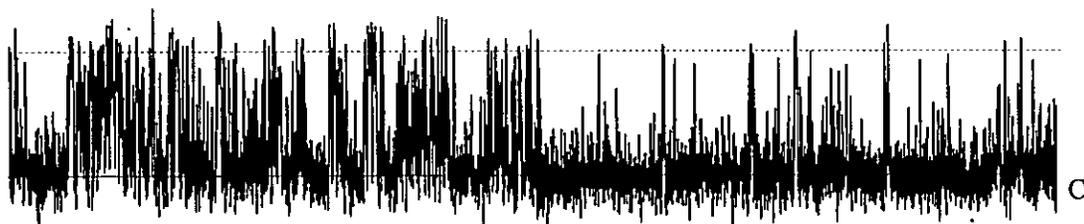


Canales tipo C

500 ms
2 pA

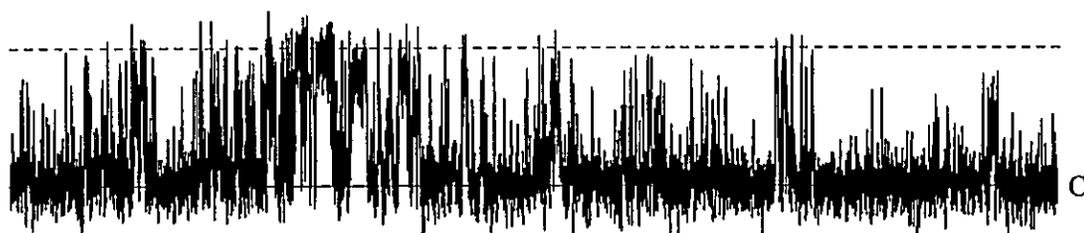
[Ca²⁺] 0,1 μ M *cis*

P_o^{*} : 0,142



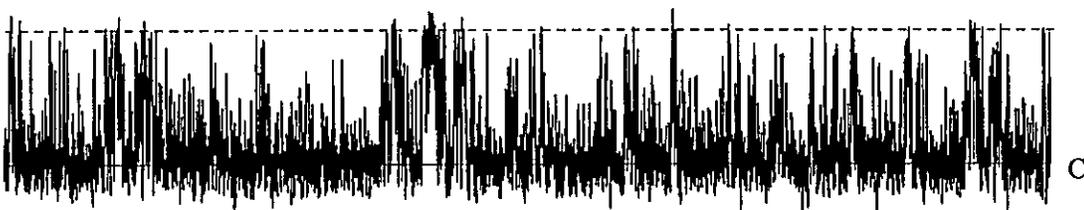
+ cADPR 3 μ M

P_o^{*} : 0,136



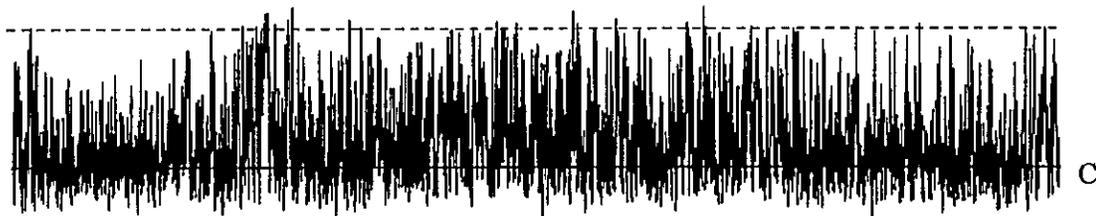
+ CaM 2 μ g/ml

P_o^{*} : 0,149



+ CaM 4 μ g/ml

P_o^{*} : 0,144

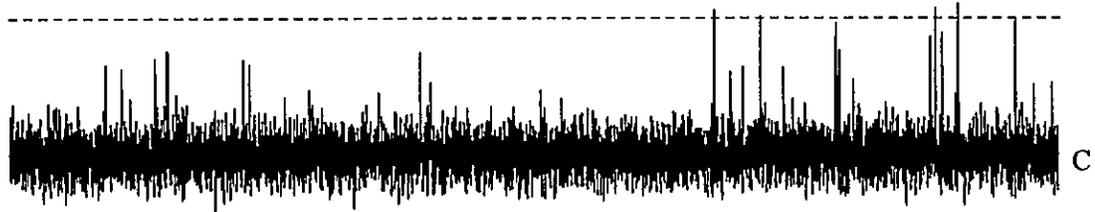


Canales tipo MEM

500 ms
2 pA

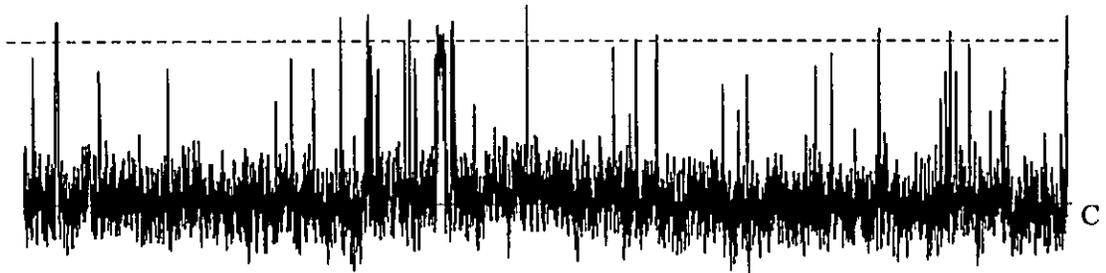
$[Ca^{2+}]$ 1 μM *cis*

P_o^* : 0,012



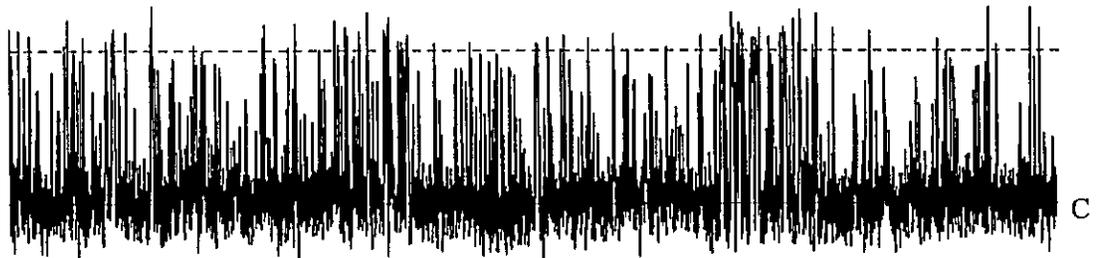
+ cADPR 0,5 μM

P_o^* : 0,058



+ cADPR 1 μM

P_o^* : 0,103



transformados en canales del tipo **MEM** por oxidación, para luego investigar si los canales oxidados eran sensibles a la activación por cADPR al ser modificada su dependencia de Ca^{2+} .

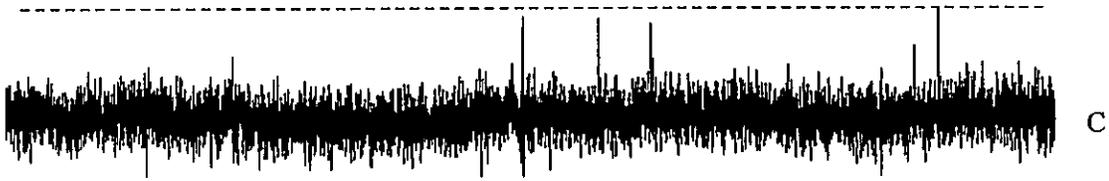
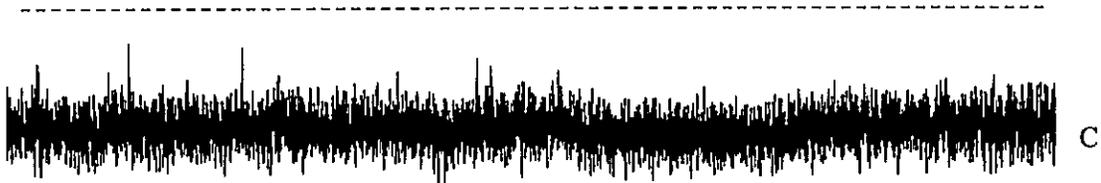
En la Fig. 23A se muestra un ejemplo de canal único cuya dependencia de Ca^{2+} era espontáneamente del tipo **Bajo P_o^*** , que no fue activado por cADPR 5 μM . Se incubó el canal por 8 minutos con timerosal 0,25 mM en el lado *cis*, un agente oxidante de grupos SH. Tras lavar el compartimento *cis*, el canal manifestó una dependencia de Ca^{2+} del tipo **MEM**, presentando un P_o^* de 0,067 en $[\text{Ca}^{2+}]$ 0,1 μM *cis*. Resultados similares se obtuvieron utilizando el reactivo ditiopiridina como agente oxidante de grupos SH. El canal así modificado presentó en presencia de $[\text{Ca}^{2+}]$ 0,1 μM *cis* una significativa activación por adición de cADPR 5 μM al compartimento *cis*, alcanzando un P_o^* de 0,403 (Fig. 23B).

En otro experimento similar, un canal del tipo **Bajo P_o^*** , no activado por cADPR 5 μM en $[\text{Ca}^{2+}]$ 10 μM *cis*, fue transformado por oxidación con timerosal en un canal con dependencia de Ca^{2+} tipo **MEM** que fue sensible a la activación por cADPR 5 μM (Fig. 24). Al estudiar la dependencia de Ca^{2+} del efecto de cADPR de este canal se observó efecto activador de cADPR en todas las $[\text{Ca}^{2+}]$ *cis* usadas (Fig. 24, barras vacías). Más aun, a diferencia de los canales de ovocitos de erizo, se observó que los RyR purificados de anfibio fueron activados por cADPR a concentraciones de Ca^{2+} *cis* tan bajas como 0,1 μM (Fig. 23B).

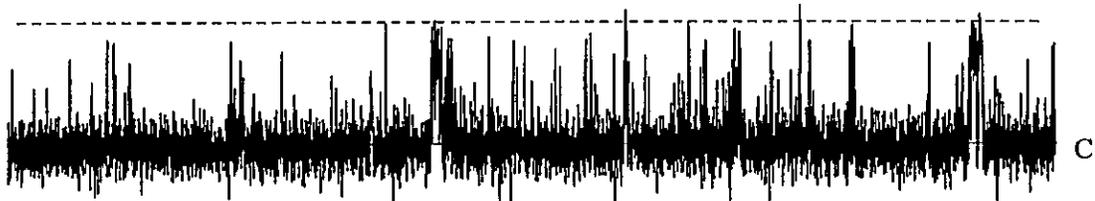
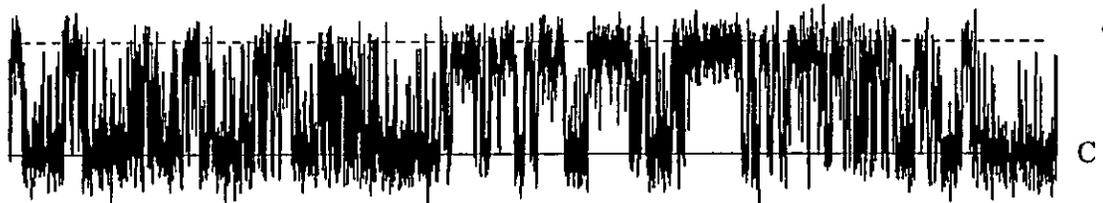
Éstos resultados indican que los canales-RyR purificados de músculo esquelético de anfibio, que inicialmente presentaban dependencias de calcio del tipo **Bajo P_o^*** , tras ser oxidados cambian su dependencia de calcio al tipo **MEM**, en igual forma a como lo hacen los canales-RyR nativos. Concomitantemente, se transforman en canales sensibles a la estimulación por cADPR.

A

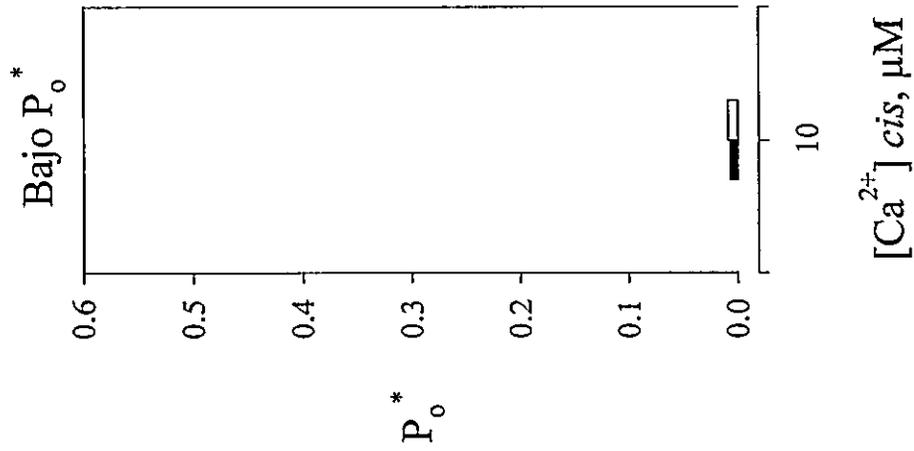
Control

500 ms
2 pA $[Ca^{2+}]$ 1 μ M *cis* P_o^* : 0,017+ cADPR 5 μ M P_o^* : 0,013**B**

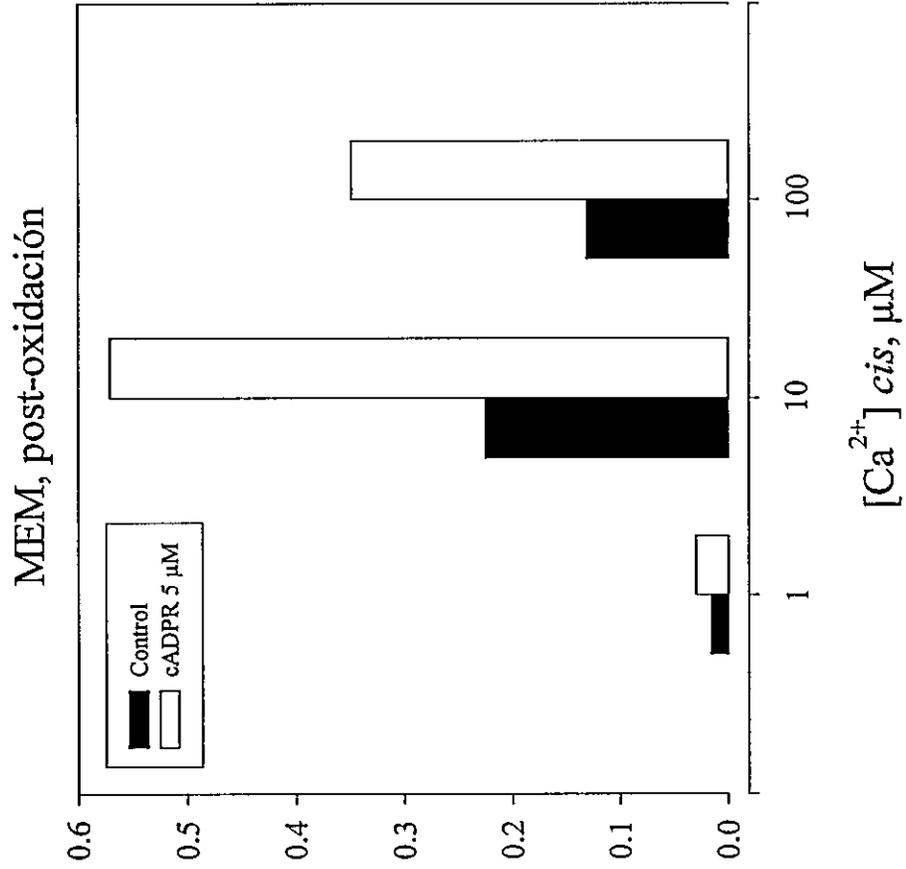
Tratamiento con Timerosal 0,25 mM

 Ca^{2+} *cis*, 0,1 μ M P_o^* : 0,067+ cADPR 5 μ M P_o^* : 0,403

A



B



DISCUSION

I. Canales de calcio de ovocitos

Los resultados descritos en este trabajo muestran que los microsomas aislados del ovocito de erizo de mar *T. nyger* presentan vías de liberación de calcio sensibles a tres distintos agonistas fisiológicos, IP₃, Ca²⁺ y cADPR. Más aún, al incorporar estos microsomas en bicapas planas se detectaron canales únicos de calcio que presentaron 1) propiedades farmacológicas similares a las de los RyR de mamíferos, tales como activación por cafeína, [Ca²⁺] micromolar o [ATP] milimolar y 2) activación por cADPR, que fue modulada por las concentraciones de Ca²⁺ y Mg²⁺ del medio citoplasmático. Aunque existen datos en la literatura que sugieren que los canales RyR median la liberación de calcio inducida por cADPR en homogeneizados y ovocitos enteros (ver revisión de Lee, 1997), este es el primer trabajo que caracteriza funcionalmente **al nivel del canal único** la actividad de los canales de calcio sensibles a cADPR de los ovocitos de erizo de mar (Pérez y cols., 1998).

Los canales sensibles a cADPR del ovocito de erizo no son canales activados por IP₃

Los canales de calcio de ovocitos de erizo caracterizados en esta tesis no fueron modulados por IP₃, ya que adiciones de IP₃ (2 μM) al compartimento *cis* no tuvieron efecto sobre la actividad de los canales sensibles a cADPR. Sin embargo, IP₃ sí indujo liberación de Ca²⁺ desde microsomas de ovocitos cargados activamente, indicando que los microsomas descritos en este estudio poseen vías de liberación de Ca²⁺ sensible a IP₃. Existen numerosos estudios que indican que en ovocitos de erizo de mar las vías de liberación de Ca²⁺ sensibles a cADPR e IP₃

son diferentes; 1) se sabe que Rojo de Rutenio y procaína, dos antagonistas de CICR en RS, inhiben la liberación de Ca^{2+} inducida por cADPR desde homogeneizados de ovocito de erizo sin afectar la liberación sensible a IP_3 (Galione y cols., 1991; 1993), 2) se conoce también que el IP_3 , aún a concentraciones micromolares, no altera la actividad liberadora de Ca^{2+} inducida por cADPR (Galione y cols., 1991) y 3) se ha encontrado que la liberación de Ca^{2+} inducida por cADPR es insensible a heparina (Galione y cols., 1993; Lee y cols., 1994b), un inhibidor competitivo de la unión de IP_3 a su receptor. Más aún, la ausencia de efecto de heparina sobre la liberación de Ca^{2+} inducida por cADPR concuerda con el efecto marginal que mostró la heparina sobre la actividad de los canales encontrada en este trabajo, aun a concentraciones que inhiben completamente la liberación de Ca^{2+} inducida por IP_3 (Galione y cols., 1993). De este conjunto de resultados se desprende que la interpretación más probable para la falta de efecto de IP_3 en la actividad de los canales sensibles a cADPR sería que los canales activados por IP_3 de ovocitos de erizo (aun no descritos al nivel de canal único) son diferentes a los canales de calcio activados por cADPR caracterizados en este trabajo.

Dependencia de calcio de la actividad de los canales de ovocitos de erizo en ausencia y en presencia de cADPR

Los canales de Ca^{2+} del ovocito de erizo de mar fueron moderadamente activados por aumentos en $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cis}}$ desde $0,7 \mu\text{M}$ a $30 \mu\text{M}$. Sin embargo, en presencia de [cADPR] micromolares la activación de los canales por aumentos de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cis}}$ en este rango fue mucho mayor. Estos resultados están en concordancia con reportes recientes que describen que en

ovocitos de erizo se produce un incremento significativo de las tasas de liberación de Ca^{2+} inducidas por cADPR al incrementar la $[\text{Ca}^{2+}]$ citoplasmática (Guo y Becker, 1997).

En las condiciones experimentales estándar utilizadas para registrar actividad de canal, cADPR 1 μM no tuvo efecto sobre la actividad de los canales a concentraciones de $\text{Ca}^{2+} \leq 0,7 \mu\text{M}$. No obstante, cADPR 1 μM sí indujo liberación de Ca^{2+} desde microsomas cargados activamente con calcio y en presencia de $[\text{Ca}^{2+}]$ 0,3 - 0,4 μM en el medio extravesicular. Este último resultado es coincidente con reportes previos que muestran liberación de Ca^{2+} desde homogeneizados de ovocitos de erizo inducida por cADPR a $[\text{Ca}^{2+}]$ extravesicular en el rango submicromolar (Chini y Dousa, 1996a). Al respecto, es importante mencionar que las condiciones experimentales utilizadas para medir liberación de Ca^{2+} desde vesículas microsomales son diferentes a las condiciones utilizadas en los experimentos de bicapas planas. En los experimentos de liberación 1) las vesículas acumulan activamente importantes cantidades de calcio luminal, 2) están en presencia continua de concentraciones de Mg^{2+} y de ATP mM, y 3) algunas de las proteínas que están presentes en las vesículas, y que modulan la actividad de los canales, pueden no fusionarse en las bicapas planas. Cada uno de estos factores puede, en principio, ser requerido para detectar el efecto de cADPR a $[\text{Ca}^{2+}]$ submicromolares, ya que todos ellos regulan la actividad de los canales-RyR (Coronado y cols., 1994; Hidalgo y Donoso, 1995; Zucchi y Ronca-Testoni, 1997).

Entre las variables mencionadas, se investigó si el ATP o el Mg^{2+} aumentaban la sensibilidad del canal a cADPR a $[\text{Ca}^{2+}]$ submicromolar. Sin embargo, en presencia de Mg^{2+} 1 mM los canales no fueron consistentemente activados por cADPR a $[\text{Ca}^{2+}]$ submicromolar. Por lo tanto, la sola presencia de Mg^{2+} no parece ser responsable de las diferencias en la sensibilidad a calcio del efecto de cADPR entre los experimentos de liberación y los de bicapas. Como

tampoco el ATP potenció el efecto de cADPR a concentraciones de calcio submicromolares, se descarta que la diferencia en sensibilidad a cADPR a baja $[Ca^{2+}]$ se deba al Mg^{2+} o al ATP. Otro de los factores mencionados arriba como posible responsable de estas diferencias, el calcio luminal, es particularmente atractivo. En resultados preliminares (no mostrados) hemos encontrado que la activación de los canales de microsomas de ovocitos por cADPR fue más efectiva cuando el compartimento *trans* (luminal) contenía 50 μM $[Ca^{2+}]$ además de 50 mM $[Cs^+]$. Resultados similares fueron descritos para el efecto activador de cADPR sobre canales-RyR de RS aislado de músculo esquelético de oveja incorporados en bicapas planas (Sitsapesan y Williams, 1995).

La presencia de otras proteínas, además de calmodulina, es otro de los factores que podrían modular la activación por cADPR a bajas $[Ca^{2+}]$. En concordancia con esta idea, un estudio reciente publicado después de finalizar el trabajo experimental de esta tesis, que también describe que la actividad de canal de una preparación de membranas de ovocitos de erizo de mar (*L. pictus* y *S. Purpuratus*) es estimulada por cADPR en bicapas planas, muestra que la activación por cADPR depende de la presencia de un componente accesorio de bajo peso molecular. Este componente, que está presente en los homogeneizados pero no en los microsomas, potenciaría el efecto activador de cADPR sobre los canales (Lokkuta y cols., 1998).

Adicionalmente, se han descrito otros factores endógenos, tales como el estado redox de grupos SH críticos (Galione y cols., 1993; Tanaka y Tashjian, 1994) o la presencia de palmitoil-CoA (Chini y Dousa, 1996b), que tienen la capacidad de incrementar el efecto activador de cADPR sobre la liberación de Ca^{2+} en homogeneizados de ovocito de erizo. Estos factores podrían también aumentar la actividad de los canales en respuesta a cADPR a bajas $[Ca^{2+}]$.

Efecto de Mg^{2+} en la actividad de los canales de ovocitos de erizo de mar

Se ha reportado que la activación óptima de la liberación de Ca^{2+} inducida por cADPR requiere de la presencia de $MgCl_2$ 1 mM en el medio (Galione y cols., 1991; 1993; Graeff y cols., 1995), y que concentraciones milimolares de Mg^{2+} inhiben la liberación en homogeneizados de ovocitos de erizo de mar (Graeff y cols., 1995; Chini y Dousa, 1996b). En concordancia con estos reportes, nuestros resultados indican que Mg^{2+} presenta un efecto dual sobre la actividad de los canales activados por cADPR. Magnesio, a una concentración de 1 mM, incrementó significativamente el efecto de cADPR sobre la actividad de los canales. Concentraciones mayores fueron menos efectivas y concentraciones ≥ 9 mM resultaron inhibitorias. Mas aún, en presencia de Mg^{2+} 1 mM, los canales de ovocitos de erizo de mar presentaron dos tipos de respuesta a la activación por cADPR. No se sabe qué factores inciden en generar estos dos tipos de respuesta, por lo que esto debe ser motivo de estudio posterior.

Comparación con los canales-RyR de vertebrados

La activación por concentraciones milimolares de cafeína o ATP, o de $[Ca^{2+}]$ en el rango micromolar, son propiedades características de los canales RyR de vertebrados (Fill y cols., 1990; Coronado y cols., 1994, Zucchi y Ronca-Testoni, 1997). Además, los canales de calcio de ovocitos de erizo de mar activados por cADPR compartieron otro conjunto de propiedades con los RyR de vertebrados (Tabla I).

Al igual como fue descrito para los canales-RyR aislados de músculo esquelético de mamífero (Fill y cols., 1990) y de anfibio (Bull y Marengo, 1993; Marengo y cols., 1998), los canales de ovocitos de erizo de mar presentaron una dependencia de Ca^{2+} del P_o^* en forma de

campana, que se potenció en forma significativa en presencia de cADPR. Este hecho reviste importancia fisiológica ya que indica que el ión calcio puede actuar como activador o inhibidor de los canales de ovocitos, dependiendo de su concentración.

Tabla I

Comparación de las propiedades funcionales de los canales de calcio de ovocitos de erizo de mar con las propiedades de los canales-RyR en vertebrados, descritas en la literatura.

	Erizo de mar	Canales-RyR	Referencias
<i>Moduladores Fisiológicos</i>			
Ca ²⁺ , μM	+	+	11, 60, 88
Ca ²⁺ , mM	-	-	15, 24, 60
CADPR	+	+	43, 87, 92, 99
ATP	+	+	64, 70, 89, 90
Calmodulina	+	- y +	66, 104
Mg ²⁺	+ y -	-	2, 47, 82
<i>Moduladores Farmacológicos</i>			
Cafeína	+	+	17, 104
Rojo de Rutenio	-	-	17, 59
Ryanodina	?	+	11, 82
<i>Propiedades Funcionales</i>			
Conductancia del canal en Ca ²⁺	50 pS	100 – 120 pS	17, 100
Conductancia del canal en Cs ⁺	155 pS	400 – 600 pS	17, 100
Niveles de subconductancia	Si	Si	19, 57
Selectividad iónica	Ca ²⁺ > Cs ⁺	Ca ²⁺ > Cs ⁺ > K ⁺	17, 100
+ : Activación - : Inhibición ? : No determinado			

Adicionalmente, los canales de ovocito fueron inhibidos por Rojo de Rutenio y presentaron múltiples niveles de subconductancia, comportamiento que también se ha descrito en los canales RyR de mamíferos (Liu y cols., 1989; Coronado y cols., 1994; Ding y Kasai, 1996). De igual forma, la mayor selectividad a Ca^{2+} que a cationes monovalentes, tales como Cs^+ , presentada por los canales de ovocito de erizo es también una característica de los canales de calcio sensibles a ryanodina (Williams, 1992; Coronado y cols., 1994).

Aun cuando se requirieron concentraciones mayores, el efecto inhibitor clásico que presenta Mg^{2+} sobre los canales-RyR de mamíferos (Ashley y Williams, 1990; Laver y cols., 1997) también fue observado en los canales de ovocitos de erizo. Basándose en estas similitudes, resumidas en la Tabla I, es posible sugerir que los canales de calcio sensibles a cADPR presentes en los ovocitos de erizo de mar corresponden a canales de la familia de receptores de ryanodina.

No obstante lo anterior, existen algunas diferencias funcionales entre los canales de ovocitos de erizo y los canales-RyR de vertebrados. El efecto activador que presentó Mg^{2+} 1 mM es un ejemplo de estas diferencias funcionales. De igual forma, la conductancia a Ca^{2+} (50 pS) y Cs^+ (155 pS) de los canales de ovocitos activados por cADPR fue menor que los 100-120 pS y 500-600 pS de conductancia, respectivamente, descritos para los canales RyR de músculo esquelético y cardíaco, de mamíferos o anfibios (Williams, 1992; Coronado y cols., 1994). Sin embargo, se han descrito conductancias de éste mismo orden (50 pS) en canales-RyR de mamíferos (Bezprozvanny y cols., 1991).

II. Canales de liberación de calcio RyR de músculo esquelético de anfibio

Si bien se ha caracterizado el efecto de algunos agonistas sobre las propiedades de los canales RyR purificados de músculo esquelético de mamífero (Anderson y cols., 1989; Herrmann-Frank y Lehmann-Horn, 1996; Ondrias y cols., 1996), no existen estudios sistemáticos del efecto de calcio ni de cADPR sobre la actividad del canal RyR purificado. Esto es particularmente importante en el caso de cADPR, ya que existe una gran controversia en la literatura sobre el efecto de este agonista sobre los canales RyR nativos de músculo esquelético y cardíaco (Mészáros y cols., 1993; Morrissette y cols., 1993; Fruen y cols., 1994; Sitsapesan y cols., 1994; Sitsapesan y cols., 1995).

Los canales-RyR purificados de músculo esquelético de anfibio presentan tres tipos de dependencia de $[Ca^{2+}]$, que se modifican según el estado de oxidación del canal

En el presente estudio hemos caracterizado por primera vez el tipo de dependencia de $[Ca^{2+}]$ que presentan los canales-RyR purificados de músculo esquelético de anfibio. Estos canales mostraron los tres tipos de dependencia de calcio (tipo **Bajo P_o** , tipo **MEM** y tipo **C**) previamente descritos en los canales nativos de músculo esquelético de anfibios (Bull y Marengo, 1993; Marengo y cols., 1998), confirmando que los canales purificados conservan gran parte de sus propiedades funcionales.

Trabajos previos han demostrado que agentes oxidantes de grupos SH aumentan en forma significativa la actividad de canales-RyR nativos incorporados en bicapas planas (Favero y cols., 1995; Marengo y cols., 1998). Aún más, la oxidación o reducción de las proteínas del RS modifican y determinan el tipo de dependencia de Ca^{2+} de los canales nativos (Marengo y cols.,

1998). Nuestros resultados en canales purificados de músculo esquelético de anfibio, que muestran cambios en la dependencia de Ca^{2+} desde canales tipo **Bajo P_o** al tipo **MEM** por oxidación con timerosal, muestran que la purificación no altera el efecto de la oxidación sobre la dependencia de calcio. Más aun, nuestros resultados indican que los grupos SH críticos para la determinación de la dependencia de Ca^{2+} corresponden a grupos propios del canal-RyR y no a grupos SH reactivos de otras proteínas, tales como triadina, que están presentes en el RS y que también son sustrato de los agentes oxidantes (Liu y Pessah, 1994).

cADPR induce activación de canales-RyR purificados de músculo esquelético de anfibio

El efecto activador de cADPR sobre los canales-RyR ha sido demostrado en células β pancreáticas (Takasawa y cols., 1993), músculo liso (Kannan y cols., 1996, Prakash y cols., 1998), músculo cardíaco (Mészáros y cols., 1993; Sitsapesan y col., 1994; 1995), y tejido cerebral (Currie y cols., 1992; White y cols., 1993). Sin embargo, su efecto en el músculo esquelético ha sido controversial (Mészáros y cols., 1993; Morrissette y cols., 1993; Fruen y cols., 1994; Sitsapesan y Williams, 1995).

Uno de los resultados más significativos obtenido en este trabajo fue la observación que la activación de canales-RyR por cADPR fue dependiente del tipo de respuesta que presentaban los canales a la concentración de Ca^{2+} (**Bajo P_o** , **MEM** o **C**). De todos los canales observados, sólo aquellos que presentaron dependencia de Ca^{2+} del tipo **MEM** fueron siempre activados por concentraciones de cADPR en el rango 0,5 - 5 μM . Ninguno de los canales con dependencia de calcio del tipo **Bajo P_o** o **C** fueron activados por concentraciones de cADPR $\leq 5 \mu\text{M}$.

El efecto de cADPR sobre los canales tipo MEM tuvo lugar a concentraciones de Ca^{2+} citoplasmático en el rango de 0,1 – 1 μM , inferior a la $[\text{Ca}^{2+}]$ en la cual se observó activación por cADPR de canales de microsomas de ovocitos de erizo de mar. Estos resultados indicarían que, al menos en músculo esquelético de anfibio, cADPR podría actuar como un agonista de los canales-RyR más que como un modulador, ya que su efecto activador se observó incluso a las concentraciones de Ca^{2+} de las células en reposo. No obstante, no se puede descartar la posibilidad que este hecho sea resultado de la mayor sensibilidad a Ca^{2+} que presentan los RyR purificados en relación con la de los canales de ovocitos de erizo de mar.

El hecho de que los canales de calcio RyR esqueléticos presenten tres tipos de dependencia de calcio, y que cADPR active solamente los canales con dependencia de calcio del tipo MEM, puede dar cuenta de los resultados contradictorios reportados hasta la fecha para el efecto de cADPR sobre canales-RyR de músculo esquelético. Es sabido que, dependiendo de las condiciones experimentales utilizadas para la purificación de las vesículas de RS, o de los canales-RyR, es posible tener distintas condiciones de óxido/reducción en el medio. Así, no es extraño tener diversas proporciones de canales en los distintos estados de oxidación y por tanto con distintos tipos de dependencias de Ca^{2+} (Marengo y cols., 1998). De esta forma, a menos que se controle cuidadosamente el estado redox de los canales las respuestas de los canales a cADPR pueden variar significativamente de experimento en experimento y de laboratorio en laboratorio.

Adicionalmente los resultados obtenidos en canales-RyR purificados sugieren que, como ocurre con la respuesta a Ca^{2+} y cADPR, la respuesta de los canales-RyR a diversos agonistas puede estar fuertemente modulada y/o condicionada por el estado de oxidación de los canales y no sólo por el tipo de isoforma del receptor presente (RyR1, RyR2 o RyR3).

Implicaciones fisiológicas

Nuestros datos de actividad de canales en ovocitos de erizo son consistentes con el modelo que plantea que cADPR actuaría como un modulador del mecanismo de CICR, presentado en la introducción, ya que estos confirman que los canales sensibles a cADPR presentan propiedades de canal similares a los canales RyR de músculo. La ausencia de efecto de cADPR 1 μ M sobre la actividad de los canales a concentraciones de Ca^{2+} submicromolares sugiere además que en condiciones fisiológicas este metabolito jugaría un papel como modulador del canal más que como un agonista. Por otra parte, este requerimiento de Ca^{2+} para observar el efecto activador de cADPR sobre los canales tipo-RyR de ovocitos de erizo indican que durante la fecundación de los ovocitos estos canales podrían jugar un papel importante en la propagación de la onda de liberación de Ca^{2+} , más que en su generación. Así, la máxima actividad del canal tipo-RyR requeriría de la presencia de cADPR, de tal forma que condiciones celulares que alteren los niveles de cADPR pueden eventualmente cambiar las características de los eventos transitorios de liberación de Ca^{2+} .

De lo anterior se desprende que los RyR podrían presentar la particularidad que un mismo canal podría ser responsable de eventos de liberación de Ca^{2+} con distintas características dependiendo de la presencia o ausencia de cADPR en el medio. Nuestros resultados, obtenidos en canales purificados de músculo esquelético, apoyan esta idea, ya que demuestran que un mismo canal puede o no presentar activación por cADPR dependiendo de su estado de oxidación. De esta forma una misma señal celular (cADPR) podría ser responsable de generar distintas señales de Ca^{2+} desde una misma vía de liberación dependiendo del estado de oxidación-reducción del canal.

Conclusiones

Los resultados de este trabajo indican que los microsomas de ovocitos de erizo de mar poseen canales de Ca^{2+} que presentan propiedades similares a los canales-RyR, tales como activación por Ca^{2+} , ATP y cafeína, e inhibición por Rojo de Rutenio. Aunque nuestros resultados no nos permiten decidir si los canales de ovocitos son RyR, la activación concomitante de los canales de ovocito por cADPR y calcio μM sugiere que ellos forman parte de la vía de liberación de calcio inducida por calcio en estas células.

Por otra parte, nuestros resultados confirman que cADPR puede actuar como un agonista de los canales-RyR de músculo esquelético de anfibio, ya que activó los canales purificados incluso a las concentraciones de calcio que se encuentran en las células musculares en reposo. Nuestros hallazgos indican, además, que la dependencia de calcio de los canales RyR purificados de anfibio es modificada por el estado de oxidación, lo que determina a su vez la respuesta del RyR a cADPR, y presumiblemente, a otros agonistas del canal.

REFERENCIAS

1. Anderson K., Lai A., Liu Q-Y., Rousseau E., Erickson E., and Meissner G. (1989) Structural and functional characterization of the purified cardiac ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel complex. *J. Biol. Chem.* 264, 1329-1335
2. Ashley R. and Williams A. (1990) Divalent cation activation and inhibition of single calcium release channels from sheep cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Gen. Physiol.* 95: 981-1005
3. Berridge M. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325
4. Berridge M., Bootman M. and Lipp P. (1998) Calcium-a life and death signal. *Nature* 395: 645-648
5. Bezprozvanny Y. and Ehrlich B. (1994) Inositol (1,4,5)-trisphosphate (InsP₃)-gated Ca²⁺ channels from cerebellum: Conduction properties for divalent cations and regulation by intraluminal calcium. *J. Gen. Physiol.* 104: 821-856
6. Bezprozvanny Y., Watras J. and Ehrlich B. (1991) Bell-shaped calcium-response curves of Ins (1,4,5) P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature* 351: 751-754
7. Bourguignon, L., Chu, A., Jin, H. and Brandt, N. (1995) Ryanodine receptor-ankyrin interaction regulates internal Ca²⁺ release in mouse T-lymphoma cells. *J. Biol. Chem.* 270: 17917-17922
8. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of the microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
9. Buck, W. R., Hoffmann, E. R., Rakow, T. L. and Shen, S. S. (1994). Synergistic calcium release in the sea urchin eggs by ryanodine and cyclic ADP ribose. *Dev. Biol.* 163: 1-10

10. Bull, R. and Marengo, J. J. (1993). Sarcoplasmic reticulum release channels from frog skeletal muscle display two types of calcium dependence. *FEBS Lett.* 331: 223-227
11. Bull, R., Marengo J.J., Suárez B.A., Donoso P., Sutko J.L. and Hidalgo C. (1989). Activation of calcium channels in sarcoplasmic reticulum by nanomolar concentrations of ryanodine. *Biophys. J.* 56, 749-756
12. Chini, E. D. and Dousa, T. P. (1996a). Nicotine-adenine dinucleotide phosphate-induced Ca^{2+} release does not behave as a Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release system. *Biochem J.* 316: 709-711
13. Chini, E. D. and Dousa, T. P. (1996b). Palmitoyl-CoA potentiates the Ca^{2+} release elicited by cyclic ADP-ribose. *Am. J. Physiol.* 270 (Cell Physiol. 39): C530-C537
14. Chini, E. D. Beers, K., Chini, C. and Dousa, T. P. (1995). Specific modulation of cyclic ADP ribose-induced Ca^{2+} release by polyamines. *Am. J. Physiol.* 269 (Cell Physiol. 38): C1042-C1047
15. Chu, A., M. Fill, E. Stefani, and M. L. Entmann. (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. Membrane Biol.* 135: 49-59
16. Clapper, D., Walseth, T., Dargie, P. and Lee, H. C. (1987). Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 262: 9561-9568
17. Coronado, R., Morrissette, J., Sukhareva, N. and Vaughan, D. (1994) Structure and function of ryanodine receptors. *Am. J. Physiol.* 266 (Cell Physiol.35): C1485-C1504
18. Currie, K. P. M., Swan, K., Galione, A. and Scott, R. H. (1992). Activation of Ca^{2+} -dependent currents in cultured neurons by a sperm factor and cyclic ADP-ribose. *Mol. Biol. Cell* 3, 1415-1422

19. Ding, J. and Kasai, M. (1996) Analysis of multiple conductance states observed in Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *Cell. Struct. Funct.* 21: 7-15
20. Donoso, P. and Hidalgo, C. (1993) pH sensitive calcium release in triads from frog skeletal muscle. Rapid filtration studies. *J. Biol. Chem.* 268: 25432-25438
21. Epel, D., Weaver, A. M. and Mazia, D. (1970). Methods for removal of the vitelline membrane of the sea urchin eggs. *Exp. Cell Res.* 61: 64-68
22. Fabiato, A. (1983). Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245: C1-C14
23. Favero, T. G., A. C. Zable, and J. J. Abramson. (1995) Hydrogen peroxide stimulates the Ca^{2+} release channels from skeletal sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 270: 2557-2563
24. Fill, M., Coronado, R., Mickelson, J. R., Vilven, J., Ma, J., Jacobson, B. A. and Louis, C. F. (1990). Abnormal ryanodine receptor channels in malignant hyperthermia. *Biophys. J.* 50: 471-475
25. Franzini-Armstrong, C. and Protasi, F. (1997). Ryanodine receptor of striated muscle: A complex channel capable of multiple interactions. *Physiol. Rev.* 77: 699-729
26. Fruen B., Mickelson J., Shomer M., Velez P. and Louis C. (1994) Cyclic ADP ribose does not affect cardiac or skeletal muscle ryanodine receptor. *FEBS Lett.* 352:123-126
27. Furuichi, T., K. Khoda, A. Miyawaki, and K. Mikoshiba. (1994). Intracellular channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* 4: 294-303
28. Galione A. and White A. (1994) Ca^{2+} release by cyclic ADP-ribose. *Trends Cell Biol.* 4: 431-436

29. Galione A., White A., Willmott, N., Turner M., Potter V. and Watson S. (1993) cGMP mobilize intracellular Ca^{2+} in sea urchin eggs by stimulating cyclic ADP-ribose synthesis. *Nature* 365: 456-459
30. Galione, A., Lee, H. C. and Busa, W. (1991). Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sea urchin eggs homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose. *Science* 253: 1143-1146
31. Galione, A., McDougall, A., Busa, W., Willmott, N. Gillot I. and Whitaker, M. (1993) Redundant mechanisms of calcium-induced calcium release underlying calcium waves during fertilization of sea urchin eggs. *Science* 261: 348-352
32. Graeff, R. M., Podein, R. J., Aarhus, R. and Lee, H. C. (1995). Magnesium ions but not ATP inhibit cyclic ADP-ribose-induced calcium release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206: 786-791
33. Guo, X. and Becker P. (1997). Cyclic ADP-ribose-gated Ca^{2+} release in sea urchin eggs requires an elevated $[\text{Ca}^{2+}]$. *J. Biol. Chem.* 272: 16984-16989
34. Guo, X. LaFlamme, M. and Becker P. (1996). Cyclic ADP-ribose does not regulate sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in intact cardiac myocytes. *Cir. Res.* 79: 147-151
35. Guse, A., da Silva, C., Weber, K., Ashamu, G., Potter, B. and Mayr, G. (1996) Regulation of cADP-ribose-induced Ca^{2+} Release by Mg^{2+} and Inorganic Phosphate. *J. Biol. Chem.* 271: 23946-23953
36. Hartshorne, D.J. (1985) Calmodulin antagonist and cellular physiology. Edited by Hartshorne, D. New York, Academic Press, pp 3-12
37. Herrmann-Frank A. and Lehmann-Horn . (1996) Regulation of the purified Ca^{2+} release channel/ryanodine receptor complex of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by luminal calcium. *Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol.* 432: 155-157

38. Hidalgo, C. and Donoso, P.(1995) Luminal calcium regulation of calcium release from sarcoplasmic reticulum membrane. *Bioscience Rep.* 15: 387-397
39. Hidalgo, C., J. Jorquera, V. Tapia, and P. Donoso. (1993). Triads and transverse tubules isolated from frog skeletal muscle contain high levels of inositol 1,4,5- trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 268: 15111-15117
40. Holmberg, S. R. M., and A. J. Williams. (1990). The cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel: modulation of ryanodine binding and single-channel activity. *Biochem. Biophys. Acta* 1022: 187-193
41. Jaffe, L (1991) The path of calcium in cytosolic calcium oscillation: A unifying hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9883-9887
42. Kannan, M., Fenton, A., Prakash, Y. and Sieck G. (1996). Cyclic ADP-ribose stimulates sarcoplasmic reticulum calcium release in porcine coronary artery smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 270 (Heart Circ. Physiol.39): H801-H806
43. Koshiyama, H., Lee, HC. and Tashjian, A. (1991) Novel mechanism of intracellular calcium release in pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 266: 16985-16988
44. Kuba, K. (1994). Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in neurones. *Jap. J. Physiol.* 44: 613-650
45. Lai F., Erickson H., Rousseau E., Liu Q. and Meissner G. (1988) Purification and reconstitution of calcium release channel from skeletal muscle. *Nature* 331: 315-319
46. Lai, F. and Meissner, G. (1989) The muscle ryanodine receptor and its intrinsic Ca^{2+} channel activity. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21: 227-246

47. Laver, DR., Baynes, T. and Dulhunty, A. (1997). Magnesium inhibition of ryanodine-receptor calcium channels: evidence for two independent mechanisms. *J. Membrane Biol.* 156: 213-229
48. Lee, H. C. (1993). Potentiation of calcium- and caffeine-induced calcium release by cyclic ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* 268: 293-299
49. Lee, H. C., Aarhus, R. and Graeff, R. M. (1995). Sensitization of calcium-induced calcium release by cyclic ADP-ribose and calmodulin. *J. Biol. Chem.* 270: 9060-9066
50. Lee, H. C., Aarhus, R., Graeff, R. M., Gurnack, M. E. and Walseth, T. F. (1994a) Cyclic ADPR ribose activation of the ryanodine receptor is mediated by calmodulin. *Nature* 370: 307-309
51. Lee, H. C., Galione, A. and Walseth, T. (1994b) Cyclic ADP-ribose: Metabolism and calcium mobilizing function. *Vit. Horm.* 48: 199-257
52. Lee, H.C. (1991). Specific binding of cyclic ADP-ribose to calcium-storing microsomes from sea urchin eggs. *J. Biol. Chem.* 266: 2276-2281
53. Lee, H.C. (1997). Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiol. Rev.* 77: 1133-1164
54. Lee, H.C., Walseth, T.F., Bratt, G.T., Hayes, R.N., and Clapper, D.L. (1989). Structural determination of a cyclic metabolite of NAD⁺ with intracellular Ca²⁺ mobilizing activity. *J. Biol. Chem.* 264: 1608-1615
55. Liu, G. and Pessah, I. N. (1994) Molecular interaction between ryanodine receptor and glycoprotein triadin involves redox cycling of functionally important hyperreactive sulfhydryls. *J. Biol. Chem.* 269: 33028-33034

56. Liu, W. and Meissner, G. (1997) Structure-activity relationship of xanthines and skeletal muscle ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel. *Pharmacology* 54: 135-143
57. Liu, W., Lai, F., Rousseau, E. Jones, R. and Meissner, G. (1989) Multiple conductance state of the purified calcium release channel complex from skeletal sarcoplasmic reticulum. *Biophys. J.* 55: 415-424
58. Lokutta, A., Darszon, A., Beltrán, C. and Valdivia, H. (1998). Detection and functional characterization of ryanodine receptors from sea urchin. *J. Physiol.* 510: 155-164
59. Ma, J. (1993). Block by ruthenium red of the ryanodine-activated calcium release channel of skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.* 102: 1031-1056
60. Marengo, JJ. Bull, R. and Hidalgo, C. (1996). Calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels from brain cortex endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 383: 59-62
61. Marengo, JJ. Hidalgo, C. and Bull, R. (1998). Sulphydryl oxidation modifies the calcium dependence of ryanodine-sensitive calcium channels of excitable cells. *Biophys. J.* 74: 1263-1277
62. Marshall, I. and Taylor, C. (1993). Regulation of inositol 1,4,5,-trisphosphate receptors. *J. Exp. Biol.* 184: 161-182
63. McPherson S., McPherson P., Mathews L., Capmbell K. and Longo F. (1992) Cortical localization of a calcium release channel in sea urchin eggs. *J. Cell Biol.* 116:1111-1121
64. Meissner, G. (1984) Adenine nucleotide stimulation of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 159: 1365-1374
65. Meissner, G. (1986) Ryanodine activation and inhibition of the Ca^{2+} release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 261: 6300-6306

66. Meissner, G. (1994) Ryanodine receptor/ Ca^{2+} release channel and their regulation by endogenous effectors. *Annu. Rev. Physiol.* 56: 485-508
67. Mézáros L. G., Bak J., and Chu A. (1993) Cyclic ADP-ribose as an endogenous regulator of the non-skeletal type ryanodine receptor Ca^{2+} channel. *Nature* 364: 76-79
68. Michalack, M., Dupraz, P. and Shoshan-Barmatz, V. (1988) Ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum membrane: comparison between cardiac and skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 939: 587-594
69. Morrissette J., Heisermann G., Cleary J., Ruoho A. and Coronado R. (1993) Cyclic ADP-ribose induced Ca^{2+} release in rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 330: 270-274
70. Moutin, M. and Dupont, Y. (1988) Rapid filtration of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release from skeletal sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 263: 4228-4235
71. Muller, C. and Daly, J. (1993) Calcium release by caffeine analogs in pheochromocytoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 46: 1825-1829
72. Noguchi, N., Takasawa, S., Nata, K., Tohgo, A., Kato, I., Ikehata, F., Yonekura, H. and Okamoto, H. (1997) Cyclic ADP-ribose binds to FK506-binding protein 12.6 to release Ca^{2+} from islet microsomes. *J. Biol. Chem.* 272: 3133-3136
73. Ogawa, Y. and Harafuji, H. (1990) Osmolarity-dependent characteristics of [^3H]-Ryanodine binding to sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem.* 107: 894-898
74. Olivares E., Tanksley S., Airey J., Beck C., Ouyang Y., Deerinck T., Ellisman M. and Sutko J. (1991) Nonmammalian vertebrates skeletal muscle express two triad junctional foot protein isoforms. *Biophys. J.* 59: 1153-1163

75. Ondrias K., Brillantes AM., Scott A., Ehrlich B. and Marks A. (1996) Single channel properties and calcium conductance of cloned expressed ryanodine receptor/calcium-release channel. *Organelar ion channels and transporter*. Edited by Rockefeller University Press. pp. 29-45
76. Ottini L., Marziali G., Conti A., Chalesworth A. and Sorrentino V. (1996). α and β isoforms of ryanodine receptor from chicken skeletal muscle are the homologes of mammalian RyR1 and RyR3. *Biochem. J.* 315: 207-216
77. Oyamada, H., T. Murayama, T. Takagi, M. Iino, N. Iwabe, T. Miyata, Y. Ogawa, and M. Endo. (1994). Primary structure and distribution of ryanodine-binding protein isoforms of the bullfrog skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 269: 17206-17214
78. Palade, P. (1987) Drug-induced Ca^{2+} release from isolated sarcoplasmic reticulum. I. Use of pyrophosphate to study caffeine-induced Ca^{2+} release. *J. Biol. Chem* 262: 6135-6141
79. Pérez, CF., Marengo, JJ., Bull, R. and Hidalgo, C. (1998). Cyclic ADP-ribose activates caffeine-sensitive calcium channels from sea urchin egg microsomes. *Am. J. Physiol.* 274 (Cell Physiol. 43): C430-C439
80. Prakash, Y., Kannan, M., Walseth, T. and Sieck, G. (1998). Role of cyclic ADP-ribose in the regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in porcine tracheal smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 274 (Cell Physiol. 43): C1653-C1660
81. Rousseau, E., J. S. Smith, and G. Meissner. (1987). Ryanodine modifies conductance and gating behavior of single Ca^{2+} release channel. *Am. J. Physiol.* 253: C364-C368
82. Rousseau, E., J. S. Smith, J. S. Henderson, and G. Meissner. (1986). Single channel and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ flux measurements of the cardiac sarcoplasmic reticulum calcium channel. *Biophys. J.* 50: 1009-1014

83. Rousseau, R., LADine, J., Liu, QI. and Meissner, G. (1988). Activation of the Ca^{2+} release channel of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by caffeine and related compound. Arch. Biochem. Biophys. 267: 75-86
84. Rusinko, N. and Lee, H.C. (1989). Widespread occurrence in animal tissues of an enzyme catalyzing the conversion of NAD^+ into a cyclic metabolite with intracellular Ca^{+2} mobilizing activity. J. Biol. Chem. 264: 11725-11731
85. Sitsapesan, R. and Williams, A. (1995). Cyclic ADP-ribose and related compounds activate sheep skeletal sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel. Am. J. Physiol. 268 (Cell Physiol. 37): C1235-C1240
86. Sitsapesan, R., McGarry, S. J., and Williams, A. (1994). Cyclic ADP-ribose competes with ATP for the adenine nucleotide binding site on the cardiac ryanodine receptor Ca^{2+} -release channel. Circ. Res. 75: 596-600
87. Sitsapesan, R., McGarry, S. J., and Williams, A. (1995). Cyclic ADP-ribose, the ryanodine receptor and Ca^{2+} release. TIPS 16: 386-391
88. Smith, J, R. Coronado, and G. Meissner. (1986). Single channel measurements of the calcium release channel from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J. Gen. Physiol. 88: 573-588
89. Steenberger, J. and Fay, F. (1996) The quantal nature of calcium release to caffeine in single smooth muscle cells results from activation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. J. Biol. Chem. 271: 1821-1824
90. Suárez-Isla B., Irribarra V., Overhauser A., Larralde I., Bull R., Hidalgo C. and Jaimovich E. (1988) Inositol (1,4,5)-trisphosphate activated calcium channels in isolated sarcoplasmic reticulum membrane. Biophys. J. 54: 737-741

91. Sutko, J. and Airey, J. (1996). Ryanodine receptor Ca^{2+} release channels: Does diversity in form equal diversity in function? *Physiol. Rev.* 76: 1027-1071
92. Takasawa, S., Nata, H., Yonekura, H. and Okamoto, H. (1993) Cyclic ADP ribose in insulin secretion from pancreatic β cells. *Science* 259: 370-373
93. Tanaka, Y. and Tashjian, A.H. (1994). Thimerosal potentiates Ca^{2+} release mediated by both the inositol 1,4,5-trisphosphate and the ryanodine receptors in sea urchin eggs. Implication for mechanistic studies on Ca^{2+} signaling. *J. Biol. Chem.* 269: 11247-11253
94. Tanaka, Y. and Tashjian, A.H. (1995). Calmodulin is a selective mediator of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release via the ryanodine receptor-like Ca^{2+} channel triggered by cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.* 92: 3244-3248
95. Terasaki M. y Jaffe L. (1991) Organization of sea urchin egg endoplasmic reticulum and its reorganization at fertilization. *J. Cell Biol.* 114: 929-940
96. Walseth, T., Aarhus, R., Zeleznikar, R. and Lee, H. C. (1991). Determination of endogenous level of cyclic ADP-ribose in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1094: 113-120
97. Walseth, T.F. and Lee, H.C. (1993). Synthesis and characterization of antagonists of cyclic ADP-ribose. *Biochim. Biophys. Acta* 1178: 235-242
98. Whitaker, M. and Swann, K. (1995) Lighting the fuse at fertilization. *Development* 117: 1-12
99. White, A. M., Watson S. P. and Galione A. (1993). Cyclic-ADP-ribose Induced Ca^{2+} release from rat brain microsomes. *FEBS Lett.* 318: 259-263
100. Williams, A. (1992) Ion conduction and discrimination in the sarcoplasmic reticulum ryanodine receptor/calcium-release channel. *J. Mus. Res. Cell Motil.* 13: 7-26

101. Willmontt, N., Sethi, J., Walseth, T., Lee H., White A., and Galione A. (1996) Nitric oxide induce mobilization of intracellular calcium via the cyclic ADP-ribose signalling pathway. *J. Biol. Chem.* 271: 3699-3705
102. Wray W., Boulikas T., Wray V. and Hancock R (1981). Silver staining of protein in polyacrilamide gels. *Analyt. Biochem.* 118: 197-203
103. Zhang L., Kelley J., Schmeisser G., Kobayashi Y. and Jones A. (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 23389-23397
104. Zucchi, R. and Ronca-Testoni, S. (1997). The sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ channel/ryanodine receptor: Modulation by endogenous effectors, drugs and disease states. *Pharm. Rev.* 49: 1-51