

00596/A



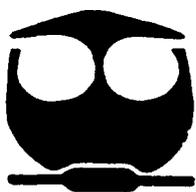
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

INFLUENCIA DE LA ADENOSINA Y SUS METABOLITOS SOBRE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE RYANODINA (RyR) DE MUSCULO ESQUELETICO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: DOCTOR EN CIENCIAS PRESENTA: QUIM. ARMANDO BUTANDA OCHOA



ASESOR: DR. MAURICIO DIAZ MUÑOZ

MEXICO, D. F. CIUDAD UNIVERSITARIA,

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

B

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Armando Gómez Puyou.

Vocal: Dr. Antonio Peña Díaz.

Vocal: Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez.

Vocal: Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco.

Secretario: Dr. Ignacio Camacho Arroyo.

Suplente: Dra. Alicia Ortega Aguilar.

Suplente: Dr. Luis A. Vaca Domínguez.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo receptor.

NOMBRE: Armando Butanda

FECHA: 6/11/2003

FIRMA: [Signature]

LUGAR DONDE SE REALIZÓ EL TRABAJO:

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM
(Departamento de Neurobiología Celular y Molecular)

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
(Departamento de Física y Química Teórica)

M. Díaz M.
Asesor: Dr. Mauricio Díaz Muñoz

[Signature]
Sustentante: Quím. Armando Butanda Ochoa

D

Al guardián de los herbarios del rey, mi padre: Ojalá que algún día pueda llenar tus zapatos....

A la guerrera invencible, mi madre: Mi fuerza y mi fe para continuar luchando contra viento y marea....

A mi alegría, mi hermanita: La ternura y la rebeldía en metro y medio de estatura....

A la Jefa, mi abuelita†: Espero poder seguir siempre tu ejemplo de amor y paciencia....

A mi familia toda: Gracias por el cariño que calienta el corazón....

Al la voz que cura, Mauricio: Su guía, su paciencia y tolerancia permitieron que el barco pudiera llegar a buen puerto....

Al Dr. Germund: Sus enseñanzas, su constante apoyo y buena disposición hicieron las cosas posibles....

Al tío Rolando: Su ayuda y apoyo solidarios también hicieron las cosas posibles...

A Consuelo, Luis, Marco y Rafa: mis cómplices de tantos sueños....

A Liliana, Daniel y el pequeño Sebastián: El rayito de luz que acompaña a todos los días....

A Adriana Monteón: Por tu amistad sincera y por las porras en los momentos de duda....

Y a todos aquellos que han creído en mí: Gracias de todo corazón, espero no defraudarlos jamás....

E

AGRADECIMIENTOS

Una vez más comprobé que nadie hace ciencia sólo, así que agradezco a mi comité tutorial: Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. Germund Höjer, Dra. Marina Gavilanes Ruíz y Dr. Luis Vaca Domínguez, por su guía para desarrollar mis estudios doctorales. Al Dr. Rolando Hernández Muñoz por permitirme trabajar en su laboratorio, sobre todo en aquellos primeros días desesperados. A la Dra. Victoria Chagoya y a la Biol. Susana Vidrio por las determinaciones mediante HPLC de las concentraciones de adenosina y demás purinas, para este estudio. Al jurado por sus comentarios para mejorar este documento. A la Biol. Olivia Vázquez y al Nutriólogo Fernando López Barrera por el procesamiento de las figuras empleadas en el artículo donde se publicaron los resultados de esta investigación. A la Universidad Nacional Autónoma de México por su vocación para formar profesionales comprometidos con su país. A todos gracias de todo corazón.

F

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| ANTECEDENTES | 5 |
| Los iones y los canales iónicos en la homeostasis celular: Una breve descripción. | 6 |
| El acoplamiento excitación-contracción: Evidencias de una interacción directa entre proteínas. | 7 |
| La estructura del RyR1: El papel de sus tres dominios en la modulación de su actividad. | 13 |
| El efecto de la ryanodina y sus sitios de unión en el RyR1. | 19 |
| La modulación del RyR1 por otras proteínas. | 21 |
| La modulación del RyR1 por modificaciones covalentes: Fosforilación y estado redox. | 25 |
| La modulación del RyR1 por diferentes efectores. | 27 |
| La modulación del RyR1 por nucleótidos de adenina y alquilxantinas. | 28 |
| El problema: La modulación del RyR1 por otros derivados de purina. | 34 |
| RESUMEN DE RESULTADOS | 39 |
| Modulación del RyR1 por la adenosina y sus metabolitos. | 40 |
| Cálculo del vector momento dipolar. | 44 |
| DISCUSIÓN | 47 |
| La adenosina y sus metabolitos como moduladores del RyR1. | 48 |
| La competencia de la adenosina y sus metabolitos con el AMP-PCP por los sitios de unión en el RyR1. | 50 |
| Desde un punto de vista fisiológico. | 52 |

El papel del vector momento dipolar en la modulación del RyR1
por la adenosina y sus metabolitos.

53

CONCLUSIONES

57

PERSPECTIVAS

60

UNA REFLEXIÓN FINAL

63

REFERENCIAS

65

APÉNDICE A (Artículo)

78

APÉNDICE B (Bases para el cálculo teórico)

106

G

El RyR1 participa como canal liberador de calcio en el acoplamiento excitación-contracción que se lleva a cabo en el retículo sarcoplásmico del músculo esquelético. Esta proteína es un homotetrámero de muy alto peso molecular (~565 KDa/subunidad) que al ser modulada por una gran variedad de efectores, presenta una actividad muy compleja. Entre estos moduladores se encuentran los derivados de purina como el ATP y la cafeína. Ambos son activadores del RyR1, pero ejercen sus efectos de manera distinta: el ATP aumenta la afinidad de la unión de [³H]-ryanodina y la probabilidad de apertura del canal, mientras que la cafeína incrementa la afinidad del RyR1 por el calcio y la frecuencia de los eventos de apertura del canal. Estas diferencias no sólo han permitido proponer sitios de unión distintos para ambas purinas, sino además, dos modos diferentes en que las purinas pueden accionar al RyR1.

Este estudio describe el efecto que otras purinas como la adenosina y sus metabolitos (adenina, inosina, hipoxantina, xantina y ácido úrico) tienen sobre la unión de [³H]-ryanodina en el RyR1, que es una prueba del estado funcional del canal. Los resultados indicaron que dicha unión fue incrementada por estas purinas en el siguiente orden: xantina > adenosina > adenina > inosina ≥ ácido úrico > hipoxantina. Este aumento en la unión de [³H]-ryanodina no modificó la afinidad al calcio, pero implicó, principalmente, un aumento en la afinidad del receptor por el alcaloide, mismo que obedeció a un incremento en la asociación de la [³H]-ryanodina.

La activación observada por la adenosina y por la inosina dependió del enlace β-glucosídico con la ribosa, ya que el efecto original de los nucleósidos no pudo ser reproducido al combinar la adenina o la hipoxantina con la ribosa.

En los experimentos de competencia, la influencia inhibitoria que el AMP-PCP (un análogo no hidrolizable del ATP) ejerció sobre las activaciones de la adenosina y la xantina, evidenció tanto la competencia por los sitios de unión, como la capacidad del RyR1 para discriminar entre las estructuras de las purinas competidoras.

Al considerar la estructura electrónica de la adenosina y sus metabolitos y la máxima activación inducida por esas purinas sobre el RyR1, se obtuvo una relación significativa entre el vector momento dipolar (μ) calculado por métodos *ab initio* y la actividad de esas purinas. Los resultados permitieron proponer al anillo de ribosa y al μ como factores involucrados en la modulación del RyR1 por la adenosina y sus metabolitos.

ABSTRACT

The RyR1 is the calcium release channel in the excitation-contraction coupling in the sarcoplasmic reticulum of the skeletal muscle. This is a homotetrameric protein of high molecular weight (~565 KDa/subunidad) with a complex activity as it is modulated by a great variety of agents. Among these agents are the purine derivatives such as the ATP and the caffeine. Both are activators of the RyR1, but their effects are exerted in different ways: ATP increases the affinity of the [³H]-ryanodine binding and the open probability of the channel, while caffeine increases the calcium affinity of the RyR1 and the open frequency of the channel. Such different effects have led to the proposal of the existence of distinct binding sites in the receptor structure for the two purine derivatives as well as distinct modes of action.

This study describes the effect that other purine derivatives, such as the adenosine and its metabolites (adenine, inosine, hypoxanthine, xanthine and uric acid), have in the [³H]-ryanodine binding of RyR1, which is a probe of the functional state of the channel. The results indicated that the [³H]-ryanodine binding was increased by these purines according to the next order: xanthine > adenosine > adenine > inosine ≥ uric acid > hypoxanthine. The increase in the [³H]-ryanodine binding was not calcium-dependent and was due to an augment in the affinity of the receptor for the alkaloid. Such results arose from an increase in the association of the [³H]-ryanodine.

The activation observed by adenosine and inosine depended on the β-glucosidic bond with the ribose, since the original effect of the nucleosides was not repeated by combining adenine or hypoxanthine with ribose.

In competition experiments, the inhibitory influence of AMP-PCP (an ATP nonhydrolyzable analogue) on the activator actions of adenosine and xanthine revealed an actual competition for the binding sites in the RyR1, as well as its ability to discriminate among the structures of the purine competitors.

When considering the electronic structure of adenosine and its metabolites and their maximal activation induced on the RyR1, a significant relationship between the dipole moment vector (μ) calculated by *ab initio* methods and the activity of those purines was obtained. The results led to the conclusion, that the ribose ring and the μ were factors involved in the modulation of the RyR1 by adenosine and its metabolites.

ANTECEDENTES

Los iones y los canales iónicos en la homeostasis celular: Una breve descripción.

La distribución de los iones inorgánicos (aniones y/o cationes) en los diferentes compartimentos celulares genera un gradiente electroquímico cuyo aprovechamiento está involucrado en diferentes procesos como los potenciales de acción neuronal, la liberación de neurotransmisores, la contracción muscular, la fosforilación oxidativa, etc. (Hodgkin y Huxley 1952; Mitchell 1961; Nicoll 1988; Berridge 1997; Bennett 1999; Weiss *et al.* 2001;). El paso de los iones a través de las barreras de fosfolípidos que delimitan tanto a la propia célula como a sus diferentes compartimentos, requiere de la intervención de proteínas de membrana especializadas que eliminen el impedimento físicoquímico que representa la permeación de los iones a través de dichas barreras hidrofóbicas.

El mecanismo de transporte transmembranal más rápido ocurre a través de los canales iónicos, capaces de transportar unos 10^7 iones/seg. En comparación, otros mecanismos de transporte iónico, como los acarreadores móviles y las bombas metabólicas, son más lentos y sólo transportan alrededor de 10^4 iones/seg. Los canales iónicos son proteínas multiméricas de alto peso molecular que presentan un interior hidrofílico que forma un poro por donde pasan los iones y un segmento exterior hidrofóbico que les permite insertarse en las membranas lipídicas. La estructura de los canales iónicos les permite sobresalir hacia ambos lados de la membrana en la que se encuentran insertados como en forma de reloj de arena. De esta manera, en los canales iónicos se pueden distinguir tres dominios: el extracelular, el transmembranal y el citoplásmico. Para los canales intracelulares los tres dominios son: el citoplásmico, el transmembranal y el luminal (hacia el interior del compartimiento intracelular) (Hille 1992; Butanda-Ochoa *et al.* 1996).

El papel de los iones en la homeostasis celular va más allá de la generación de potenciales electroquímicos. Así, mientras el sodio y el potasio son los cationes responsables de la generación de los potenciales de acción nerviosa, el calcio participa en otros procesos celulares, como la liberación de neurotransmisores como la acetilcolina, la activación de diferentes enzimas de interés metabólico o de señalización intracelular, como la calpaína o la calmodulina, y la regulación de la expresión génica, ya sea por vía rápida y sin la necesidad de síntesis de nuevas proteínas, como algunos factores de transcripción, o por la vía lenta donde se requiere de la síntesis de nuevas proteínas que intervienen más directamente en la fisiología celular. Estudios neuronales recientes han revelado que los mecanismos de transducción promovidos por el calcio intracelular dependen de la ruta de acceso del calcio al citoplasma. De esta forma el calcio puede afectar diferencialmente procesos que son relevantes en el desarrollo y la plasticidad del sistema nervioso, incluyendo la supervivencia celular, la modulación sináptica y la muerte celular (Nicholls *et al.* 1992; Ghosh *et al.* 1995; Bennett 1999).

En virtud de que la homeostasis celular es regulada por el calcio, es importante comprender la dinámica de este catión en el interior de la célula, la cual es producto del calcio que entra y que sale de la célula y/o de reservorios internos,

como el retículo endoplásmico o la mitocondria. Un elemento importante en la dinámica del calcio intracelular es el receptor de ryanodina (RyR), que es un canal liberador de calcio ubicado en la membrana del retículo endoplásmico en diferentes tejidos. Este receptor debe su nombre a la gran afinidad que presenta por este alcaloide vegetal (Sutko *et al.* 1997). Existen tres genes que codifican para tres isoformas de esta proteína: la esquelética (ó RyR1), la cardíaca (RyR2) y una tercera (RyR3) que es más ubicua, pero que se encuentra en menor proporción con respecto a las dos primeras isoformas (Sorrentino y Volpe 1993; Franzini-Armstrong and Protasi 1997).

En particular, entre el RyR1 y el RyR2 existe una similitud de un 66%; no obstante, presentan tres zonas de divergencia: la zona de divergencia 1 (D1) se ubica entre los aminoácidos 4254-4631 en el RyR1 y 4210-4562 en el RyR2. La D2 se ubica entre los aminoácidos 1342-1403 en la isoforma muscular y entre los aminoácidos 1353-1357 en la isoforma cardíaca. La D3, que es transmembranal, se localiza entre los aminoácidos 1872-1923 del RyR muscular y entre los aminoácidos 1852-1890 para el RyR cardíaco (Volpe y Sorrentino 1993).

Tanto en el RyR2 como en el RyR3, la liberación de calcio ocurre a través de un mecanismo conocido como liberación de calcio inducida por calcio, es decir que un incremento de la concentración del calcio en el citoplasma activa la liberación del calcio a través del receptor.

El acoplamiento excitación-contracción: Evidencias de una interacción directa entre proteínas.

En el RyR1 la liberación del calcio es activada por un mecanismo diferente, denominado acoplamiento excitación-contracción (E-C), que requiere del contacto directo con otro receptor sensible a derivados de la 1,4-dihidropiridina. En las células musculares (miocitos), el receptor de dihidropiridina (DHPR) se ubica en las invaginaciones de la membrana plasmática o túbulos transversos (Fig. 1). Esta proteína está conformada por cuatro subunidades: la $\alpha 1s$ (190-212- kDa), la $\alpha 2-\delta$ (125 KDa), la β (52-58 kDa) y la γ (25 kDa) (Hamilton *et al.* 2000). Se ha encontrado que la microinyección de miocitos provenientes de ratones disgénicos (sin el DHPR) con el cDNA del DHPR, reestablece normalmente la E-C y la corriente lenta de calcio, por lo que el DHPR actúa como un sensor de voltaje y como un canal de calcio en este acoplamiento de E-C (Tanabe *et al.* 1988, 1990a). En comparación con la isoforma cardíaca, la liberación de calcio a través del RyR1 no requiere de la entrada extracelular de calcio (Tanabe *et al.* 1990).

La E-C se lleva a cabo a través del contacto directo entre el DHPR y el RyR1 (Fig. 2a). Del primero interviene la subunidad $\alpha 1$ a través del asa I-II y del asa II-III, que es el sitio más relevante en este fenómeno (Tanabe *et al.* 1990). El

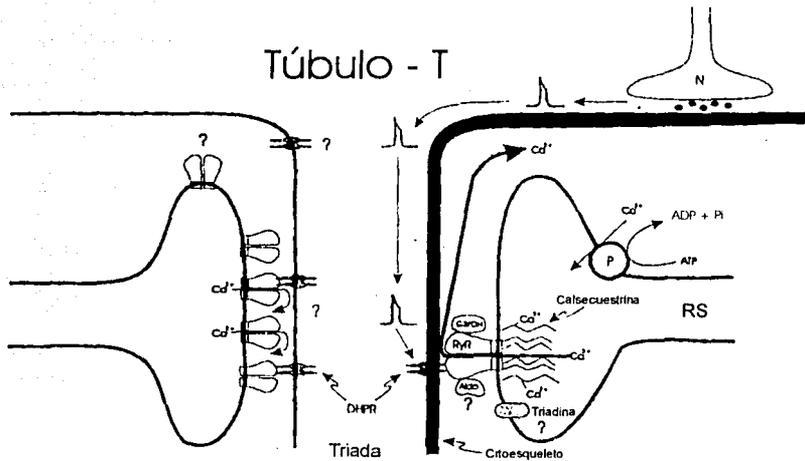


Fig. 1. Triada. La placa neuromuscular (N) transmite una despolarización de la membrana plasmática que continúa hasta las invaginaciones de la membrana plasmática (túbulos T) donde se localizan canales de calcio sensibles al voltaje denominados receptores de dihidropiridinas (DHPR) que por contacto directo modifican la conformación del RyR1, mismo que actúa como canal liberador de calcio en la excitación-contracción. Los DHPR's se acoplan con cada subunidad del RyR1 formando tétradas. Se estima que el RyR3 se encuentra desacoplado, pero su activación para liberar calcio se promueve a través de la concentración de calcio en el citoplasma. La fisiología del RyR1 es modificada por varias proteínas como la triadina, la calsequestrina y algunas enzimas glucolíticas (proveedoras de ATP) como la aldolasa (Aldo) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Tomada de Sutko y Airey (1996).

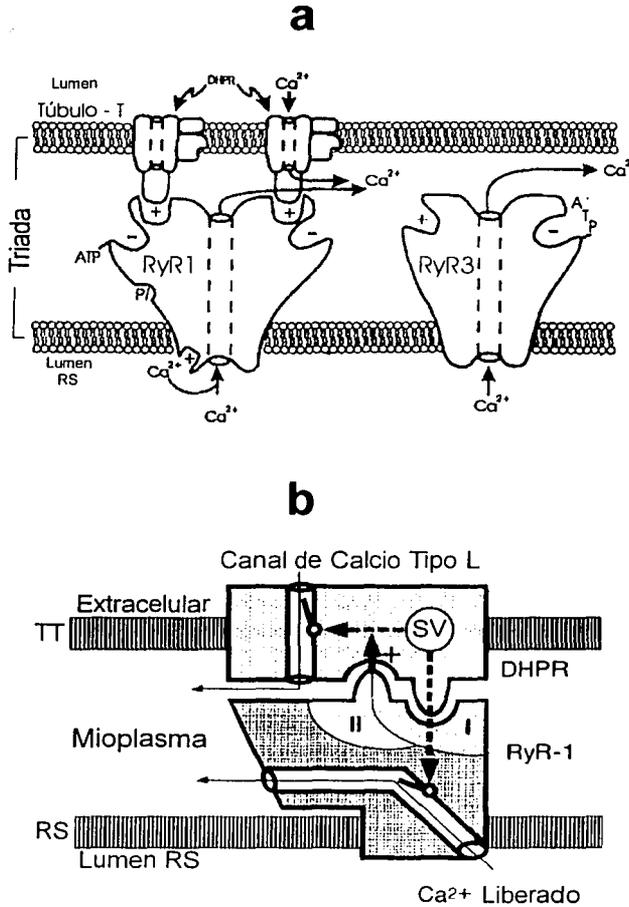


Fig. 2. Acoplamiento de excitación-contracción. a) El contacto directo entre la subunidad $\alpha 1$ (asa II-III) del DHPR induce un cambio conformacional que activa al RyR1 para liberar calcio a través de su poro iónico. El RyR3 está desacoplado, pero su activación ocurre a través de la propia concentración de calcio en el citoplasma. b) Una vez que el RyR1 recibe la señal de la E-C en su región I (aminoácidos 1635-2636), también es capaz de inducir una señal retrograda, mediante sus regiones I y II (aminoácidos 2659-3720), que favorece la actividad del DHPR. a) Tomada de Sutko y Airey (1996). b) Tomada de Nakai *et al.* 1998.

uso de péptidos sintéticos ha permitido proponer que la región comprendida entre Thr⁶⁷¹-Leu⁶⁹⁰ del DHPR interviene en la liberación del calcio a través del RyR1. Dentro de este segmento, los aminoácidos Arg⁶⁸¹-Leu⁶⁹⁰ conforman una región mínima y esencial para la activación del RyR1 (El-Hayek et al. 1995). La distribución de cargas positivas presentes en esta región de 14 aminoácidos y su estructura primaria son relevantes en la capacidad del DHPR para activar específicamente al RyR1 (El-Hayek et al. 1998). En particular, la doble mutación en el DHPR esquelético (K677E/K682E) ha revelado que las cargas positivas en estas posiciones son importantes para la unión con el RyR1 (Leong y MacLennan 1998).

El papel de estos segmentos aún debe ser analizada, (Stange *et al.* 2001), ya que, a través de estudios electrofisiológicos, se ha encontrado que el péptido comprendido entre los aminoácidos 671-680 activa específicamente al RyR1 (activado casi al máximo con concentraciones micromolares de calcio), pero también se han encontrado que el péptido con los aminoácidos 671-690, muestra un doble efecto de activación-inactivación, que indica la presencia de sitios de reconocimiento de efecto activador (de alta afinidad) y sitios de efecto inhibidor (de baja afinidad) en el RyR1. Además de lo anterior, otros péptidos más cortos (aminoácidos 681-690 y 681-685) que contienen la región rica en cargas positivas (RKRRK), que se ha propuesto como esencial para activar específicamente al RyR1, fracasaron en estimular específicamente a esa isoforma del receptor. De hecho, los péptidos 671-690, 681-690 y 681-685 indujeron estados de subconductancia similares y eventos de cierre de larga duración tanto en el RyR1 como en el RyR2, indicando que estos péptidos interactúan con los RyR's independientemente de la isoforma de que se trate.

El uso de otros péptidos sintéticos del asa II-III ha sugerido que la región entre Glu⁷²⁴-Pro⁷⁶⁰ funciona como un bloqueador de dicha liberación de calcio. De esta manera se ha supuesto que en el estado de reposo la región bloqueadora ocupa el sitio que recibe la señal de activación; cuando ésta llega, el dominio bloqueador desocupa el sitio, mismo que es ocupado a continuación por el dominio activador que promueve la liberación de calcio. Apparently, entre ambas regiones se encuentra otra, comprendida entre Phe⁷²⁵- Gly⁷⁴³, que actúa como una especie de bisagra que media entre la activación y el bloqueo de la liberación del calcio (El-Hayek et al. 1995). Sin embargo, nuevamente existe contradicción con los resultados de Stange *et al.* (2001), que muestran que el péptido comprendido entre los aminoácidos 720-765 del DHPR esquelético activa específicamente al RyR1 (activado casi al máximo con calcio micromolar).

En cuanto al RyR1, se han encontrado diferentes regiones necesarias para su interacción con el DHPR. Así, la eliminación de la D2, completa o de tan sólo su mitad amino-terminal, permite que la función del RyR1 como canal liberador de calcio se conserve, incluso si la D2 es sustituida por la correspondiente del RyR2; sin embargo, se pierde la E-C. Entonces, aunque la D2 parece ser crítica para que la E-C se lleve a cabo, no es suficiente para determinar las diferencias funcionales entre la isoforma esquelética y la isoforma cardiaca del RyR (Yamazawa *et al.*

1997). Existen, no obstante, resultados que contradicen la relevancia de la D2 en la E-C y proponen, en su lugar, otra zona de divergencia: la D3 (aminoácidos 1872-1923), como la zona importante para la E-C (Nakai et al. 1998).

El uso de quimeras entre el RyR1 y el RyR2 ha revelado otro segmento de 37 aminoácidos (Arg¹⁰⁷⁶-Asp¹¹¹²) en el RyR1, importante para su unión específica con el DHPR en la E-C (Leong y MacLennan 1998).

Si bien existe una señal estimuladora del DHPR hacia el RyR1, también existe una señal retrógrada del RyR1 hacia el DHPR que provoca un aumento de la densidad de la corriente de calcio de tipo L en el DHPR; es decir, esta señal retrógrada favorece la actividad de canal de calcio del DHPR (Nakai et al. 1996). La región comprendida entre los aminoácidos 1635-2636 del RyR1 recibe la señal para el acoplamiento de la E-C, mientras que la región entre los aminoácidos 2659 y 3720 participa, además, en la estimulación retrograda de la actividad del DHPR (Nakai et al. 1998) (Fig. 2b). Es muy probable que la señal retrógrada que produce el RyR1 se lleve a cabo también a través del contacto directo con el DHPR, pues se ha visto que la liberación de calcio no es la señal de retroalimentación del RyR1 para aumentar la corriente de calcio a través del DHPR. De hecho, esta señal de retroalimentación es recibida en el segmento comprendido entre los aminoácidos 720 y 765 del asa II-III de la subunidad $\alpha 1$ del DHPR, que se ha propuesto como bloqueadora de la liberación de calcio a través del RyR1 (El-Hayek et al. 1995). Dicho segmento también es crítico para la E-C (Nakai et al. 1998a). Inconsistencias como ésta han limitado el establecimiento claro de la región específica del asa II-III del DHPR que regula la actividad del RyR1 (Nakai et al. 1998a). De esta manera, aunque los resultados obtenidos por biología molecular han revelado la necesidad de ambos receptores para la realización de la E-C, ello no ha proporcionado evidencia contundente para precisar el contacto directo entre las dos proteínas. Asimismo, los resultados obtenidos con péptidos sintéticos han llevado a proponer la región N-terminal del asa II-III como la activadora del RyR1, descartando la posibilidad de que dichos péptidos pudiesen ser reconocidos en otros sitios de interacción en el RyR1 (tal vez hacia su región C-terminal) que también resultasen relevantes para la regulación de ese canal liberador de calcio.

Las evidencias más fuertes respecto a la interacción proteína-proteína en la E-C, provienen del estudio de la disposición del DHPR y del RyR1 en la triada formada por los túbulos transversos y las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico. Ahí, cuatro DHPR's circundan al homotetrámero del RyR1 –uno por cada subunidad–. En el modelo propuesto, estas tétradas están ordenadas en líneas rectas dispuestas en diagonales, por lo que se acepta que algunos RyR1's no están acoplados con los DHPR's (Protasi et al. 2000; Fessenden et al. 2000). Así mismo, la isoforma RyR3 está presente en el tejido muscular y, aunque en forma muy secundaria, participa de la E-C a través de la liberación de calcio inducida por el calcio que entra a través del DHPR y por el calcio que se libera del RyR1 (Fessenden et al. 2000) (Fig. 2a). Como se requiere de la presencia y el acoplamiento del DHPR y del RyR1 para que se lleve a cabo la E-C, se ha

propuesto que el DHPR (mediante su subunidad $\alpha 1$) induce, por contacto físico, un cambio conformacional en el RyR1 que permite la liberación al citoplasma del calcio necesario para iniciar, posteriormente, la contracción muscular. Cuando la concentración de calcio intracelular alcanza un nivel crítico, produce un cambio conformacional en la troponina C que se extiende por las troponinas I y T hasta la tropomiosina que permite que la cabeza de miosina entre en contacto con la actina F para que ocurra el desplazamiento de los miofilamentos (Voet y Voet 1990).

Se ha sugerido (Lu *et al.* 1995) que la interacción del DHPR con el RyR1 puede estar modulada por la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA), ya que la fosforilación mediada por la PKA de la Ser⁶⁸⁷ de asa II-III del DHPR, reduce la capacidad de ese péptido para activar al RyR1.

No todos los RyR1's son activados a través del contacto con el DHPR; algunos se activan mediante su acoplamiento con otros RyR1's. La coexpresión del RyR1 y de la inmunofilina FKBP12 (la principal inmunofilina en las células T, que estabiliza al RyR1 y se une a él con una estequiometría de 1:4) en células de insecto sf9 (carentes de la maquinaria para la E-C), ha mostrado que la FKBP12 permite el acoplamiento entre los RyR1's desacoplados con el DHPR y los RyR1's acoplados (Marx *et al.* 1998), propagándose así la liberación de calcio, la cual se suma a la liberación de los pocos RyR3's presentes. Aparentemente, estos últimos no presentan una afinidad considerable por la inmunofilina en comparación a los RyR1's (Fessenden *et al.* 2000).

Los ensayos de la unión específica con [H^3]-ryanodina utilizando al RyR1 recombinante (expresado en células de insecto sf21), han mostrado que las isotermas de saturación con ese ligando se alejan del patrón hiperbólico tradicional y en su lugar muestran un patrón sigmoidal que presenta una cooperatividad positiva (coeficiente de Hill = 2.1 ± 0.2) (Antaramián *et al.* 2001). Si se considera una estequiometría de 1:1 entre el receptor y el alcaloide, es posible pensar que el acoplamiento de estos receptores entre sí, esté mediado por otros elementos diferentes a la FKBP12.

Mediante la coexpresión del RyR1 con el RyR3 en mioblastos 1B5, se ha observado que el RyR1 es el responsable de la organización de las tétradas con los DHPR o también llamadas unidades liberadoras de calcio. El RyR3 se expresa de forma independiente y azarosa al RyR1 y no influye en la formación de dichas unidades funcionales (Protasi *et al.* 2000; Fessenden *et al.* 2000).

Como en muchos otros mecanismos celulares, existe una contraparte que mantiene la homeostasis celular. Así, la ATPasa dependiente de calcio ubicada también en la membrana del retículo sarcoplásmico es la encargada de recargar de calcio a esa poza intracelular. En estado de reposo (Marie y Silva 1998), se establece un equilibrio dinámico con el medio a través de una apertura parcial del RyR1 y un consumo continuo de ATP; es decir, el incremento del nivel de calcio en el citoplasma como consecuencia de la liberación del calcio a través del RyR1

(o en menor proporción del RyR3) da lugar a una elevación local de la concentración de calcio de 0.05-0.1 a 1-2 μM (esencial para activar la contracción muscular). El exceso del calcio libre en el citoplasma debe ser reintroducido al retículo sarcoplásmico a través de la ATPasa de calcio, evitándose que ese reservorio se vacíe. De esta manera, si el RyR1/3 o la ATPasa de calcio permanece parcialmente activo, la otra proteína debe estar activa para conservar la concentración de calcio en el citoplasma y en el lumen del retículo sarcoplásmico. Este ciclo de liberación y recaptura de calcio requiere, entonces, de: 1) la coordinación entre el RyR1/3 y la ATPasa de calcio que se lleva a cabo mediante la disponibilidad de ese catión, determinándose así la sensibilidad del RyR1/3 y de la ATPasa al calcio libre extravascular; y 2) de la hidrólisis de ATP, la cual significa un 30% del gasto energético del músculo en reposo. De hecho, cuando algún mecanismo a nivel del sarcolema restringe la disponibilidad del calcio (Bianchi 1992), la demanda energética puede ser hasta del 70 al 80%.

La estructura del RyR1: El papel de sus tres dominios en la modulación de su actividad.

Para entender mejor la fisiología de cualquier proceso celular, es fundamental el conocimiento de la estructura de los elementos participantes. En el RyR1 se pueden distinguir tres dominios estructurales: el citoplásmico, el transmembranal y el luminal. El gran tamaño de este receptor ha permitido la observación de la arquitectura superficial de estos tres dominios a través de la criomicroscopía electrónica (Wagenknecht *et al.* 1996; Samsó y Wagenknecht 1998), en la cual se embebe la proteína en una solución amortiguadora con el que se forma película delgada y vítrea que provee del arreglo cristalino necesario para generar posteriormente una confiable reconstrucción de imágenes a una resolución de unos 3 nm (Wagenknecht y Radermacher 1997). Debido a su gran tamaño y a que es una proteína integral de membrana, las perspectivas para determinar la estructura del RyR1 a nivel atómico en el futuro inmediato, son escasas.

Actualmente, se cuenta con dos reconstrucciones tridimensionales del RyR1 (Radermacher *et al.* 1994; Serysheva *et al.* 1995), que arrojan resultados compatibles. Las diferencias entre ambos esfuerzos se centran en la región transmembranal y se deben, probablemente a la resolución lograda en cada caso.

En una vista desde el citoplasma (Wagenknecht *et al.* 1997) (Fig. 3), las imágenes muestran al RyR1 como un complejo de geometría cuadrada (29 x 29 nm) con sus cuatro subunidades (también cuadradas) totalmente simétricas entre sí, con tres orificios por cada subunidad y diversos canales menores, que probablemente representan rutas de salida del calcio que rodean radialmente al poro central de permeación iónica, el cual se ha estimado en unos 5 nm de diámetro. Sin embargo en su parte más estrecha es de unos 0.7 nm de diámetro y de cerca de un nm de longitud (Orlova *et al.* 1996).

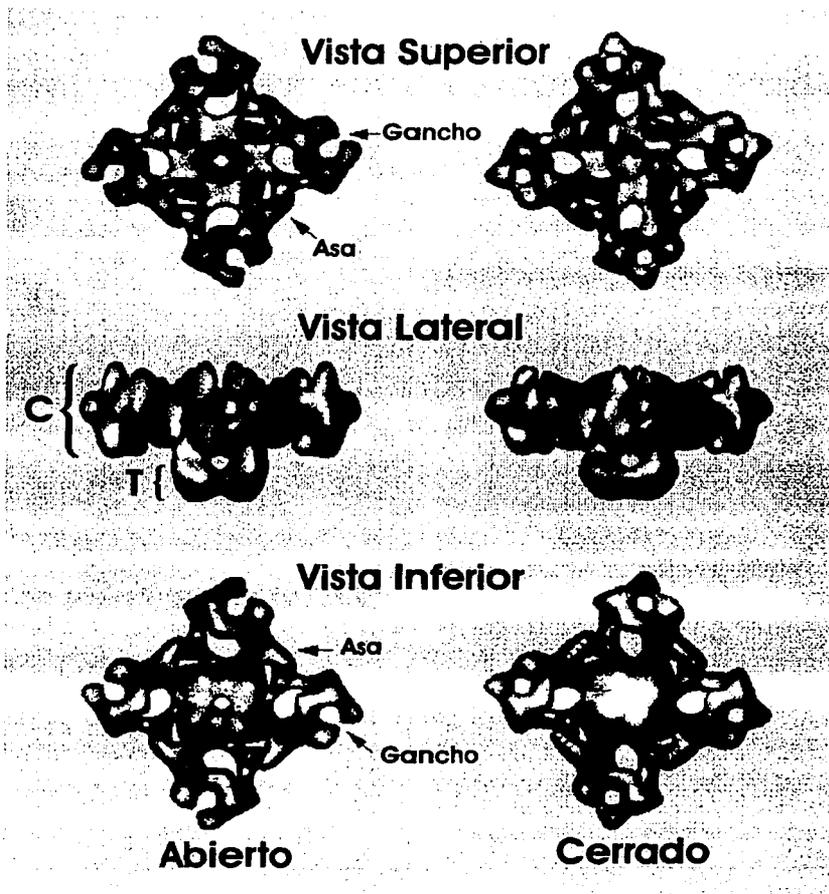


Fig. 3. Reconstrucción del RyR1. Mediante la criomicroscopía electrónica se ha reconstruido la estructura del RyR1. Con una resolución de 3 nm se muestran los estados abierto y cerrado del RyR1 en tres vistas: desde el citoplasma, lateralmente y desde el lumen del retículo sarcoplásmico. En esta reconstrucción de imágenes el dominio transmembranal (T) muestra una forma que recuerda a la base de un hongo. El dominio citoplásmico (C) presenta una simetría tetramérica alrededor del poro iónico central por donde pasan los iones de calcio. También se aprecian los dominios de gancho o abrazaderas unidos a la parte central del canal a través de las asas. Tomada de Orlova *et al.* (1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La vista lateral del RyR1 permite observar la forma de hongo del receptor y destacar la mayor proporción del dominio citoplásmico (80 % de su masa) con respecto a los dominios transmembranal y luminal. La altura del dominio citoplásmico, de unos 12 nm, es suficiente para conectar al retículo sarcoplásmico con los elementos de las membranas exteriores, como los DHPR's (Wagenknecht *et al.* 1997; Franzini-Armstrong y Protasi 1997).

El dominio transmembranal constituye el tallo del hongo que forma el RyR1 (~15% de la masa de la proteína). En la reconstrucción de imágenes, las subunidades se aprecian como cuatro columnas simétricas (12 x 12 nm) que lo conectan con el dominio citoplásmico. Hasta el momento no se ha determinado el número de cruces transmembranales que componen a esta porción de la proteína, pero se cuenta con diferentes modelos (Franzini-Armstrong y Protasi 1997) en los que esencialmente se proponen, ya sea cuatro segmentos (M1-M4) localizados en la región comprendida entre los aminoácidos 4564-4580 de la región carboxi-terminal, o bien 10 segmentos (M1-M10) entre los aminoácidos 3978-4932 con dos adicionales (M' y M'') entre los aminoácidos 3123-3143 y 3187-3205, respectivamente.

Comparativamente, el dominio luminal es el menor de los tres que constituyen al RyR1; forma la base del hongo y en él también se observa una simetría de cuatro elementos, aunque de menor tamaño en comparación a los otros dos dominios. Asimismo, se puede apreciar el poro central por donde permea el calcio, con un diámetro de unos 0.7 nm (Wagenknecht *et al.* 1997; Serysheva *et al.* 1999).

No obstante que sólo se cuenta, por lo pronto, con una estructura cristalográfica preliminar de la región de divergencia 2 (D2) del RyR1 (Kim *et al.* 1999). La criomicroscopía electrónica ha permitido caracterizar el estado cerrado y los diferentes estados abiertos del canal inducidos esencialmente por el conjunto Ca^{2+} /ryanodina (100 μM / 100 μM), por el Ca^{2+} (100 μM) y por el Ca^{2+} /AMP-PCP (100 μM / 1 mM) (Orlova *et al.* 1996; Serysheva *et al.* 1999). El AMP-PCP es un análogo no hidrolizable del ATP, ampliamente usado en la caracterización de la actividad del RyR. De la comparación con el estado cerrado (en ausencia de Ca^{2+}) se pueden distinguir tres estados abiertos diferentes: uno de transición (en presencia de Ca^{2+} 100 μM), otro completamente abierto (con Ca^{2+} /AMP-PCP) y un tercero que es inducido por la mezcla de Ca^{2+} /ryanodina que produce una mayor apertura del canal en comparación a las otras dos condiciones. Esta apertura, que va acompañada por una rotación de 4° de su región transmembranal en sentido opuesto a las manecillas del reloj; alcanza un diámetro de ~1.8 nm en su parte más estrecha, la cual y se ubica a 2 nm de la cara luminal del canal.

En estos cambios conformacionales se ha podido destacar el movimiento de las cuatro regiones más externas del dominio citoplásmico denominadas como los "ganchos" o las "abrazaderas" que forman las esquinas de cada subunidad (Fig. 3). Estas abrazaderas se separan completamente de la proteína en presencia de Ca^{2+} /AMP-PCP, como cuando se levanta un dedo. En la activación de canal

también se puede apreciar un movimiento de la masa transmembranal a la manera en que el diafragma de una cámara se abre y se cierra. El movimiento es parcial con el Ca^{2+} y completo con el Ca^{2+} /AMP-PCP; sin embargo, de las dos anteriores, la presencia de Ca^{2+} /ryanodina promueve un movimiento aún más significativo y apreciable (Orlova *et al.* 1996; Serysheva *et al.* 1999).

Además de los estados de apertura y cierre del canal, la reconstrucción tridimensional de la arquitectura del RyR1 ha permitido ubicar sitios de reconocimiento para la calmodulina y la inmunofilina FKBP12. Ambas proteínas modulan y están asociadas al receptor; sus sitios de reconocimiento se han localizado, como la mayoría de los sitios reguladores, en el dominio citoplásmico de la proteína a 10 y 12 nm, respectivamente, de la entrada al poro iónico central. Se trata de cuatro sitios por subunidad para cada proteína, que están separados diagonalmente unos 9 nm. Cada sitio para la FKBP12 se ubica más hacia la superficie del hongo, mientras que los sitios para la calmodulina se localizan muy cercanos al tallo de dicho hongo (Wagenknecht *et al.* 1997).

Se ha demostrado que la FKBP12 interviene en el acoplamiento entre los RyR's musculares (Marx *et al.* 1998). Considerando los arreglos limitados que éstos presentan en las diferentes micrografías cuando están aislados (Saito *et al.* 1988) y la ubicación de los sitios para esta inmunofilina en la reconstrucción de imágenes, se ha propuesto que puede existir un acomodo tal de los receptores, que la intervención de la FKBP12 puede implicar efectos alostéricos en la interacción de cada RyR1 (Wagenknecht *et al.* 1997). Queda por aclarar si los arreglos tan limitados que muestran los RyR1's aislados son iguales a los que se tienen *in vivo*.

A través de la criomicroscopía electrónica, también se han localizado secuencias epitopes en la estructura del RyR1 (aminoácidos 4425-4621) que reconocidos por anticuerpos monoclonales de ratón. La reconstrucción de imágenes ha revelado que los anticuerpos se unen en las regiones denominadas "asas del dominio citoplásmico", cerca de las uniones con el dominio transmembranal. (Benacquista *et al.* 2000). Asimismo, la reconstrucción tridimensional del RyR1, ha mostrado la ubicación (a 11 nm del poro iónico, entre las llamadas aspas y abrazaderas que forman los bordes de cada subunidad) de sitios de unión para la imperatoxina A. Este péptido, al parecer, presenta cierta similitud con el asa II-III del DHPR, por lo que dichos sitios, pudieran tener alguna relevancia en la E-C (Samsó *et al.* 1999).

De igual manera, el RyR3 también se ha visualizado utilizando la criomicroscopía electrónica, ya sea en su forma nativa (al ser aislado del diafragma bovino) (Sharma *et al.* 2000) o en su forma recombinante (expresado en células HEK293) (Liu *et al.* 2001). Ambas reconstrucciones son muy parecidas entre sí. El RyR3 presenta la misma simetría que el RyR1 y una similitud de un 70% aproximadamente. Sin embargo, el RyR3 no muestra la región correspondiente a los aminoácidos 1303-1406, que en el RyR1 constituyen la D2. La comparación de los estados cerrado y abierto del canal en el RyR3, muestra

solamente cambios muy sutiles y una rotación de unos 4° del dominio transmembranal con respecto al citoplásmico.

La evidencia experimental ha mostrado ampliamente que la modulación del RyR1 está centrada principalmente en su dominio citoplásmico. Se ha visto que, por ejemplo, la eliminación de la región comprendida entre los aminoácidos 1641 y 2437, pertenecientes a ese dominio, provoca un fenómeno de rectificación en la conducción de los iones Cs⁺; es decir, que la corriente iónica es más grande hacia el citoplasma que hacia el lumen del retículo sarcoplásmico. Además, el receptor truncado es unas 10 veces menos sensible para ser inhibido por el calcio en comparación al RyR1 silvestre (wt-RyR1) (Bhat *et al.* 1997). Al examinar la secuencia primaria del receptor se encuentra que la región eliminada contiene 111 Glu, 36 Asp, 55 Arg y 23 Lys (Takeshima *et al.* 1989). En total 69 cargas negativas netas que son removidas del dominio citoplásmico. Suponiendo una estructura funcional tetramérica del canal, se tienen $69 \times 4 = 276$ cargas negativas menos que en el caso del receptor silvestre. Es posible que estas cargas negativas se ubiquen cerca del poro de conducción iónica, y su presencia incrementa la corriente de iones hacia el citoplasma celular, permitiéndose así la liberación del Ca²⁺. Lógicamente, la ausencia de esa región con cargas genera el efecto rectificador en la corriente de iones. El bloqueo por voltaje del canal está descartado, ya que no se observó ninguna distribución asimétrica de cargas en la superficie de la membrana. Es probable, también, que la disminución en la susceptibilidad para ser inhibido por el Ca²⁺ que presenta el canal truncado, se deba a la pérdida de sitios de unión a calcio localizados entre los aminoácidos 1861-2094 (Chen y MacLennan 1994).

En el dominio citoplásmico se ubican la mayoría de los sitios de unión a diferentes agentes moduladores, sin embargo el dominio transmembranal es suficiente para formar un canal liberador de calcio funcional con propiedades normales (Bhat *et al.* 1997; Bhat *et al.* 1997a,b), pero que muestra el efecto de rectificación ya mencionado. Además, el canal truncado retiene algunos de los sitios potenciales de unión al Ca²⁺ (aminoácidos 4253-4264-, 4407-4416 y 4489-4499) que presumiblemente contribuyen en la activación por calcio (Takeshima *et al.* 1989), por lo que conserva, aproximadamente, la misma afinidad para ser activado por el calcio (2-20 μ M) que el wt-RyR (0.25 μ M). (Bhat *et al.* 1997). Esto último indica que los sitios de baja afinidad (mM) involucrados en la inactivación por Ca²⁺ en el RyR1 se ubican en el dominio citoplásmico de la proteína, mientras que los sitios de alta afinidad (nM- μ M) que perciben la activación del receptor se ubican en la región transmembranal que forma el canal de conducción iónica. No obstante, si los sitios de activación de calcio forman parte del poro iónico o son los sitios de inactivación –o ambos– es aún dudoso, ya que se ha visto, a través de estudios de bicapas lipídicas planas, que un incremento de la concentración de calcio de μ M a mM disminuye la actividad del canal, sugiriendo que el calcio luminal pasa a través del canal iónico para inhibirlo, implicando que los sitios de inactivación corresponderían a aquellas secuencias localizadas alrededor del poro de conducción iónica acuoso (Tripathy y Meissner 1996; Kurebayashi y Ogawa 1998).

La ubicación y la regulación de los sitios de unión al calcio aún permanecen bajo discusión. Así, la sustitución de la región de divergencia D3 en la secuencia del RyR1 por la correspondiente del RyR2, ha mostrado que esta región citoplásmica no constituye ningún sitio de inactivación de calcio (Du y MacLennan 1999). Sin embargo, otros resultados en donde se ha eliminado la D3, han mostrado que ésta puede constituir un sitio de inactivación de calcio (o de regulación alostérica a altas concentraciones de calcio) y también puede ejercer una acción inhibitoria sobre el sitio de activación de calcio (Hayek *et al.* 2000). Las quimeras del RyR1/RyR2 también han mostrado que la sustitución de la región transmembranal, especialmente de la región comprendida entre los aminoácidos 4382-4628 ejerce una acción inhibitoria sobre la activación por calcio y que la región entre los aminoácidos 4187-4381 está asociada y probablemente forma el sitio -o uno de los sitios- de inactivación por calcio en el RyR1 (Du y MacLennan 1999; Du *et al.* 2000).

Otros resultados también han identificado sitios de activación y de inactivación de calcio en la porción carboxilo-terminal del RyR1, cerca de la región que forma el poro de conducción iónica (Chen *et al.* 1998; Buck *et al.* 1992; Nakai *et al.* 1999). De hecho se ha propuesto que el sitio de activación (de alta afinidad) de calcio se ubica en el Glu⁴⁰³² que estima estar localizado en el segmento transmembranal dos (TM2) de la porción carboxy-terminal del receptor (Chen *et al.* 1998). La eliminación de buena parte de la sección amino-terminal o "pie" del receptor evita la inactivación por elevaciones en el calcio citoplásmico (Bhat *et al.* 1997c; Hayek *et al.* 1999), por lo que se ha sugerido que los dominios de activación y de inactivación del calcio pueden establecer una interacción alostérica (Hayek *et al.* 2000).

No obstante, la mutación del Glu⁴⁰³² por Ala, suprime casi totalmente la activación por calcio del RyR1, aún cuando el canal mutado conserva, aunque disminuida, la capacidad de ser estimulado por el DHPR. Esto indica que para iniciar la liberación del calcio durante la E-C, no se requiere de la activación por calcio del receptor (O'Brien *et al.* 2002).

Experimentos de estructura función, también han resaltado la importancia del dominio transmembranal en la modulación de la actividad del RyR1, de tal manera que los aminoácidos: Glu⁴⁰³² (TM2), Asn⁴⁸⁰⁶,(TM7), Asp⁴⁸¹⁵(TM7), Asp⁴⁹¹⁷(TM10) y Gln⁴⁹³³(TM10) están involucrados en la función y en la regulación del canal, en particular en lo que respecta a la respuesta a otros activadores de la liberación de calcio a través del RyR1 como la cafeína, el 4-cloro-m-cresol y la [³H]-ryanodina (Du y MacLennan 1998). Al mismo tiempo, estos experimentos favorecen el modelo de 10 segmentos transmembranales para dicho dominio en el RyR1. No obstante, el número de segmentos aún permanece indefinido.

El efecto de la ryanodina y sus sitios de unión en el RyR1.

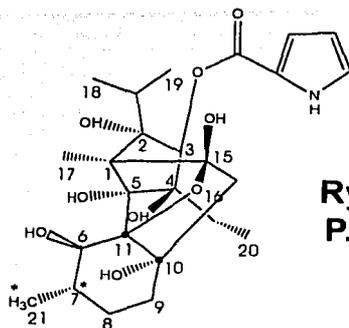
Ya se ha comentado que el nombre de receptor de ryanodina fue adoptado debido a la gran afinidad con que esta proteína reconoce a ese alcaloide vegetal. En un principio, éste se extraía de la madera del tallo de un arbusto originario de América tropical (*Ryania speciosa* Vahl) para ser utilizada como insecticida (Rogers *et al.* 1948; Jenden y Fairhurst 1969; Sleumer 1980).

Se ha aceptado que la ryanodina (Ryanodol 3-1H-pirrol-2-carboxilato) (Fig. 4a) se une a sitios en el receptor, exhibiendo alta (K_d 1-10 nM) y baja (1-10 μ M) afinidad. La unión de alta afinidad provoca la activación del canal, mientras que la unión de baja afinidad provoca la inhibición del canal. Tras la determinación de la estructura de la ryanodina (Wiesner 1972), se logró la síntesis del alcaloide y el desarrollo de estudios para aislar, identificar y caracterizar a la familia de los receptores de ryanodina (Sutko *et al.* 1997).

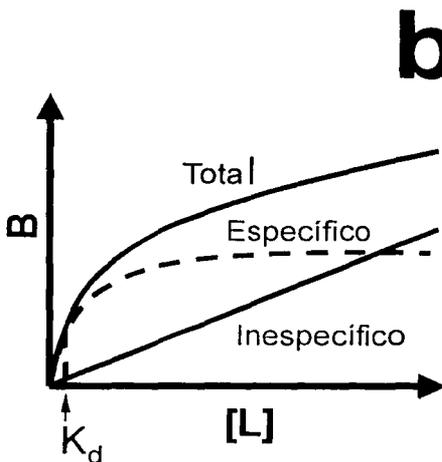
Se ha mostrado que la unión específica de alta afinidad de [H^3]-ryanodina estabiliza múltiples estados conformacionales del receptor que se asocian a diferentes estados de conductancia y subconductancia del canal (Buck *et al.* 1992). Por lo que, dicha unión de alta afinidad, es producto de la actividad del canal en el RyR1, esto ha permitido contar con una prueba del estado funcional de ese receptor-canal; es decir, que aquellos agentes que promueven su activación, estimulan también la unión específica del alcaloide. Mientras que aquellos agentes que inhiben la actividad del canal, disminuyen la unión específica de la [H^3]-ryanodina (Chu *et al.* 1990). El análisis de Scatchard (Weiland y Molinoff 1981; McGonigle y Molinoff 1994) permite estimar la constante de disociación (K_d) o afinidad de la [H^3]-ryanodina y la unión máxima (B_{max}), que corresponde al número de sitios presente en una preparación de retículo sarcoplásmico pesado que es la fracción enriquecida con el RyR1 (Fig. 4b).

La unión de alta afinidad sólo se lleva a cabo cuando las cuatro subunidades idénticas están asociadas formando un homotetrámero (Lai *et al.* 1989). Por lo que se piensa que cada homotetrámero presenta un sitio de unión de alta afinidad, el cual se forma con la aportación de un segmento pde cada una de las cuatro subunidades que constituyen al RyR1.

Aún cuando las subunidades del RyR1 estén disociadas, es posible observar la unión de [H^3]-ryanodina de baja afinidad, ésto ha permitido proponer que cada homotetrámero cuenta con tres sitios que unen al alcaloide y que promueven el estado cerrado del canal (Lai *et al.* 1989). Aunque todavía se discute si la ocupación de estos tres sitios de baja afinidad ocurre en forma equivalente (la ocupación de los tres sitios induce el cierre del canal) o en forma secuencial (la ocupación sucesiva va disminuyendo la afinidad de los sitios restantes y promoviendo el cierre paulatino del canal) (Sutko *et al.* 1997), se ha observado que la unión de ryanodina a dichos sitios disminuye la velocidad de disociación del alcaloide unido al sitio de alta afinidad (Lai *et al.* 1989; Buck *et al.* 1992), como si la molécula quedara atrapada físicamente en ese sitio.

**a**

Ryanodina
P.M. 493.5



$$B = B_{\max} L / (L + K_d)$$

$$B/L = (-1/K_d) B + (B_{\max}/K_d)$$

$$y = m x + b$$

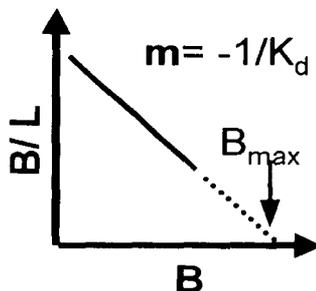


Fig. 4. Unión específica de $[H^3]$ -ryanodina. a) Estructura de la ryanodina. Los números indican las posiciones de los átomos en la molécula y los asteriscos indican los hidrógenos que se sustituyen por tritio. b) Los ensayos de unión específica de alta afinidad con $[H^3]$ -ryanodina se emplean como una prueba del estado funcional del canal y a través del análisis de Scatchard (ecuaciones lineales) se puede estimar la constante de disociación (K_d) y la unión máxima (B_{\max}). La primera indica la afinidad con que el alcaloide se une al receptor y la segunda indica el número de receptores presente en la preparación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La degradación triptica del RyR1 (en donde se libera la porción carboxilo-terminal del receptor de 76 KDa) (Callaway *et al.* 1994) y el marcado de alta afinidad con un derivado fotoactivable de la ryanodina (el 10-O-[3-(4-azidobenzamido) propionil] ryanodina, en su forma tritiada) (Witcher *et al.* 1994), han revelado que el sitio de alta afinidad de ryanodina y la región formadora del poro iónico se ubica en la porción carboxy-terminal de la proteína, después de la Arg⁴⁴⁷⁵ cerca de o en la región transmembranal.

La síntesis de la ryanodina también ha dado lugar a una serie importante de derivados, conocidos como ryanoides, con los que se ha obtenido información particularmente respecto a la interacción de la ryanodina con el sitio activador (de alta afinidad) en el RyR (Sutko *et al.* 1997). A través de los estudios de estructura actividad que se han realizado (Sutko *et al.* 1997; Welch 1998), se sabe que el principal determinante en la unión de la ryanodina es el "locus" del anillo pirrólico; de hecho, la máxima unión se logra gracias a las fuertes interacciones que el carbonilo unido a dicho pirrol sostiene con el sitio de unión. El locus pirrólico se encaja específicamente en otro subsitio, de tal manera que las posiciones 9 y 10 quedan hacia fuera del sitio de unión para formar libremente otras interacciones que modulen la actividad y la conductancia del canal. Hasta el momento, se ha determinado que la modificación de la región que circunda la posición 3 de la ryanodina es la que determina principalmente la afinidad de la unión de la molécula, mientras que el extremo opuesto (posiciones 9 y 10), controla el comportamiento del canal. El sistema de anillos fusionados, provee el bulto necesario para rellenar el sitio de unión y formar tanto interacciones hidrofóbicas, como contactos de tipo polar con la proteína (Fig. 4a).

La modulación del RyR1 por otras proteínas.

Como en muchos otros ejemplos, la fisiología del RyR1 es modulada por la interacción con otras proteínas y otros agentes igualmente de interés fisiológico o incluso farmacológico. La lista de agentes es considerable y ha sido revisada ampliamente (Fleischer e Inui 1989; Meissner 1994; Franzini-Armstrong y Protasi 1997; Zucchi y Ronca-Testoni 1997; Sutko *et al.* 1997; Mackrill 1999); por ello, a continuación sólo se presenta una breve descripción de los efectos de algunos de los moduladores más estudiados o que presentan un papel más relevante en la fisiología del RyR1.

Además del DHPR, cuya interacción con el RyR1 ya ha sido descrita, otra proteína importante que modula este canal de calcio es la inmunofilina FKBP12 que une a inmunosupresores como el FK506 o la rampamicina. Tiene una masa de 12 KDa por eso sus siglas en inglés FKBP12 (FK Binding Protein 12). Esta proteína se ubica sobre todo en el plasma y cataliza la isomerización peptidilpropil-*cis-trans*, que aparentemente interviene en la conformación de las proteínas (Mackrill 1999).

La FKBP12 se une específicamente al RyR1 con una estequiometría de 1:4, es decir, una FKBP12 por monómero de receptor. Aunque el RyR1 puede interactuar con otra isoforma de la inmunofilina, la FKBP12.6, el RyR2 sólo reconoce a esta última isoforma (Timerman *et al.* 1996).

Ya se ha comentado también que los sitios de unión de la FKBP12 se ubican a unos 12 nm de la entrada del poro iónico (Wagenknecht *et al.* 1997). La ausencia de las cuatro inmunofilinas genera tres estados de subconductancia que representan el 25, 50 y 75 % del máximo de conductancia (400 pS) del RyR1; es decir, que las cuatro FKBP12 estabilizan la conformación del RyR1, favoreciendo la apertura del canal a su máxima conductancia; dicha conformación es la que se requiere para la activación mecánica del RyR1 durante el acoplamiento de excitación-contracción (Brillantes *et al.* 1994; Ahern *et al.* 1997). Asimismo, la FKBP12 interviene en el acoplamiento entre los RyR's musculares (Marx *et al.* 1998), siendo éste, aparentemente, el mecanismo para propagar la señal de liberación de calcio a otros receptores (incluyendo los RyR3) que no están físicamente acoplados al los DHPR's.

La ausencia de la FKBP12 incrementa unas 10 veces la activación del RyR1 por calcio y disminuye también en unas 10 veces su inhibición por ese mismo catión (Ahern *et al.* 1997). Igualmente, dicha ausencia incrementa la sensibilidad del receptor por la cafeína (Timerman *et al.* 1993; Ahern *et al.* 1994). Lo anterior no sólo indica que esta inmunofilina modula la acción de otros efectores del RyR1, sino que también regula el estado cerrado de este canal de calcio.

Aparentemente, la interacción entre el RyR1 y el DHPR es mediada por otra glucoproteína de 95 KDa que se ubica en la membrana del retículo sarcoplásmico, llamada triadina, cuyo extremo N-terminal se une al dominio citoplásmico del RyR1 mediante puentes disulfuro con una estequiometría de 1:1. Aunque la asociación de la triadina con el RyR1 y con el DHPR ha sido demostrada por experimentos de inmunomarcado, de "ligand-overlay" y de entrecruzamiento (Caswell *et al.* 1991; Knudson *et al.* 1993; 1993a); ninguna otra proteína derivada de la triadina es capaz de unirse al DHPR, por lo que la idea sobre la mediación de la triadina en el acoplamiento de excitación-contracción aún no está definida por completo (Mackrill 1999).

La triadina también es capaz de anclar a otra proteína ácida que se ubica en el lumen de las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico conocida como calsecuestrina (Jorgensen *et al.* 1983). Esta proteína además de tener una alta capacidad para unir calcio (40 mol de calcio por mol de proteína), también se une directamente al RyR1 por su dominio luminal incrementando la probabilidad de apertura del canal (Kawasaki y Kasai 1994). Dicha unión también puede ocurrir mediante intermediarios como la triadina, (a través de su extremo C-terminal y en forma calcio-dependiente), la juntina (de 26 KDa) u otra proteína aún no bien identificada de 30 KDa (Burns y Michalak 1993). Se ha visto que la activación del RyR1 provoca la liberación del calcio unido a la calsecuestrina (Ikemoto *et al.*

1989), lo cual provoca un incremento transitorio del calcio intraluminal debido a la disociación del calcio unido a la calsecuestrina. Posteriormente la liberación ocurre la disminución del calcio en el lumen del retículo sarcoplásmico este aumento desaparece cuando se extrae la calsecuestrina del lumen del retículo sarcoplásmico, por lo que se ha sugerido un acoplamiento recíproco entre el RyR1 y la calsecuestrina (Ikemoto *et al.* 1991; Gilchrist *et al.* 1992).

Otra proteína moduladora de la fisiología del RyR1 es la calmodulina, que también une calcio, es ubicua y tiene un peso molecular de 17 KDa. La concentración intracelular de la calmodulina es de 2 μM , a la cual se disminuye la probabilidad de apertura del RyR1 (Zucchi y Ronca-Testoni 1997). La calmodulina, además, disminuye la unión específica de [^3H]-ryanodina ($\text{IC}_{50} = 0.1 \mu\text{M}$) (Fuentes *et al.* 1994). Recientemente, se ha observado un efecto bifásico de esta proteína sobre el RyR1 (Trypathy *et al.* 1995), inhibiendo al canal en presencia de concentraciones de calcio que oscilan entre el intervalo micromolar al milimolar. A concentraciones submicromolares de calcio ($< 0.1 \mu\text{M}$) la calmodulina incrementa la unión específica de [^3H]-ryanodina ($\text{EC}_{50} = 28 \text{ nM}$), estimula la liberación de calcio e incrementa la probabilidad de apertura del RyR1.

Se han identificado de 3-6 sitios de unión por monómero a la calmodulina en el RyR1, que interactúan con los sitios de calcio (Menegazzi *et al.* 1994; Trypathy *et al.* 1995). La unión de calmodulina al RyR1 es calcio-dependiente: a una concentración de calcio $< 0.1 \mu\text{M}$, se unen 4 moléculas de calmodulina a cada monómero del RyR1, mientras que a concentraciones micromolares se une sólo una molécula de calmodulina por monómero (Trypathy *et al.* 1995). La unión de la calmodulina alcanza sus valores máximos a un pH de entre 6.5-7.2 y una fuerza iónica de 0.1-0.25 M. Además el magnesio disminuye el número de los sitios de alta afinidad a esa proteína en el RyR1 (Yang *et al.* 1994).

Además de las anteriores, existen otras proteínas y péptidos que también se asocian al RyR1 y modulan su actividad:

1) *Anexina-IV*. Las anexinas son una familia de lipoproteínas cuya actividad dependen de calcio. Aunque su fisiología no está bien definida, es probable que intervengan en la secreción o que actúen como canales de membrana plasmática. La anexina-VI (de 76 KDa) activa al RyR1 a concentraciones nanomolares incrementando el tiempo medio y la probabilidad de apertura del canal dependiendo de la concentración de calcio (Díaz-Muñoz *et al.* 1990).

2) *Sorcina*. Esta proteína de 22 KDa une calcio y está presente en células resistentes a diferentes drogas. Aunque en principio se le asocia al RyR2. Se ha visto que se une a través de su extremo C-terminal con la subunidad $\alpha 1$ del DHPR, por lo que posiblemente intervenga en el acoplamiento de excitación-contracción (Meyers *et al.* 1998).

3) *S100s*. Los miembros de esta familia de proteínas citoplásmicas (de 10-12 KDa) también unen calcio y forman homo y heterodímeros. A concentraciones

submicromolares de calcio en el citoplasma, concentraciones nanomolares de la S100A1 incrementan el tiempo medio de apertura del RyR1. Cuando la concentración de calcio aumenta a niveles micromolares, la activación desaparece (Fano *et al.* 1989; Schafer y Heizmann 1996). Aparentemente, la S100A1 se une en sitios que se enciman con los de calmodulina (Treves *et al.* 1997). Además la S100A1 también interactúa con otras proteínas accesorias del RyR1, como la triadina, la sorcina, las anexinas, la aldolasa y lagliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (estas dos últimas, posibles accesorias del receptor) y otras, no bien identificadas, presentes en las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico de ~100 KDa y ~60 KDa (Treves *et al.* 1997).

4) *Proteasas*. Los experimentos con proteasas han revelado algunos efectos en la actividad del RyR1 e incluso se han utilizado como herramientas para caracterizar estructuralmente la fisiología del receptor (Zarka y Shoshan-Barmatz 1993; Callaway *et al.* 1994). Por ejemplo, la incubación del RyR1 con tripsina presenta un efecto bifásico: primero induce la activación del canal, por lo que su probabilidad de apertura se incrementa, posteriormente la actividad del canal se pierde (Zucchi y Ronca Testoni 1997). Además la unión de alta afinidad de ryanodina se pierde, pero la de baja afinidad crece después de la incubación prolongada con la tripsina (Chu *et al.* 1988; Shoshan-Barmatz y Zarka 1988; Trimm *et al.* 1988; Meissner *et al.* 1989). La calpaína-I divide al RyR1 en dos fragmentos de ~150 y ~375 KDa, los cuales se mantienen asociados, pero la ruptura del RyR1 estimula la liberación de calcio sin modificar la unión de ryanodina (Shoshan-Barmatz *et al.* 1994). La calpaína-II presenta efectos similares, pero genera dos fragmentos de ~150 y de ~315 Kda; además bloquea la inactivación del canal y su efecto proteolítico es inhibido por la calmodulina, sugiriendo la posible interacción de ambos sitios de reconocimiento (Rardon *et al.* 1990).

5) *Ankirinas*. Se han detectado algunos subtipos de esta familia de proteínas del citoesqueleto como proteínas integrales de membrana del retículo sarcoplásmico, en una ubicación adecuada para una posible interacción con el RyR1 (Zhou *et al.* 1997). Nada se ha definido aún; sin embargo, en células del linfoma las ankirinas aumentan la unión específica del la [³H]-ryanodina y bloquean el efecto inhibitor de la ryanodina en la liberación de calcio (Bourguignon *et al.* 1995).

Así como las ankirinas, se han encontrado otras proteínas en las células del músculo esquelético con un posible papel en la regulación de la actividad del RyR1. Por ejemplo, una proteína de 90 KDa, que es integral de membrana y su ubicación es exclusiva de las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico; también comparte algunas características de la calnexina (una chaperona) y es diferente a la triadina (Guo *et al.* 1994). Otro ejemplo es la proteína similar a la integrina, de 167 KDa, que se ha detectado también en el músculo cardíaco y que es bioquímica e inmunológicamente diferente a las integrinas, posee un extremo N-terminal único y se ha detectado en el lumen de las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico (Presotto *et al.* 1997).

6) *Péptidos (Toxinas)*. Algunos venenos o toxinas de origen animal también modulan la actividad del RyR1, como la miotoxina-a que activa al receptor e incrementa la permeabilidad de la membrana del retículo sarcoplásmico (Yudkowsky *et al.* 1994 Furukawa *et al.* 1994), la helothermina (de 25.5 KDa) que bloquea al RyR1 y al RyR2 (Morrisette *et al.* 1995), la ryanotoxina (extraída del veneno del escorpión), cuyos efectos recuerdan a los de la ryanodina, es decir que incrementa la liberación de calcio e induce largos estados de subconductancia, también estimula la unión de [³H]-ryanodina dependiendo de su concentración, por lo que es posible que el péptido interactúe con los sitios de ryanodina (Morrisette *et al.* 1994). La iperatoxina-A (también aislada del veneno del escorpión), activa específicamente al RyR1, sin permeabilizar la membrana del retículo sarcoplásmico (El-Hayek *et al.* 1995).

La modulación del RyR1 por modificaciones covalentes: Fosforilación y estado redox.

Como muchas otras proteínas, el RyR1 también es modulado por modificaciones covalentes como la fosforilación. Aunque las tres isoformas de este receptor pueden estar sujetas a esta modificación, existen diferencias; así por ejemplo, el RyR2 es fosforilado en la Ser²⁸⁰⁹ (Witcher *et al.* 1991); mientras que el RyR1 es fosforilado en la Ser²⁸⁴³ (Suko *et al.* 1993).

La activación del RyR1 puede ocurrir mediante la acción de proteína-quinasas, la reversión de dicha activación puede ocurrir mediante proteína-fosfatasas (Mackrill 1999). Así mismo, se ha observado una correlación directa entre el incremento de la fosforilación a través del tiempo con la reducción en el llenado de calcio del retículo sarcoplásmico. Esta reducción en el llenado de calcio puede revertirse mediante el tratamiento con la proteína fosfatasa 1 (Mayrleitner *et al.* 1995).

La fosforilación del RyR1 mediante proteínas cinasas asociadas a membrana (PKA, PKC, PKG) o la proteína cinasa exógena dependiente de calmodulina tipo II (CaMKII), le produce insensibilidad para ser bloqueado por Mg²⁺ (1 mM). Dicha insensibilidad se puede revertir por la acción defosforilante de las proteínas fosfatasas 1 y 2A (PPT1 y PP2A, respectivamente) (Hermann-Frank y Varsanyi 1993; Hain *et al.* 1994).

La incorporación del RyR1 en bicapas lipídicas planas ha mostrado que antes del tratamiento con proteína-quinasas o fosfatasas, el 60% del canal está defosforilado o inactivo y un 40% se encuentra fosforilado o activo; es decir, que nativamente el RyR1 presenta un grado de fosforilación, y sólo el canal fosforilado es activo en condiciones fisiológicas. Además, estos mismos estudios han señalado que tanto la PKA como la CaMKII, presentan diferencias en sus efectos activadores. Incluso la endCaMKI (endógena) presenta un efecto opuesto al de la CaMKII (exógena), ya que inhibe la actividad del canal al bloquearlo en el estado cerrado. Por todo lo anterior, se ha propuesto que la fosforilación del RyR1 puede ocurrir en más de un sitio y que dependiendo de

éste, se observarán diferentes consecuencias funcionales sobre el RyR1 (Hain *et al.* 1994).

La fosforilación/defosforilación de otras proteínas también modula la actividad del RyR1 indirectamente. Así por ejemplo: las proteínas de 160/150-KDa disminuyen unas 100 veces la afinidad del receptor por el calcio (Orr y Shoshan-Barmatz 1996); la fosforilación de la Ser⁶⁸⁷ del DHPR le impide activar al RyR1 en la excitación-contracción (Lu y Meissner 1995) y sólo la calsecuestrina, que regula la concentración de calcio en el retículo sarcoplásmico, al ser defosforilada incrementa cooperativamente la probabilidad y el tiempo medio de apertura de ese canal de calcio (Szegedi *et al.* 1999). El hecho de que la calsecuestrina, se mantenga unida al RyR1 independientemente de su estado de fosforilación (92/102 nM, fosforilada/defosforilada, respectivamente), revela que el ciclo de fosforilación y defosforilación de esa proteína puede jugar un papel esencial en el mantenimiento de la dinámica de calcio intracelular en los miocitos (Herzog *et al.* 2000).

El estado de óxido/reducción (redox) de la célula es un factor que modifica la actividad de diferentes proteínas, incluyendo algunos canales iónicos como el RyR1 (y también el RyR2), el cual posee 404 cisteínas por homotetrámero en el estado reducido (o de tiol libre: -SH). Estos sulfhidrilos hiperreactivos poseen un potencial redox definido que le permite al RyR1 modificar la actividad del canal como respuesta a cambios en el estado redox de la célula, incluso en presencia de diferentes moduladores como el calcio, cuya activación disminuye el potencial redox que facilita la oxidación de los grupos tiol de este receptor e induce, consecuentemente, la apertura del canal. Ésto sugiere que, en el RyR1, los sitios activadores de calcio podrían estar acoplados con el sensor redox. En contraste, inhibidores como el magnesio aumentan el potencial redox que favorece la reducción de los puentes disulfuro que genera, a su vez, el cierre del canal (Ruohong *et al.* 2000). Se ha detectado, también, que algunos de estos sulfhidrilos (aminoácidos 33028-33034) constituyen un sensor transmembranal sensible a los cambios locales en el potencial redox generado por el glutatión en la membrana (Wei *et al.* 2000).

El contenido de sulfhidrilos libres por subunidad en condiciones nativas es de alrededor de 48. La oxidación, en presencia de una presión de oxígeno de 150 mm Hg, 3-morfolinosydnnonimina (0.2 mM) (SIN-1) y glutatión (5 mM); de 10 tioles/subunidad, no produce efecto sobre la actividad del RyR1, observándose una gran capacidad del receptor para contrarrestar la acción de agentes oxidantes como las especies reactivas de oxígeno, como el O₂ ó el peroxinitrito, mismos que se proponen como los productos probables en la oxidación de los tioles libres del RyR1. La oxidación de dichos tioles con SIN-1 puede dar lugar a la formación reversible de puentes disulfuro o ácido sulfenico (SOH), o a la formación irreversible de ácido sulfónico (SO₃H). Se ha descartado la posibilidad de que en la oxidación de los tioles libres del RyR1, el SIN-1 produzca óxido nítrico como agente oxidante (Eu *et al.* 2000) o que active al receptor por S-nitrosilación.

De acuerdo con lo anterior, una oxidación moderada disminuye el número de tioles libres/subunidad a ~23, lo cual aumenta la actividad del canal. Esta activación puede revertirse si el número de tioles libre se vuelve a incrementar a ~48. Ahora bien, si la oxidación es mayor, dejando sólo 13 tioles libres/subunidad, entonces se promueve la inhibición irreversible del RyR1. De esta manera las diferentes clases de tioles en el RyR1 sugieren que: 1) el canal puede estar protegido de la oxidación a través de varios de sus sulfhidrilos funcionalmente inertes, 2) el canal podría estar diseñado para responder a un estrés oxidativo moderado a través de cambios en su actividad basal (por ejemplo, su sensibilidad al calcio) y 3) el canal es susceptible a daños por condiciones oxidativas más extremas (Sun *et al.* 2001).

Además del potencial redox que genera la proporción reducida (GSH) u oxidada (GSSG) del glutatión (Zable *et al.* 1997), otras especies redox modifican la actividad del RyR1, como el H_2O_2 , por ejemplo, que a concentraciones submilimolares activa al canal y a concentraciones milimolares lo inhibe (Favero *et al.* 1995). La tensión de O_2 (10 mm Hg en el músculo) que, por sí sola, reduce u oxida unos 6-8 tioles/subunidad, modifica la respuesta del RyR1 a concentraciones nanomolares del óxido nítrico (Eu *et al.* 2000). Este modulador metabólico universal presenta un efecto bifásico (activación/inhibición) sobre el RyR1 que depende de la concentración y del tipo de donador de óxido nítrico que se utilice, del potencial de membrana y de la presencia de agonistas (Meszaros *et al.* 1996; Stoyanovsky *et al.* 1997; Hart *et al.* 2000; Suko *et al.* 1999). El efecto del óxido nítrico se ejerce a través de oxidar ó S-nitrosilar (1-50 tioles) las tres clases diferentes de sulfhidrilos en el receptor. Aparentemente, las concentraciones (~100 a 500 μM dependiendo el donador) de donadores de óxido nítrico que no afectan la actividad del RyR1, bloquean el entrecruzamiento de las subunidades del receptor mediante la formación (por oxidación) de puentes disulfuro que cambian la conformación del receptor y bloquean el canal. En contraste, concentraciones mayores de donadores de óxido nítrico, oxidan a otros tioles, con lo cual se estimula la actividad del RyR1 (Aghdasi *et al.* 1997).

Se ha encontrado que la actividad del canal aumenta al S-nitrosilar un tiol por subunidad. Este efecto del óxido nítrico parece ocurrir a través de la intervención de la Cys³⁶³⁵ que se encuentra cercana al sitio de unión de la calmodulina en el RyR1, de la cual depende el efecto promovido por el óxido nítrico (Porter *et al.* 1999; Sun *et al.* 2001a).

La modulación del RyR1 por diferentes efectores.

Además del calcio, existen otros iones que modulan la actividad del RyR1, como el Mg^{2+} , por ejemplo, que inhibe al canal a través de dos mecanismos independientes: 1) al competir con el calcio por los sitios activadores de alta afinidad y 2) al unirse a los sitios inhibidores de baja afinidad de calcio que resultan incapaces para discriminar entre ambos cationes (Laver *et al.* 1997).

Otros cationes como el Zn^{2+} presentan un efecto bifásico de activación e inhibición, que depende de la concentración y que puede, a su vez, modificar los efectos ejercidos por otros efectores (Xia *et al.* 2000). Asimismo, los experimentos de unión específica con [3H]-ryanodina y de liberación de calcio han evidenciado que la apertura del canal y la unión de ryanodina están relacionadas con la ocupación de sitios de unión específicos para cationes y aniones monovalentes (Na^+ , Li^+ , K^+ , Cs^+ , Cl^- , NO_3^- , ClO_4^- , etc.), lo cual argumenta a favor de la relación entre el estado funcional del canal y la unión de la ryanodina (Hasselbach y Migala 1998).

El aumento del pH en el lumen del retículo sarcoplásmico entre el intervalo 5-5.5, inhibe la actividad del RyR1. Si el pH se mantiene entre 6.0 y 7.5, la actividad no se ve afectada, pero si el pH se incrementa nuevamente entre 7.5-9, se logra la recuperación completa de la actividad del canal. En general, se ha observado que la variación del pH intracelular (luminal y citoplásmico) no es lo suficientemente grande en una fibra funcional como para producir algún cambio irreversible en la actividad del RyR1 (Laver *et al.* 2000).

En el estudio de la actividad del RyR1 también se han empleado agentes farmacológicos que han permitido caracterizar las propiedades del receptor. Dos ejemplos clásicos son:

1) El rojo de rutenio, que favorece el estado cerrado del canal (actuando por el lado citoplásmico), disminuye la corriente del canal (actuando por el lado luminal) y reduce la afinidad del RyR1 por la ryanodina. Aparentemente, los sitios de reconocimiento a este colorante policatiónico se colocalizan con los de calmodulina entre los aminoácidos 1861-2094 y 3657-3776 (Zucchi y Ronca-Testoni 1997; Chen y MacLennan 1994).

2) El dantroleno, derivado de la hydantoina, que actúa como un relajante muscular postsináptico, el cual también disminuye (unas tres veces) la afinidad del RyR1 (pero no del RyR2) o del RyR3 por la ryanodina. Esta inhibición es capaz, incluso, de revertir el incremento propiciado por la mutación Arg615Cys, que conlleva -entre otras mutaciones- al padecimiento denominado como hipertermia maligna (Zhao *et al.* 2001), que consiste en una hipersensibilidad a la acción de los anestésicos (Mickelson y Louis 1996).

La modulación del RyR1 por nucleótidos de adenina y alquilxantinas

Los ejemplos enumerados hasta aquí demuestran que la complejidad de la actividad del RyR1, no sólo radica en su propia naturaleza, sino además en las múltiples posibilidades para interactuar con una gran variedad de efectores; la lista es extensa y por ello, tal como se ha mencionado anteriormente, sólo se han considerado los ejemplos más significativos o conocidos. Sin embargo, aún resta discutir con amplitud uno de los conjuntos de moduladores que han tenido verdadera repercusión en el entendimiento general de la actividad del RyR1: las

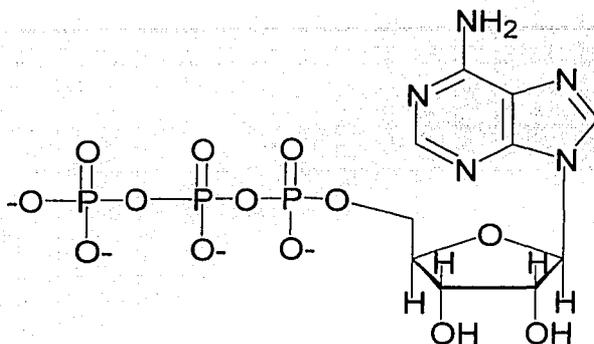
purinas. De éstas podemos distinguir, de acuerdo con los efectos que ejercen sobre el receptor, dos grupos: los nucleótidos de adenina (ATP, ADP, AMP, etc.), cuya relevancia en la fisiología celular es ampliamente conocida, y otras de interés meramente farmacológico como las alquilxantinas (cafeína, teofilina, teobromina, etc.).

A concentraciones milimolares, los nucleótidos de adenina activan al RyR1, inducen la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico cooperativamente y aumentan la probabilidad y el tiempo de apertura del canal, pero sin afectar su conductancia. Sin embargo, la activación del RyR1 por el ATP (Fig. 5), por ejemplo, depende de calcio. De hecho, la completa activación del RyR1 (con una probabilidad de apertura cercana a uno) ocurre a una concentración de calcio de ~100 μM (Meissner 1984; Rousseau *et al.*, 1988; Meissner, 1994; Zucchi y Ronca-Testoni, 1997). Asimismo, el ATP (Pessah *et al.*, 1987), puede regular los sitios de calcio al eliminar la inhibición provocada por el Mg^{2+} cuando compete con el Ca^{2+} por los sitios de activación. Esta idea se ha extendido incluso hasta los sitios inhibidores de calcio, los cuales –según se ha propuesto– regulan la activación del RyR1 durante la E-C. Aparentemente, se requiere de ATP milimolar para facilitar la liberación de calcio que inducen los DHPR's; los cuales también contribuyen a eliminar la inhibición que ejerce el Mg^{2+} (1 mM) sobre el RyR1 disminuyendo la afinidad de los sitios inhibidores de calcio por el Mg^{2+} (Pessah *et al.* 1987; Lamb. 2000; Jona *et al.* 2001; Laver *et al.* 2001).

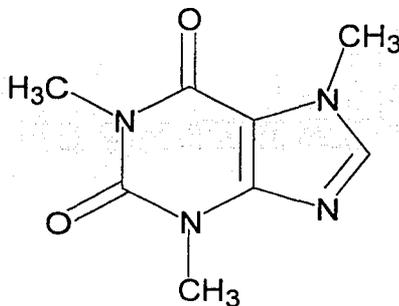
La activación de los nucleótidos de adenina también se manifiesta como un aumento de la unión específica de la $[\text{H}^3]$ -ryanodina. Particularmente, este efecto se refleja en un aumento en la asociación de la $[\text{H}^3]$ -ryanodina al receptor, generándose finalmente un aumento de unas cinco veces de la afinidad (disminución de la Kd) del RyR1 por ese alcaloide (Pessah *et al.*, 1987; Chu *et al.*, 1990).

El aumento de la afinidad del RyR1 por la ryanodina indica que el sitio de alta afinidad es afectado alostéricamente por el o los sitios de unión de ATP en la proteína, lo cual sugiere, a la vez, cambios en la conformación del receptor a larga distancia (Pessah *et al.*, 1987). Estos cambios se han verificado a través de la criomicroscopía electrónica (a 3 nm de resolución) del RyR1. La reconstrucción de imágenes del RyR1 activado por la acción de una concentración de 100 μM de AMP-PCP (un análogo no hidrolizable del ATP) muestra movimientos, parecidos a la apertura y al cierre del diafragma de una cámara, tanto del dominio transmembranal (que correspondería al tallo del hongo al que se asemeja la estructura global del RyR1), como de las regiones que forman "las abrazaderas o los ganchos" del dominio citoplásmico (Serysheva *et al.* 1999).

Hasta el momento, la inspección de la estructura primaria de RyR1 ha sugerido la presencia de al menos 36 motivos por homotetrámero (9/monómero), ubicados en diferentes lugares (aminoácido: 2-7, 699-704, 701-706, 1195-1200, 2264-2269, 2370-2375, 4449-4454, 4452-4457 y 4602-4607) del RyR1, los cuales



ATP



CAFEÍNA

Fig. 5. Estructuras del Trifosfato de adenosina (ATP) y la 1,3,7-Trimetilxantina (Cafeína), derivados de purina que se han utilizado ampliamente para caracterizar la actividad del canal del RyR1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

presentan la siguiente secuencia de aminoácidos: Gly X Gly X X Gly (Takehima *et al.* 1989; Du *et al.* 2001). También se han identificado otros posibles motivos o parte de ellos en la secuencia del RyR1, incluso algunos presentes en otras proteínas que unen ATP como las chaperoninas GroES (Du *et al.* 2001).

El motivo de glicinas también está presente en otras proteínas que unen ATP como la proteína cinasa dependiente de cAMP. La estructura tridimensional de la subunidad catalítica de esta cinasa, revela que el segmento rico en glicina forma un hoyo aniónico donde se une el ATP. Este segmento une a dos tiras antiparalelas que forman una hoja β -plegada, y sirve como elemento de anclaje para los fosfatos del ATP, en particular del fosfato γ que es transferido en la fosforilación catalizada por esta enzima (Schulz 1993).

A diferencia de otros motivos que unen ATP, la base purínica, es decir la adenina, queda enterrada en la hoja β -plegada, en lugar de quedar en la superficie. Además, en esta proteína cinasa no se cuenta con la Lys, adyacente al motivo de glicinas, que interviene en la transferencia del grupo fosfato. Dicha Lys se ubica en la posición 72 después del motivo, justo en la siguiente (tercera) hoja β -plegada que forma parte del andamio completo de la estructura (Knighton *et al.* 1991).

Los pocos resultados de mutación dirigida que se tienen han mostrado que ni los posibles sitios encontrados también en las chaperoninas y que se repiten en el RyR1, ni el sitio de glicinas comprendido entre los aminoácidos 2370-2375 –que es el único de este tipo estudiado hasta el momento– han mostrado ser sitios de unión para ATP, ya que las mutantes observan una sensibilidad similar a la del *wt*-RyR1 frente al AMP-PCP (Du *et al.* 2001). Esto sin embargo, aún debe ser tomado con reserva, ya que, probablemente, la sustitución de una Gly por una Ala no altere la estructura del motivo de manera que se puedan ver cambios notables (Schulz y Schirmer 1979), por ejemplo en la sensibilidad frente al AMP-PCP.

Otros estudios, utilizando un derivado fotoactivable del ATP (el 3'-O-(4-benzoil)benzoil-adenosina-5'-trifosfato ó dibenzoATP (Bz_2 ATP), han mostrado que el fotomarcado del RyR1 con el $[\alpha^{32}\text{-P}] Bz_2$ ATP presenta una relación molar de 1.146 ± 0.087 , es decir que por cada mol de homotetrámero se une un mol de Bz_2 ATP (Zarka y Shoshan-Barmatz 1993).

Al utilizar este mismo fotomarcador para marcar los fragmentos finales de degradación triptica del RyR1, se puede ver que el o los sitios marcados se ubican en dos fragmentos de 27 y 13 kDa. Aunque la estequiometría de unión entre el RyR1 y el Bz_2 ATP sea de 1:1, esto no descarta la posibilidad de que el homotetrámero cuente con más de un sitio de unión para el ATP con cooperatividad negativa, por lo que, probablemente, se requiera una mayor concentración de Bz_2 ATP para marcar los otros sitios. De hecho, los ensayos de unión específica con $[\text{H}^3]$ -ryanodina a diferentes concentraciones de Bz_2 ATP, han

indicado la presencia de sitios de unión para ATP con diferente afinidad en el RyR1 (Zarka y Shoshan-Barmatz 1993).

La acción que el ATP ejerce sobre el RyR1, necesariamente debe ser comprendida en términos de los otros dos productos de su hidrólisis: el ADP y el AMP. La combinación de los nucleótidos genera un parámetro metabólico conocido como carga energética, cuyos valores resisten fuertemente a los cambios en el medio intracelular. Los resultados obtenidos mediante ensayos de unión específica con $[H^3]$ -ryanodina, han mostrado que además de la molécula individual de ATP, la acción conjunta de los tres nucleótidos también es relevante en la modulación del RyR1. Se ha sugerido fuertemente que, mediante sus diferentes sitios de unión para ATP, el RyR1 es capaz de percibir selectivamente la presencia de nucleótidos con uno, dos o tres fosfatos (Butanda-Ochoa y Díaz-Muñoz 1998). Experimentos realizados con un derivado en donde dos adenosinas están ligadas por seis fosfatos; han señalado que es probable que cada una de las adenosinas se una en sitios diferentes, activando al RyR1 y manteniéndolo en el estado abierto a través un puente intermolecular formado por el puente o cinturón de fosfatos (Morii y Makinose 1992). Si este puente es menor el efecto se vuelve menos eficaz; además, aparentemente, el anillo de ribosa es importante en la unión y en la activación promovida por las adenosinas unidas a las subunidades del RyR1, ya que su oxidación aumenta la eficacia de la activación aun cuando las dos desoxiadenosinas sólo estén conectadas entre sí por un cinturón de cuatro fosfatos (Holden *et al.* 1996).

La modulación del ATP también se encuentra regulada por el nivel de fosforilación del RyR1, que altera el nivel de incremento en la actividad del RyR1 promovida por el ATP. Dicha regulación debe registrarse de manera alostérica, ya que de los sitios de unión al ATP en el RyR1, sólo dos (ubicados entre los aminoácidos 2370-2375 y 4452-4457) poseen la Lys en la posición 72 -después de la última Gly-, la cual se requiere para la transferencia del grupo fosfato en la fosforilación promovida por las protein-cinasas. Existe un tercer sitio de glicinas (4602-4607) en el RyR1 que presenta dicha Lys, pero en la posición 73.

Se ha observado, sin embargo, que el sitio de glicinas localizado entre los aminoácidos 2370-2375 no interviene en el reconocimiento de ATP. De esta manera, las evidencias indican que la fosforilación no se verifica en esos sitios, sino en otros como la Ser²⁸⁴³ (Suko *et al.* 1993). De hecho, el efecto promovido por el fosfato inorgánico (Pi) es diferente (incrementa la probabilidad de apertura a través de disminuir el tiempo medio del estado cerrado sin afectar el tiempo medio del estado abierto) al del ATP (que incrementa el tiempo medio del estado abierto y disminuye el tiempo medio del estado cerrado), por lo que deben ocupar sitios de unión distintos (Balog *et al.* 2000).

Otras purinas que ejercen influencia sobre la actividad del RyR1, son las alquilxantinas, en particular la cafeína (Fig. 5). Esta trimetilxantina ha sido utilizada ampliamente para caracterizar funcionalmente al RyR1. El principal efecto que la cafeína (0.5-2 mM) promueve sobre este receptor es el de incrementar su

sensibilidad para ser activado por el calcio. Dicha activación puede observarse, por ejemplo al incorporar al RyR1 en bicapas lipídicas planas. Lo que se observa es un incremento en la probabilidad de apertura del canal, esto a su vez se traduce como: una reducción del tiempo del estado cerrado o un aumento de la frecuencia de los eventos de apertura. A concentraciones altas (>5-10 mM) la cafeína induce, además, un incremento en el tiempo del estado abierto (Zucchi y Ronca-Testoni 1997).

Otra forma en que la cafeína induce la activación del RyR1 es a través de aumentar su afinidad por el calcio en ensayos de unión específica con [H^3]-ryanodina (Pessah *et al.* 1987; Rousseau *et al.* 1988). En este caso, la presencia de cafeína promueve la unión del alcaloide desde concentraciones sumamente pequeñas (nanomolares) de calcio. Además, la unión máxima de [H^3]-ryanodina aumenta ligeramente en comparación con el experimento control, pero menos en comparación con el aumento que promueve el ATP ó el AMP-PCP (Pessah *et al.*, 1987).

No se han propuesto sitios consenso para la cafeína en el RyR1; sin embargo, se sabe que es muy probable que el o los sitios de unión para la cafeína estén ubicados en el dominio citoplásmico en el RyR1, ya que no se ha observado efecto alguno en el canal truncado formado por los dominios transmembranal y luminal del receptor. No obstante, esto no descarta la posibilidad de que el sitio de unión esté formado por el ensamble de la porción amino-terminal (citoplásmica) y la porción carboxi-terminal; o bien que la estructura del sitio de unión se vea alterada en ausencia del extremo amino-terminal del RyR1 (Bhat *et al.* 1997b).

Algunas mutaciones, eliminaciones o quimeras han mostrado la existencia de regiones reguladoras de los sitios de unión a la cafeína (Bhat *et al.*, 1997a,b; Tong *et al.*, 1997; Du *et al.*, 2000; Du *et al.*, 2001; etc.). Entre éstas destaca el intercambio de las glicinas por alaninas en el sitio comprendido entre los aminoácidos 2370-2375, los resultados ha mostrado que el sitio de glicinas tiene una participación en la regulación de la sensibilidad del RyR1 frente a la cafeína. Este sitio, además, está incluido en lo que se ha denominado como el dominio 2 (aminoácidos 2163-2458) asociado a la hipertermia maligna, es decir la hipersensibilidad a los anestésicos asociada a mutaciones en el RyR1 (Du *et al.* 2001).

El efecto que tienen otras alquilxantinas como la teofilina, la teobromina, etc., ha sugerido una naturaleza hidrofóbica para estos sitios de cafeína. De hecho, se ha observado que un incremento en la hidrofobicidad en las posiciones 7, 1 y 3, incrementan la habilidad de las alquilxantinas para activar al RyR1. Las posiciones 8 y 9 no mostraron efecto alguno (Liu y Meissner 1997).

Hasta el momento, se han caracterizado dos formas en que las purinas modulan con el RyR1 para alterar su actividad: ya sea como lo hace el ATP y los demás nucleótidos de adenina, incrementando el tiempo de apertura del canal y modulando a los sitios de ryanodina; o bien como lo hace la cafeína y las otras alquilxantinas; es decir, aumentando la frecuencia de los eventos de apertura y la

sensibilidad de los sitios activadores (de alta afinidad) de calcio, los que, a su vez, pueden estimular positivamente a los de ryanodina.

El problema: La modulación del RyR1 por otros derivados de purina.

Aunque el efecto que los nucleótidos de adenina y las alquilxantinas ejercen sobre el RyR1 está bien establecido, poca información se ha generado sobre el efecto que otros derivados de purina, diferentes a la adenina o a las alquilxantinas, pudieran inducir sobre la actividad del RyR1. Para averiguar lo anterior, se puede emplear a la adenosina y a sus metabolitos (adenina, inosina, hipoxantina, xantina y ácido úrico) (Fig. 6). Además, al igual que se ha establecido con el ATP y la cafeína, también es posible que la caracterización de dicho efecto, permita proponer el tipo de sitio de reconocimiento o de unión para cada purina en el RyR1, que en este caso puede ser: 1) del tipo para ATP, 2) del tipo para cafeína ó 3) de un tipo diferente que reconoce otras purinas.

Para caracterizar el efecto que la adenosina y sus metabolitos ejercen sobre la actividad del RyR1, se puede utilizar los ensayos de unión específica con $[H^3]$ -ryanodina, que constituyen una prueba directa del estado funcional del canal.

La orientación del ligando en el sitio de unión de la proteína juega un papel fundamental, no sólo en lo que respecta al propio reconocimiento entre ambas moléculas, sino también en la magnitud del efecto que produce el ligando sobre la actividad de la proteína. En ese sentido, la estructura molecular del ligando determina la distribución de los electrones con los cuales interactúa con la proteína. De esta forma, si se conoce la distribución electrónica de una molécula, es posible obtener información sobre su posible orientación en un campo eléctrico, como el que existe en la interacción con el sitio de unión de la proteína. Un parámetro que sirve para evaluar la distribución electrónica es el vector momento dipolar (μ), que se define como un vector situado a lo largo del eje de un dipolo, cuyo sentido es, según la convención física, de la carga negativa a la positiva (en la convención química, el vector se representa gráficamente en el sentido inverso, por lo que la punta del vector corresponde a la carga negativa). Cuando un campo eléctrico influye a un dipolo (una molécula, por ejemplo) lo hace girar hasta una posición en la cual el momento dipolar sea paralelo al vector del campo eléctrico (Sears *et al.* 1988) (Fig. 7).

En las purinas el momento dipolar parece ser un factor determinante en la unión de estas moléculas a su sitio de reconocimiento. Esta propiedad fundamental resulta de las diferencias en la densidad electrónica que posee cada uno de los átomos que constituyen a la molécula (Pullman *et al.* 1970; Olsson 1983).

La adenosina y sus metabolitos presentan diferencias estructurales entre cada una de ellas (Fig. 6). Tales diferencias, se traducen en una distribución electrónica diferente para cada purina, esta distribución se puede evaluar mediante el μ , que es posible calcular teóricamente a través de diferentes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

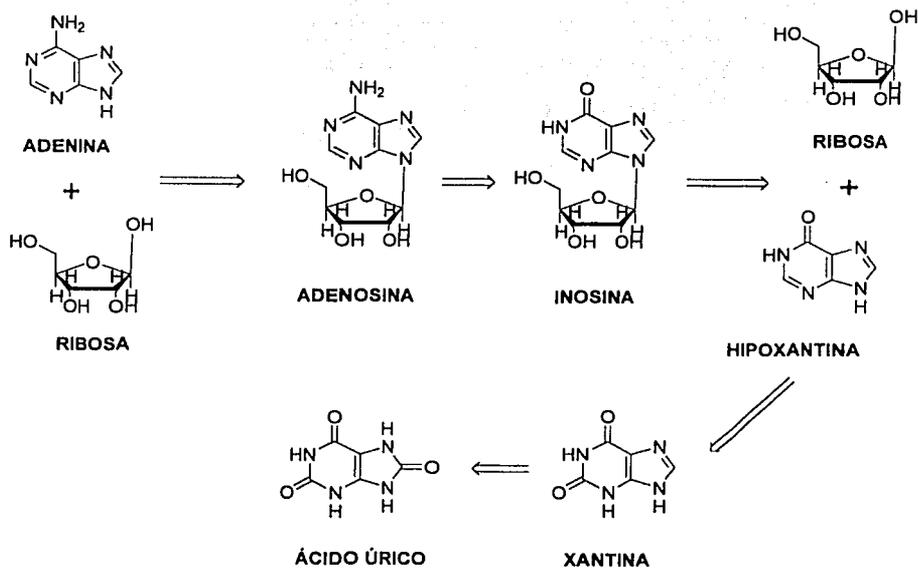


Fig. 6. Adenosina y sus metabolitos. Estructuralmente difieren por su estado de oxidación o por la presencia del enlace β -glucosídico, en la adenosina y la inosina, que se forma entre el N9 del anillo de purina y el anillo de ribosa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

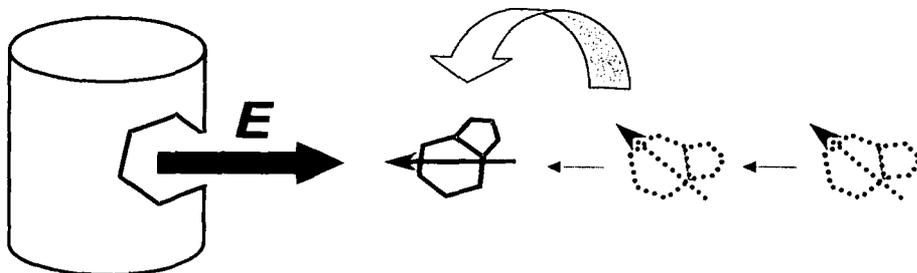


Fig. 7. Cuando un campo eléctrico influye a un dipolo (una molécula, por ejemplo) lo hace girar hasta una posición en la cual el momento dipolar sea paralelo al vector del campo eléctrico. En este caso, cuando la purina moduladora difunde (estructuras punteadas) en el medio presenta una orientación azarosa, pero al sentir la influencia del campo eléctrico (E) del sitio de unión en la proteína (por ejemplo el RyR1, que se ilustra en forma cilíndrica) experimenta un giro (representado por la flecha en blanco) que orienta a su vector momento dipolar (μ) de manera paralela a dicho campo. En este caso, el μ se ilustra siguiendo la convención química, es decir que la punta del vector que cruza a la estructura que simula a la purina corresponde a la carga negativa, por lo que debe quedar antiparalela al vector del campo (E).

TEMA CON
FALLA DE ORIGEN

métodos, entre los que se encuentran los *ab initio* (véase Apéndice B para más detalles). Estos métodos de cálculo proporcionan resultados de precisión confiable (Levine 1991; Jensen, 1999).

Entonces: *siendo el μ un factor relevante en el reconocimiento y el efecto que ejercen las purinas en sus sitios de unión, es posible establecer una relación entre esta propiedad electrónica y el efecto producido por la adenosina y sus metabolitos sobre la actividad del RyR1.*

Para lograr lo anterior, se puede relacionar la máxima actividad (unión específica con [H^3]-ryanodina) promovida por la adenosina y sus metabolitos con las coordenadas del μ (calculado por métodos *ab initio*). Con ambas informaciones (actividad y orientación electrónica), es posible establecer un modelo estadístico en el que se infieran y se diseñen purinas con características estructurales que produzcan un efecto óptimo sobre la actividad del RyR1.

A diferencia de otros métodos, un enfoque como el que se propone en este estudio salva el problema de no contar con la estructura tridimensional de la proteína –o al menos del sitio de unión–, tal como se requiere en otros metodologías como el "Docking" o el CoMFA (Conformation Field Analysis). En el primero, mediante los métodos de la dinámica molecular, se puede observar cómo se lleva a cabo el reconocimiento geométrico entre proteína y ligando (Mangoni et al. 1999). En el segundo, se aprovecha la estructura tridimensional que el sitio tiene en otra proteína que reconoce al mismo tipo de ligando para definir la conformación que en su interior adquieren los diferentes derivados que se prueban. Con esa información se evalúan los potenciales eléctricos y estéricos que rodean a los derivados y se relacionan con su respectiva actividad biológica (Cramer y Patterson 1988).

La utilización del CoMFA ha permitido establecer relaciones estructura-actividad entre los derivados de la ryanodina (ryanoides), lo cual ha llevado a comprender mejor la naturaleza de de las interacciones que la ryanodina experimenta en el sitio de unión de alta afinidad (Sutko *et al.* 1997; Welch 1998) en el RyR1.

Además, el CoMFA ha sido utilizado para comprender la modulación del RyR2 por el ATP y otros derivados de la adenina, incluida la adenosina (Chan *et al.* 2000). Se ha encontrado que la eficacia del ATP se relaciona significativamente con el potencial electrostático que rodea a los fosfatos de ese nucleótido, de manera que la reducción del número de ellos disminuye la eficacia de la activación del RyR2 (Chan *et al.* 2000). Aparentemente, dicha eficacia se debe a que el ATP puede convertir una gran cantidad de energía de unión en cambios conformacionales que estabilizan el estado abierto del canal (Chan *et al.* 2003). Como es natural, la correlación con la actividad se centra en los fosfatos que al estar en su forma desprotonada concentran el potencial eléctrico, por lo que la relevancia del anillo de purina queda fuera del estudio. En contraste, el análisis de QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) que se pretende realizar,

utilizando a la adenosina y a sus metabolitos, se enfoca en cómo las modificaciones del sistema purínico influyen a la óptima activación del RyR1, lo cual también dará lugar a un entendimiento más generalizado de la interacción que las purinas experimentan al inducir la activación de ese receptor-canal.

RESUMEN DE RESULTADOS

A continuación se resumen brevemente los resultados que se presentan en el artículo —en inglés— que aparece en el Apéndice A de este texto y que conforman el centro de esta investigación. Para tener concordancia entre ambos documentos, la numeración de las tablas y figuras empleada en el artículo es la misma que se cita a lo largo de este resumen. Aquellas figuras que no aparecen en el artículo, se enumeran siguiendo el orden de todo el texto. Además los materiales y métodos utilizados también se describen detalladamente en el Apéndice A (págs. 100-103).

Modulación del RyR1 por la adenosina y sus metabolitos

Utilizando los ensayos de la unión específica con [H^3]-ryanodina como índice directo del estado funcional del canal se construyeron curvas concentración-respuesta (Fig.1art.) para establecer la acción moduladora de la adenosina y sus metabolitos sobre la actividad del RyR1. El patrón mostrado en cada curva normalizada con respecto al experimento control (sin purina), indica un patrón de modulación complejo, que se aleja, por ejemplo, de las formas más directas de interpretar como las curvas hiperbólicas o sigmoidales.

En todos los casos estudiados se observaron incrementos en la activación del RyR1 hasta alcanzar un máximo relativo entre el intervalo nM y μ M de concentración. Al aumentar la concentración de purina la activación disminuyó. A continuación se enlistan, en orden de eficacia, el máximo relativo de activación y la concentración a la que se observó dicho máximo para cada purina:

- 1) xantina ----- 6.20 ± 0.95 veces sobre control (10 nM).
- 2) adenosina --- 4.40 ± 0.46 veces sobre control (1 nM).
- 3) inosina----- 2.60 ± 0.35 veces sobre control (10 nM).
- 4) ácido úrico---- 2.00 ± 0.18 veces sobre control (10 nM).
- 5) hipoxantina - 1.70 ± 0.18 veces sobre control (10 μ M).

En el caso de la adenosina, la disminución de la activación, como consecuencia del aumento de la concentración, alcanzó la mitad del máximo de activación y el efecto se mantuvo en forma sostenida y estable; en cambio para la xantina y el ácido úrico, la disminución fue paulatina hasta que el efecto se hizo nulo. Para la inosina y la hipoxantina la disminución fue más drástica, es decir que, después del máximo de activación, el siguiente punto ya no observó efecto significativo alguno (Fig.1art.).

La activación promovida por los dos nucleósidos estudiados, adenosina e inosina, depende de la unión covalente entre la base purínica (adenina e

hipoxantina, respectivamente) con el anillo de ribosa, ya que el efecto activador no pudo ser reproducido por la base, por el monosacárido por separado, ni por la mezcla de ambos en la solución del ensayo (Fig. 2art.).

Para discernir si el incremento en la unión de la $[H^3]$ -ryanodina promovido por la adenosina y sus metabolitos se debe a un incremento en la afinidad de ese alcaloide por el receptor, o bien en el número de receptores presentes en la preparación de retículo sarcoplásmico pesado (enriquecido con RyR1), se estimó la constante de disociación (K_d) y la unión máxima (B_{max}), respectivamente. Los resultados (Fig. 8, Tabla 1art.) muestran que de manera similar al AMP-PCP, un análogo no hidrolizable del ATP, la adenosina y sus metabolitos aumentan principalmente la afinidad del la $[H^3]$ -ryanodina (mostrando valores de K_d menores que el control, los cuales fluctuaron entre 1.39 nM para la xantina hasta 2.96 nM para la hipoxantina), pero sin alterar grandemente la B_{max} . Sin embargo, a diferencia del AMP-PCP, la adenosina y su metabolitos no cambiaron la operatividad de las isotermas de saturación y su coeficiente del Hill fue cercano a uno.

El aumento de la afinidad de la $[H^3]$ -ryanodina por el receptor en presencia de la adenosina y sus metabolitos, se debe a un incremento en la asociación de ese alcaloide al receptor, tal como lo indica el aumento en las constantes de asociación (K_{+1}) correspondientes (Fig. 9, Tabla 1art.) en comparación con el experimento control.

Para ahondar aún más en el mecanismo que sigue la activación promovida por la adenosina y sus metabolitos, se investigó la dependencia al calcio que dicha estimulación tiene. Las curvas mostraron la tradicional forma de campana que presenta el RyR1 al ser estimulado por concentraciones crecientes de calcio con los dos componentes de activación e inactivación (Fig. 3art.).

En presencia de cafeína 20 mM, aumenta la sensibilidad de la activación del RyR1 por el calcio, por lo que se observa incremento en la unión específica de $[H^3]$ -ryanodina desde una concentración de calcio de 1 nM; mientras que en presencia de AMP-PCP 1 mM, el incremento de la unión de $[H^3]$ -ryanodina comienza a apreciarse hasta 0.1 μ M. De hecho el principal efecto se ve como un incremento en el tamaño de la respuesta, es decir en la magnitud del valor máximo de la unión de $[H^3]$ -ryanodina.

Al igual que el AMP-PCP, la adenosina y su metabolitos tampoco influyeron significativamente para estimular la activación de la unión de $[H^3]$ -ryanodina desde concentraciones nanomolares de calcio; en contraste mostraron favorecer el aumento en la unión de $[H^3]$ -ryanodina (Fig. 3art.). Este resultado, aunado al aumento de la asociación de la $[H^3]$ -ryanodina promovido por la adenosina y sus metabolitos, permitió pensar en la predisposición de estas purinas para interactuar con el RyR1 a través de sus sitios de unión al ATP. Por ello, utilizando a la adenosina (1 nM) y a la xantina (10 nM), las purinas con la mayor activación, se

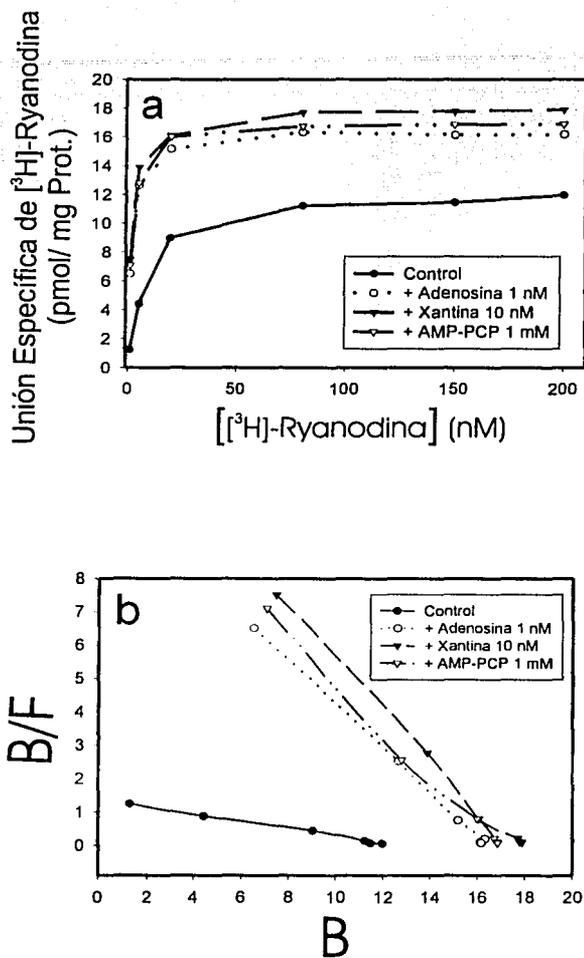


Fig. 8. a) Curvas de saturación con $[^3\text{H}]$ -Ryanodina en presencia de adenosina (1 nM), xantina (10 nM) y AMP-PCP (1 mM). Se muestra un experimento representativo de al menos cuatro experimentos independientes realizados. b) Análisis de scatchard de las curvas en a), como se ilustra en la Fig.4, en este análisis el cociente de la cantidad de radioligando unido entre el libre (B/F) se grafica en función de la cantidad de radioligando unido (B) para obtener la K_d y la B_{max} . Las constantes obtenidas de este análisis para todas las purinas estudiadas, se presentan en la tabla 1 del apéndice A.

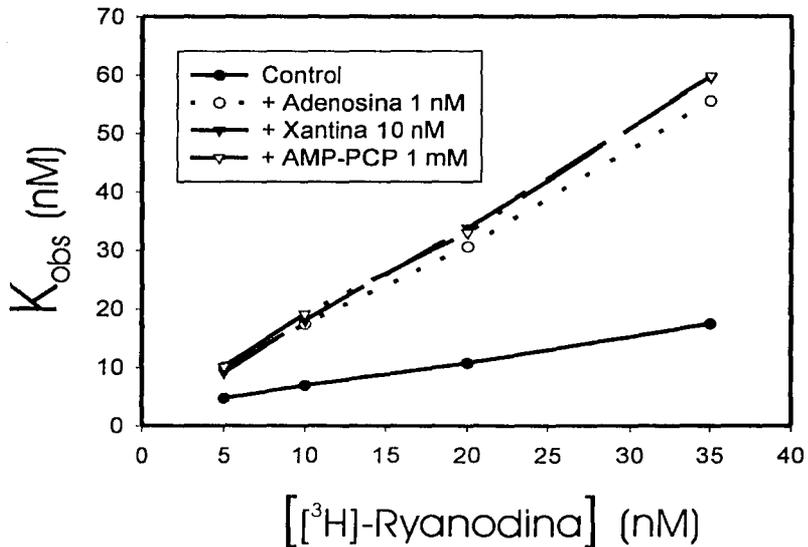


Fig. 9. Efecto de la adenosina (1 nM), xantina (10 nM) y AMP-PCP en la constante de asociación de $[^3H]\text{-Ryanodina}$ ($K+1$). Dicha constante corresponde a la pendiente de la curva que se muestra (McGonigle y Molinoff 1994). Las constantes obtenidas de este análisis para todas las purinas estudiadas, se presentan en la tabla 1 del apéndice A.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

desarrollaron experimentos de competencia con el AMP-PCP (Fig. 4art.) que permitieran explorar, por un lado, cómo la presencia de la adenosina y la xantina influye sobre el efecto que ese nucleótido no hidrolizable tiene sobre la unión de [H^3]-ryanodina; y, por otro, cómo el efecto de la adenosina o de la xantina modifica el del AMP-PCP.

Los resultados indicaron que aunque en el intervalo de concentraciones nM- μ M el AMP-PCP no presenta efecto alguno sobre la actividad del RyR1, le es posible inhibir la activación ejercida por la adenosina (1nM) o la xantina (10 nM), observándose, incluso, la capacidad del RyR1 para discriminar entre una y otra purina; es decir, el efecto producido por la adenosina es 11 veces más difícil de ser inhibido ($IC_{50} = 0.706 \pm 0.058 \mu M$) por el AMP-PCP, que el efecto producido por la xantina ($IC_{50} = 0.063 \pm 0.052 \mu M$).

Al aumentar la concentración de AMP-PCP (intervalo mM), se observó que ni la presencia de la adenosina (1nM), ni de la xantina (10 nM); alteran en forma alguna el patrón hiperbólico que tradicionalmente muestra el AMP-PCP al activar al RyR1.

Cálculo del vector momento dipolar

Para lograr una mejor comprensión de la interacción del RyR1 y las purinas estudiadas, se calculó (por métodos *ab initio*) el vector momento dipolar (μ) para cada una de ellas. El vector se representó gráficamente siguiendo la convención química estándar; es decir, que la punta del vector corresponde a la carga negativa (Solomons 1992). El origen del sistema se fijó en el C4 de cada anillo purínico, el enlace entre el C4 y el N9 define el eje positivo de las x, el C8 se ubica en el primer cuadrante del plano xy y los valores positivos del eje z se dirigen hacia arriba del plano xy.

La representación gráfica del μ en el sistema purínico (Fig. 5art.) mostró que para la adenosina y la xantina, purinas de mayor eficacia para estimular la unión de [H^3]-ryanodina entre todas las involucradas en este estudio, el vector apunta hacia la región comprendida entre el C6 y el N3. La componente z para la xantina es cero, mientras que para la adenosina es positiva (Tabla 2art.).

Con la adenina la dirección es muy similar a los casos anteriores, pero el grupo amino unido al C6 es de geometría piramidal, lo que hace que la componente z del μ sea negativa.

Los componentes en el plano xy para la inosina, la hipoxantina y el ácido úrico, se orientan hacia la región entre el C5, el N7 y el C8. Sólo la inosina posee una componente z positiva.

La componente z positiva, tanto para la adenosina como para la inosina, es inducida por la presencia del anillo de ribosa en su estructura molecular. La eficacia del efecto producido por los nucleósidos es mayor que el efecto de las correspondientes bases purínicas, adenina e hipoxantina, las cuales presentan componentes z negativa o cero, respectivamente.

Utilizando los valores de los máximos relativos de unión específica con [H^3]-ryanodina producidos por la adenosina y sus metabolitos (Fig.1art.), y los valores de las componentes de cada uno de sus μ (Tabla 2art.), fue posible obtener un modelo estadístico en el que se relacionaron la actividad (unión de [H^3]-ryanodina) y la estructura electrónica de estas purinas:

$$y = 0.763 x + 0.810 z + 1.391$$

Donde:

y= Unión Máx. [H^3]-ryanodina
 x= componente x del μ
 z= componente z del μ

$r^2 = 0.95$
 $r_{adj}^2 = 0.92$ (6 observaciones)
 F= 28.79 (signif. al 1.1%)

Cuando el número de observaciones es pequeño, el coeficiente de regresión lineal ajustado (r_{adj}^2) se reduce de tal forma con respecto al coeficiente de regresión lineal (r^2), que en ocasiones la relación lineal que se evalúa llega a perder significancia, aún cuando el r^2 indique lo contrario. En este sentido, el r_{adj}^2 es un parámetro más estricto y conveniente para validar especialmente las relaciones construidas con pocas observaciones como la anterior. En este modelo, la diferencia entre ambos coeficientes es de apenas 0.03 unidades, lo que confirma la solidez de la relación lineal encontrada. Además la diferencia entre la unión de ryanodina observada con la que predice el modelo es pequeña y no excede las 0.5 unidades (Fig. 10).

En este análisis de QSAR sólo se consideraron los confórmeros syn de la adenosina y la inosina, que predominan en solución (Hruska y Danyluk 1968; Rao y Sundaralingam 1970; Altona y Sundaralingam 1972; Olsson 1983). No obstante, aún se desconoce cual de los dos confórmeros es el que ralmente se a los sitios de reconocimiento.

El ATP, que modula al RyR1 en su forma desprotonada y constituyendo un complejo con el Mg^{+2} (Russeau *et al.* 1992), fue excluido del análisis, ya que para éste solamente se consideraron los tautómeros ceto, en su forma neutra, de la adenosina y sus metabolitos, que predominan a pH 7 (Chenon *et al.* 1975; Lange y Dean 1985). La cafeína también fue excluida del análisis, debido a que la estimulación que ejerce sobre la unión de [H^3]-ryanodina ocurre indirectamente a través de los sitios activadores del calcio.

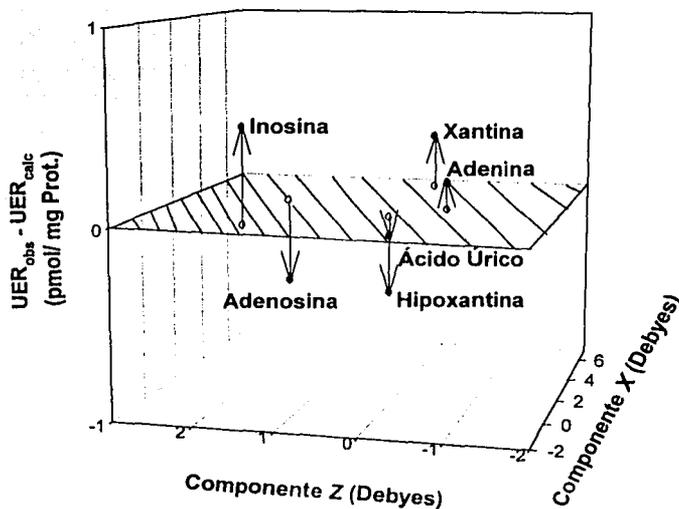


Fig. 10. El modelo de QSAR obtenido describe un plano que involucra las componentes "x" y "z" del vector momento dipolar, por lo que la distancia de cada punto con respecto de dicho plano, indica la dispersión de las observaciones experimentales (círculos rellenos) con respecto a los valores ideales predichos por el modelo (círculos vacíos). De esta manera, entre menos se aleje un punto del plano, menor será la diferencia entre la unión específica de ryanodina observada (UER_{obs}) y la unión específica de ryanodina calculada con el modelo (UER_{calc}), lo cual significa una mejor correspondencia del modelo con la realidad experimental. Las flechas en la figura ayudan a localizar la imagen de cada punto experimental en el plano formado por las componentes "x" y "z" del momento dipolar. Nótese que el valor de $UER_{obs} - UER_{calc}$ no excede las 0.5 unidades.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

La adenosina y sus metabolitos como moduladores del RyR1

La gran variedad de interacciones del RyR1 con múltiples efectores, resulta en una actividad muy compleja. El efecto activador de la adenosina y sus metabolitos sobre este receptor es otro ejemplo de ello. Las curvas de concentración (Fig. 1art., Apéndice A) indican la presencia de sitios de unión con diferentes afinidades, los cuales influyen directamente al sitio de alta afinidad (nM) a ryanodina y son modulados, a su vez, por los sitios de unión a calcio. Como resultado de la estimulación de la unión de ryanodina, se incrementa la asociación del alcaloide con su sitio de unión, con un coeficiente de Hill de alrededor de uno (Tabla 1art).

A diferencia de la adenosina y sus metabolitos, el AMP-PCP induce la asociación cooperativa de la ryanodina. Se ha reportado (Jona *et al.* 2000; Laver *et al.* 2001) que se necesita la unión de al menos dos moléculas de ATP para estabilizar el estado abierto del canal a través de un mecanismo de activación sucesiva de las subunidades del RyR1. Tal activación sucesiva ayuda a comprender porque el incremento en la asociación de ryanodina en presencia de AMP-PCP (1 mM), es cooperativo (Tabla 1art.): es probable que dicha cooperatividad sea el resultado de interacciones entre los cuatro segmentos, uno por cada subunidad, que constituyen al sitio de alta afinidad a ryanodina (Lai *et al.* 1989); es decir, que la presencia del AMP-PCP (análogo no hidrolizable del ATP) puede inducir estados conformacionales tales que, por un lado, favorezcan la apertura del canal, dejando que el sitio de unión quede más expuesto para unir ryanodina, y por otro, permitiendo que dicho sitio se encuentre ensamblado de forma óptima, de manera que se favorezca la unión del alcaloide. Implícitamente, esta idea significa que cada segmento que compone al sitio de alta afinidad a ryanodina se comporta "como si fuera un sitio –o un subsitio– individual" que contribuye a la formación del sitio de unión completo. Asimismo, permite intuir que los cambios conformacionales inducidos por el AMP-PCP, implican movimientos de la masa del RyR1 –y por supuesto de sus subunidades–, los cuales ya se han podido observar por criomicroscopía electrónica (Serysheva *et al.* 1999). Además es importante recordar que la unión de ryanodina, por sí sola, estabiliza múltiples estados conformacionales que se han asociados a estados de conductancia y subconductancia del RyR1 (Buck *et al.* 1992).

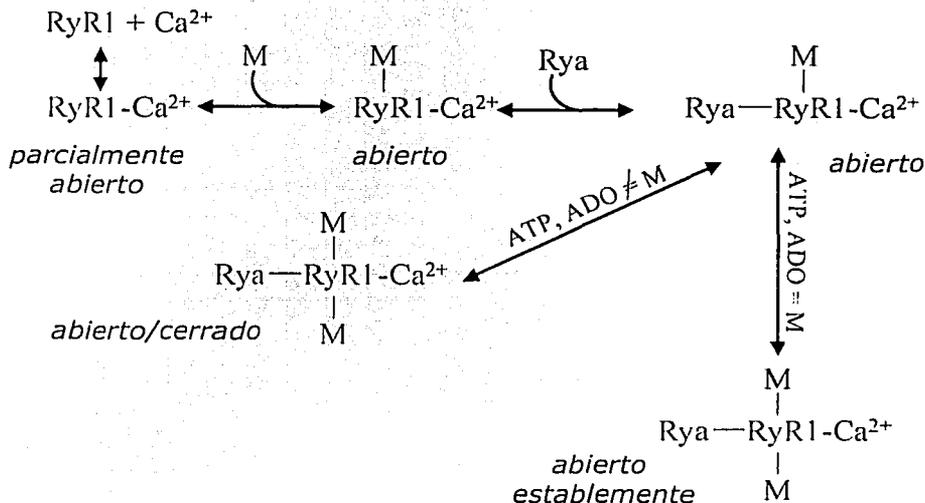
De las purinas estudiadas (Fig. 1 art.), sólo la adenosina induce un estado activado estable en el RyR1, que se alcanza después del máximo de activación como consecuencia del aumento de la concentración. En el resto de las purinas, el pico de máxima activación es seguido por una disminución del efecto, la cual puede darse en forma paulatina, como con la xantina o el ácido úrico, o de forma abrupta, como con la inosina (única cuya máxima activación es antecedida por un incremento más paulatino) o la hipoxantina.

Si bien los sitios de unión para la adenosina y sus metabolitos estimulan directamente al sitio de alta afinidad a ryanodina, esta interacción parece estar regulada por la acción (activación-inhibición) de los sitios de

sin que esto implique cooperatividad alguna (no se muestran datos). Es decir que, al igual que el AMP-PCP, la activación del RyR1 inducida por la adenosina y sus metabolitos se alcanza a una cierta concentración de calcio ($\sim 0.1 \mu\text{M}$; ver Fig. 3art.). Comparativamente, la cafeína permite que la activación de la unión de $[\text{H}^3]$ -ryanodina se lleve a cabo desde una concentración de 1 nM de calcio, de esta manera la trimetilxantina influye al sitio de ryanodina indirectamente a través de los sitios activadores de calcio. De estos efectos sobre la sensibilidad al calcio del RyR1, se desprenden dos ideas importantes:

1) Es probable que la adenosina y sus metabolitos compartan los mismos sitios de unión con el ATP.

2) Al igual que el AMP-PCP (Pessah *et al.* 1987), la adenosina y sus metabolitos se unen al RyR1 una vez que se ha formado el complejo RyR1-Ca^{2+} con el que parcialmente se abre el canal, véase el siguiente esquema:



Una vez formado el complejo RyR1-Ca^{2+} , la unión del metabolito (M) favorece el estado abierto del canal en el que se facilita la unión de la ryanodina (Rya). Si se incrementa la concentración de metabolito y/o de calcio, la activación tenderá a desaparecer o a hacerse nula y el RyR1 regresará a un estado similar al basal en el que el canal experimenta rápidas transiciones entre los estados abierto y cerrado. Sólo la adenosina, de forma similar al ATP (Pessah *et al.*, 1987), fija al

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RyR1 en un estado activado estable que sostiene –a la mitad del máximo– la unión de [H^3]-ryanodina (ver Fig. 1A-art.).

De acuerdo con lo anterior, es posible pensar que la acción reguladora de los sitios activadores de calcio permita observar los efectos de la adenosina y sus metabolitos a tan bajas concentraciones (nM- μ M). Es decir, que la activación del RyR1 producida por la adenosina y sus metabolitos es facilitada una vez que el canal está parcialmente abierto por la acción de la concentración óptima (~10-100 μ M) de calcio; esto se observa, entonces, como un pico de activación máxima, que no muestra cooperatividad, pero que llega a magnitudes tanto o más intensas que el AMP-PCP (Figs. 1 y 4 art.).

Esta misma necesidad de contar con concentraciones óptimas de calcio para lograr la máxima activación del RyR1, se ha descrito para el AMP-PCP (Fig. 3 art.; Pessah *et al.* 1987). No obstante, en ese caso el aumento en la asociación de la [H^3]-ryanodina sí muestra cooperatividad con el sitio de unión de alta afinidad (Tabla 1art.). Por lo que es probable que exista un factor adicional –diferente a la acción del calcio– que hace que la presencia del AMP-PCP estabilice al canal, permitiendo la asociación cooperativa de la ryanodina. En el caso de la adenosina y sus metabolitos dicho factor está ausente.

La competencia de la adenosina y sus metabolitos con el AMP-PCP por los sitios de unión en el RyR1.

A concentraciones bajas (nM- μ M), el AMP-PCP no promueve efecto alguno sobre la actividad del RyR1 (Figs. 4A,B-art.). Sin embargo, una vez que se ha alcanzado el intervalo milimolar de concentración, la activación del receptor se manifiesta y se observa un patrón hiperbólico cuya saturación indica una estabilización del canal en el estado activado (Fig. 4C-art.).

Laver *et al.* (2001) han encontrado que cuando la probabilidad de apertura para cada subunidad del RyR1 excede alrededor del 33%; es decir, cuando una subunidad es parcialmente activada por el ATP, el canal se abre con un tiempo medio de 1 ms. Si se activa una segunda subunidad, el complejo alcanza un estado abierto más estable y de mayor duración. En este mecanismo secuencial, la unión de al menos dos moléculas de ATP induce la activación de dos subunidades simultáneamente, llegando a un nivel de estabilización del canal que facilita la activación sucesiva del resto de las subunidades del receptor. Antes de la apertura total y estable del canal, éste oscila entre estados de apertura prolongada asociados con múltiples subunidades activadas o entre estados de apertura cortos asociados con sólo una subunidad activada.

Es posible que la estabilización del canal se deba en cierta medida a los fosfatos del ATP, tal como lo han sugerido los experimentos realizados con derivados polifosfatados de diadenosina, a partir de los cuales se ha propuesto la formación de un puente intermolecular o cinturón de fosfatos que mantiene al

RyR1 en el estado abierto (Morii y Makinose 1992). Si este puente es menor la activación es menos eficaz.

A concentraciones bajas de AMP-PCP (Figs. 4A,B-art) es posible observar el efecto de alguna otra purina competidora, como la adenosina o la xantina. Es decir, que la baja concentración (nM- μ M) del nucleótido hace más probable el que otra purina ocupe, incluso con bajas cantidades (nM- μ M) también, los sitios de unión. La probabilidad es aún mayor si la purina competidora posee una estructura similar a la del nucleótido. Por ello, inhibir el efecto de la adenosina (1 nM) es 11 veces más difícil que inhibir el efecto de la xantina (10 nM) ($IC_{50} = 0.706 \pm 0.058 \mu$ M; $IC_{50} 0.063 \pm 0.052 \mu$ M, respectivamente). No obstante, la influencia que el AMP-PCP ejerce sobre el estado del canal es tal, que tiende a desaparecer la activación mostrada por la adenosina o por la xantina. Es probable que los fosfatos, además de estabilizar al canal, hagan que la estructura de ese nucleótido resulte más adecuada para ser reconocida en los sitios de unión.

Laver *et al.* (2001) han encontrado que la inhibición competitiva ejercida por la adenosina se observa como un aumento en el tiempo medio del estado cerrado. Dicho efecto también es un poco más pronunciado cuando hay menos cantidad de ATP y –consecuentemente– el RyR1 está parcialmente activado.

De manera complementaria, Balog *et al.* (2000) también observaron que sólo una baja cantidad de AMP-PCP (<0.1 mM) permite observar el efecto producido por otra purina, como el AMP (2 mM), que ocupa competitivamente los sitios de unión. Sin embargo, cuando la proporción de AMP y de AMP-PCP llega a ser de 2:1, ya no se observa diferencia alguna en el incremento de la unión de la $[H^3]$ -ryanodina.

Es muy posible que en la estabilización que el ATP induce sobre el RyR1, tanto la presencia como el número de fosfatos jueguen un papel relevante. Esta capacidad que tienen los sitios de unión a ATP en el RyR1 para percibir y diferenciar entre el número de fosfatos, ya ha sido reportada anteriormente (Butanda-Ochoa y Díaz-Muñoz, 1998; Morii y Makinose, 1992).

Cuando una molécula de adenosina sustituye a una de las dos moléculas de ATP que podrían inducir al canal hacia un estado de apertura prolongada, se rompe la estabilización (inducida probablemente por los fosfatos) y el canal puede permanecer en un estado parcialmente activado (Laver *et al.* 2001). Los resultados obtenidos al aumentar la concentración del AMP-PCP, señalan que la ruptura de la estabilización del estado abierto del canal, provocada por la competencia entre la adenosina o la xantina con el AMP-PCP, tiene un límite marcado por la concentración del nucleótido, ya que una vez que ésta se incrementa hasta sobrepasar el intervalo milimolar de concentración, la proporción de moléculas del nucleótido es tan elevada (1,000,000:1) con respecto a la de adenosina o a la de xantina -cuyos máximos efectos se observan a

concentraciones nanomolares- que el dominio de la activación inducida por el nucleótido es permanente y ya no se aprecia diferencia alguna (Fig. 4C-art.).

En principio, la sensibilidad de los ensayos de unión específica con $[H^3]$ -ryanodina pudiera no ser lo suficiente como para apreciar diferencias en la modulación que el AMP-PCP (milimolar) ejerce sobre la actividad del RyR1 en presencia de adenosina (1 nM) o de xantina (10 nM). Sin embargo los resultados encontrados por métodos electrofisiológicos (Laver *et al.* 2001). muestran que la ruptura de la estabilización del canal a concentraciones milimolares de ATP, también requiere del aumento de la concentración de adenosina. Es decir, que aún cuando se incrementa la cantidad de ATP, basta con aumentar la cantidad de adenosina para romper dicha estabilización e inducir al canal a un estado parcialmente activado. En otras palabras, la concentración de purina es un factor relevante en la modulación del RyR1 (véase Figs. 1art. y 3art.). Además de esto, la importancia de los fosfatos en la estabilización del estado abierto del canal se pone nuevamente de manifiesto, ya que un aumento en la concentración de la purina competidora -en este caso la adenosina- rompe la estabilización de dicho estado abierto.

Ya se ha discutido la importancia que tiene la concentración de calcio al abrir parcialmente al canal y facilitar la activación del receptor por efecto de la concentración de adenosina o sus metabolitos. Por tanto, es probable que las diferencias con los resultados obtenidos por otros grupos se deban al uso de distintas concentraciones de purina y/o de calcio que no inducen, como en este estudio, la óptima activación del RyR1. No obstante, el empleo de otras técnicas experimentales también pueden ser causa de tales diferencias.

Si bien la información de este estudio se inclina, al igual que otros grupos (Rousseau *et al.* 1988; Morii y Makinose 1992; Zarca y Shoshan-Barmatz 1993; Holden *et al.* 1996; Blazev y Lamb 1999; Laver *et al.* 2001, etc.), por aceptar la competencia entre la adenosina –incluyendo sus metabolitos– y el ATP por los mismos sitios de unión en el RyR1, cabe la posibilidad de que el nucleósido de adenina y sus metabolitos, sean reconocidos en sitios de unión diferentes a los del ATP. En tal caso, queda claro que existe una estrecha interacción de ambos sitios de unión.

Desde un punto de vista fisiológico.

Desde un punto de vista fisiológico, la contracción muscular implica la hidrólisis del ATP y la consecuente acumulación de los productos de su degradación metabólica, entre ellos la adenosina; la cual puede interferir con la activación que el ATP ejerce sobre el RyR1 en la E-C. Se ha propuesto que la manera en que se evita la inhibición competitiva de la adenosina con el ATP es a través de la rápida desaminación del nucleósido de adenina para dar lugar a la inosina. Además, se ha observado una ligera tendencia del ITP a inhibir al RyR1 (Meissner 1984) y no se ha visto efecto alguno por parte del IMP, por lo que se ha

especulado que la inosina, que no está fosfatada, simplemente deje intacto al receptor (Blazev y Lamb 1999; Laver *et al.* 2001). Los resultados que ha arrojado este estudio, difieren del hecho de que la inosina no tengan efecto sobre el RyR1 (Fig. 1art., panel B). Sin embargo, en el músculo en reposo se ha detectado que la concentración de inosina es unas 78 veces mayor que la de adenosina (Butanda-Ochoa 1997), lo cual sugiere que el músculo prefiere evitar la inhibición competitiva de la adenosina con el ATP a través de la desaminación del nucleósido de adenina. Ahora bien, aunque en el músculo en reposo la adenosina se encuentra a una concentración (62.4 μM) capaz de activar al RyR1 (Fig.1art., panel A), ese efecto es anulado por la competencia con la inosina (Butanda 1997) y/o –tal como se ha mostrado en este estudio– con el ATP, el cual se encuentra a una concentración de 9.5 mM en el músculo en reposo (Butanda-Ochoa y Díaz Muñoz 1998).

El papel del vector momento dipolar en la modulación del RyR1 por la adenosina y sus metabolitos

En principio, las diferencias estructurales que existen entre cada una de las purinas estudiadas (ver Fig. 5) no se antojan significativas para producir cambios importantes en la modulación del RyR1. Sin embargo, las curvas dosis-respuesta muestran patrones diferentes entre cada una de las purinas estudiadas (Fig.1art.). De esta manera, aunque todas ellas, excepto la inosina, alcanzan la inosina el máximo de activación en forma súbita, lo hacen a concentraciones distintas. Además, al aumentar la concentración, la adenosina muestra una estabilización de la activación, mientras que la xantina y el ácido úrico, presentan una disminución paulatina de la activación. Para la inosina y la hipoxantina dicha disminución ocurre de forma más drástica.

Estas diferencias en el patrón de modulación para cada purina indican la existencia de elementos que particularizan la forma de interactuar con el receptor. Es decir, que la modificación de la estructura de la purina moduladora, es un factor relevante en la afinidad y en la forma como es reconocida.

Asimismo, dos hechos fortalecen el argumento que propone a la estructura molecular como un factor importante para que estas purinas promuevan la modulación del RyR1: 1) la necesidad que tienen la adenosina y la inosina de la unión covalente entre la base purínica (adenina o hipoxantina, respectivamente) y el anillo de ribosa para producir sus efectos (Fig. 2art.) y 2) la capacidad que tiene el RyR1 para discriminar entre las estructuras de las purinas moduladoras, según lo mostrado por los experimentos de competencia con AMP-PCP. Esta capacidad discriminadora también ha sido observada por el RyR2 (McGarry y Williams 1994).

Los elementos con los que las moléculas –en general– interactúan, son los electrones. Cuando la estructura de una molécula experimenta algún cambio, la distribución de sus electrones también cambia y con ella la orientación que la molécula; una purina adquiere frente al campo eléctrico producido por otra

molécula, por ejemplo una proteína. Dicha orientación es un factor fundamental en el reconocimiento entre ligando y proteína

Para evaluar los cambios en la distribución electrónica producida por las modificaciones estructurales entre cada una de las purinas estudiadas, se utilizó el vector momento dipolar (μ). Esta propiedad fundamental resulta de las diferencias en la densidad electrónica que posee cada uno de los átomos que constituyen a la molécula moduladora (Olsson 1983). Bajo el influjo de un campo eléctrico, el efecto del momento dipolar hace girar al dipolo; en este caso una molécula de purina, hasta una posición en la cual el vector momento dipolar sea paralelo al vector del campo eléctrico (Sears *et al.* 1988). Dicho campo eléctrico podría ser, por ejemplo, el que se induce en los sitios de unión en el RyR1. Sin embargo, a este respecto prácticamente nada se puede decir, ya que se desconoce la estructura tridimensional de los sitios de reconocimiento para las purinas en ese receptor. Este hecho se extiende tanto para los sitios de reconocimiento de la cafeína como para los sitios de ATP, los cuales –según se ha discutido anteriormente– son probablemente los mismos que reconocen a la adenosina y a sus metabolitos en esta proteína. De estos sitios, sólo se sabe que la secuencia consenso de glicinas (Gly X Gly X X Gly) que reconoce al ATP en otras proteínas (como la cinasa dependiente de cAMP) se repite nueve veces por subunidad en la secuencia primaria del RyR1.

En ese sentido, este estudio difiere a otros enfoques como el "Docking", en donde la información tridimensional del sitio de reconocimiento permite observar cómo se lleva a cabo el reconocimiento geométrico entre proteína y ligando (Mangoni *et al.* 1999). Otros enfoques como el CoMFA, aprovechan la estructura tridimensional que el sitio tiene en otra proteína que reconoce al mismo tipo de ligando para definir la conformación que en su interior adquieren los diferentes derivados que se prueban. Con esa información se evalúan los potenciales eléctricos y estéricos que rodean a los derivados y se relacionan con su respectiva actividad biológica (Cramer y Patterson 1988).

El CoMFA se ha utilizado para comprender la modulación del RyR2 por el ATP y otros derivados de la adenina, incluida la adenosina (Chan *et al.* 2000). Sin embargo, como es natural, la correlación con la actividad se centra en los fosfatos que al estar en su forma desprotonada concentran el potencial eléctrico, por lo que la relevancia del anillo de purina queda fuera del estudio. En contraste, el análisis de estructura-actividad (QSAR) realizado con la adenosina y sus metabolitos se enfoca, principalmente, sobre cómo las modificaciones del sistema purínico influyen a la óptima activación del RyR1.

Este análisis de QSAR indica que los componentes "x" y "z" del vector momento dipolar están relacionados con la acción moduladora que estas purinas ejercen sobre la actividad del RyR1. Los resultados implican que el μ de las purinas que más estimulan la unión específica de [H⁺]-ryanodina (xantina, adenosina e inosina) está principalmente orientado hacia el anillo purínico y

presentan un componente que desplaza al vector hacia fuera del plano descrito por dicho anillo.

Como todas las magnitudes vectoriales, el momento dipolar es la resultante de la interacción de sus componentes. Esto mismo se refleja en el modelo de QSAR obtenido en este estudio; es decir, que un cambio en el valor de una de las componentes (particularmente x ó z) puede ser parcial o completamente compensada por la otra. De esta manera, el valor elevado de la componente x en la xantina compensa la ausencia de la componente en la dirección z y permite que esta purina sea la de mayor efectividad (Tabla 2art.). Recíprocamente, en la adenosina la disminución de unos 3 Debyes en su componente x , se compensa por el incremento de ~ 1.6 Debyes en su componente z . Dicha compensación hace que la estimulación de la unión específica de $[H^3]$ -ryanodina promovida por la adenosina sea apenas un 29% menor en comparación con la de la xantina.

La adenina, como la adenosina, también presenta una reducción de unos 3.5 Debyes en la dirección x , pero debido a su componente z negativa, su máxima estimulación es de un 50% con respecto a la xantina.

Para el ácido úrico y la hipoxantina los pequeños valores de sus componentes x no alcanzan a compensar la falta de componente en la dirección z , por lo que sus activaciones son tan sólo del 32 y 27%, respectivamente, en comparación a la xantina.

Aunque la inosina también presenta una componente x desfavorable, el valor positivo de su componente z hace que su máxima estimulación sea un 10 y un 14% mayor que la del ácido úrico o que la de la hipoxantina, respectivamente.

La presencia de la ribosa en la adenosina y en la inosina, es un factor importante para desplazar fuera del plano del anillo purínico al vector momento dipolar y conferirle un valor positivo en sus respectivas componentes z . Esto es congruente con que el nucleósido sea más efectivo que la respectiva base purínica (adenina o hipoxantina) (Fig. 2art.). No obstante, es posible que otro tipo de interacciones (a través de sus grupos $-OH$, por ejemplo) también contribuyan a favorecer la activación del RyR1, ya que la oxidación del anillo de ribosa en derivados polifosfatados de diadenosina produce una mayor activación del RyR cerebral, en comparación con aquellos derivados donde la ribosa permanece intacta (Holden *et al.* 1996).

La estadística indica que la correlación entre la máxima activación del RyR1 con las componentes del μ es fuerte, aún cuando ésta se haya obtenido con sólo seis moléculas ($r_{adj}^2 = 0.92$) y excluyendo a la cafeína y al ATP del análisis. La trimetilxantina fue excluida debido a sus efectos indirectos (a través de los sitios de calcio) sobre la unión de $[H^3]$ -ryanodina y el nucleótido, debido a que sus fosfatos poseen la mayor densidad electrónica en la molécula, lo que desplaza al μ fuera del contexto del anillo de purina (datos no mostrados).

Como muchos otros modelos, la posibilidad que el QSAR ofrece de correlacionar alguna propiedad fundamental de las moléculas moduladoras con el efecto que inducen sobre una proteína, no sólo permite predecir las características estructurales del ligando que inducirá el efecto óptimo deseado, sino, además, da lugar a la generalización del problema que se aborda, en este caso: la interacción que las purinas experimentan al inducir la activación del RyR1.

A diferencia de lo que sucede con otros enfoques como el "Docking" o el CoMFA, por ejemplo; con este enfoque de estructura electrónica-efecto, la falta de información sobre la estructura tridimensional de los sitios de unión o sobre la conformación de los ligandos en su interior, no fue una limitante para llevarlo a cabo y condensar la información en un modelo matemático confiable.

CONCLUSIONES

El análisis y la interpretación de los resultados de este estudio permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- El efecto activador de la adenosina y sus metabolitos indica la presencia de sitios de unión con diferentes afinidades, que afectan directamente al sitio de alta afinidad (nM) a ryanodina y son modulados, a su vez, por los sitios de unión al calcio.
- Como resultado de la estimulación de la unión de ryanodina por estas purinas, se incrementa la asociación del alcaloide con su sitio de unión.
- Al igual que el AMP-PCP, la máxima activación del RyR1 inducida por la adenosina y sus metabolitos se alcanza hasta cumplir con una cierta concentración de calcio, por lo que la interacción con el sitio de ryanodina parece estar regulada por la acción (activación-inhibición) de los sitios de calcio, pero tampoco involucra cooperatividad alguna. De aquí se desprende entonces que:
 - 1) Es probable que la adenosina y sus metabolitos compartan los mismos sitios de unión con el ATP.
 - 2) Al igual que el ATP, la adenosina y sus metabolitos se unen al RyR1 una vez que se ha formado el complejo RyR1-Ca⁺² con el que parcialmente se abre el canal.
- A concentraciones bajas (nM- μ M), el AMP-PCP no promueve efecto alguno sobre la actividad del RyR1. Además, la ocupación de los sitios de unión por otra purina diferente es más probable, sobre todo si ésta posee una estructura similar a la del nucleótido.
- Sin embargo, una vez que se ha alcanzado el intervalo de concentración milimolar, el nucleótido activa al receptor y puede inducirlo, probablemente por acción de sus fosfatos, hasta alcanzar un estado activado estable.
- Cuando la proporción de moléculas del nucleótido es tan elevada (por ejemplo de 1,000,000:1) con respecto a la de una purina competidora, la estabilización del estado activado se conserva.
- Aunque cabe la posibilidad de que la adenosina y sus metabolitos sean reconocidos en sitios de unión diferentes a los de ATP, queda claro que en tal caso, existe una estrecha interacción de ambos sitios de unión.
- La estructura de la purina moduladora, es un factor relevante en la afinidad y en la forma como es reconocida.
- El análisis de QSAR indica que los componentes "x" y "z" del vector momento dipolar (μ) están relacionados con la acción moduladora que la adenosina y

sus metabolitos ejercen sobre la actividad del RyR1. Los resultados implican que el μ de las purinas que más estimulan la unión específica de [H^3]-ryanodina, está principalmente orientado hacia el anillo purínico y presentan un componente que desplaza al vector hacia fuera del plano descrito por dicho anillo.

- En el modelo de QSAR se refleja la naturaleza vectorial del momento dipolar, por lo que un cambio en el valor de uno de sus componentes (particularmente x ó z) puede ser parcial o completamente compensada por la otra.
- La presencia de la ribosa en la adenosina y en la inosina es un factor importante para desplazar fuera del plano del anillo purínico al vector momento dipolar y conferirle un valor positivo en sus respectivas componentes z , lo cual favorece su actividad con respecto a la base purínica sola.
- El modelo de QSAR obtenido en este estudio no sólo permite predecir las características estructurales de la purina que inducirá la activación óptima deseada sobre el RyR1, sino además, da lugar a un entendimiento más generalizado de la interacción que las purinas experimentan al inducir la activación del RyR1.

PERSPECTIVAS

Comúnmente, los resultados de un estudio generan, a su vez, otras ideas que permiten ampliar la investigación en el futuro. Esta sección, además de ofrecer diferentes propuestas para profundizar y ampliar el tema de investigación, intenta constituir un pequeño ejercicio de autocritica, por parte del autor, para evaluar los alcances del estudio realizado.

La adenosina y sus metabolitos son activadores del RyR1, y aumentan la asociación de la $[H^3]$ -ryanodina a ese receptor. Sin embargo, los ensayos de unión específica con $[H^3]$ -ryanodina permiten medir el efecto inducido en una población de receptores, por ello es importante definir con toda claridad el efecto que estas purinas promueven sobre la actividad del canal. Para lograr esto se propone seguir dos enfoques distintos: 1) realizar estudios electrofisiológicos en donde se incorpore al RyR1 en bicapas lipídicas planas y 2) observar los cambios en las dimensiones del poro iónico a través de la Microscopía de Fuerza Atómica (MFA).

En lo que respecta a los sitios de unión para la adenosina y sus metabolitos, podrían emplearse las construcciones del RyR1 que ya se tienen en el laboratorio. Estas construcciones presentan diferentes sitios consenso de glicinas, los cuales podrían fotomarcarse con el $[\alpha^{32}\text{-P}]\text{-dibenzoATP}$ para caracterizar y cuantificar el número de sitios para ATP. Asimismo, utilizando la adenosina y sus metabolitos como inhibidores del fotomarcado, podrían aportarse argumentos más sólidos a favor de la competencia de estas purinas con el ATP por los sitios de unión.

Adicionalmente, estas construcciones se expresan en células de insecto sf21, por lo que se podía analizar si la activación que la adenosina y sus metabolitos inducen sobre el RyR1 depende de la presencia de otras proteínas asociadas al receptor. Se tienen antecedentes donde el wt-RyR1 muestra un comportamiento diferente al ser expresado en un ambiente celular distinto al nativo (Antaramián *et al.* 2001).

En lo referente a las relaciones de estructura-efecto, es importante poner a prueba el modelo obtenido en este estudio, para ello:

- 1) Debe analizarse si existe una correlación igualmente fuerte entre las propiedades electrónicas de la adenosina y sus metabolitos y los efectos que producen en la actividad del canal (estimada por métodos electrofisiológicos) y en las dimensiones del poro iónico (medida por MFA).
- 2) Debe utilizarse derivados de adenosina y/o inosina que sean más estables frente a una de las dos conformaciones posibles: anti o syn, para averiguar cuál de los dos conformeros induce la activación del RyR1.
- 3) Debe utilizarse purinas diseñadas con las propiedades electrónicas que favorecen la óptima activación del RyR1 y evaluar su efecto sobre la unión específica de $[H^3]$ -ryanodina y sobre la actividad del canal o sobre las dimensiones del poro iónico.

Una aportación teórica interesante es el cálculo y el análisis del vector momento dipolar de la adenosina y sus metabolitos al ser rodeadas por moléculas de disolvente de naturaleza química diferente (agua, etanol, etc.). El papel que estas purinas tienen en la fisiología celular resalta la relevancia de contar con dicha información; con la cual, además, podría intentarse construir modelos de QSAR que involucren los efectos inducidos por la adenosina y sus metabolitos, no sólo sobre la actividad del RyR1 (medida por las técnicas ya mencionadas), sino sobre otros sistemas biológicos.

Otro problema teórico interesante es el de obtener un modelo de QSAR, mediante el enfoque de CoMFA, en el que se correlacionen los potenciales eléctricos y los estéricos del sistema purínico con sus efectos sobre la actividad del RyR1. Para ello se podría analizar la conformación que la adenosina y sus metabolitos adquieren en el sitio que reconoce ATP en la proteína cinasa dependiente de cAMP, proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta enzima, de estructura conocida (Knighton *et al.* 1991), presenta un sitio de unión para el ATP cuya secuencia primaria es similar (Takeshima *et al.* 1989; Schulz 1993) a la que se repite nueve veces por subunidad en la secuencia del RyR1.

UNA REFLEXIÓN FINAL

Los procesos celulares se llevan a cabo gracias a la interacción específica de un gran número de moléculas. Sin embargo, se ha dicho que éso no significa que las estructuras y las funciones complejas de los organismos puedan ser deducibles ni analizables desde la escala molecular: *"No siempre se puede predecir ni resolver toda la química con la ayuda de la teoría cuántica, que sin duda constituye, no obstante, la base universal"* (Monod 1993).

Todas las interacciones moleculares –incluyendo las que ocurren dentro de la célula– implican cambios en la estructura electrónica de las especies químicas participantes. Hasta ahora el modelo más adecuado para describir a dichas especies y sus interacciones es la mecánica cuántica. Aunque esta teoría no predice un resultado único de cada observación, sino que, en su lugar, predice un cierto número de resultados posibles y nos da las probabilidades de cada uno de ellos (Hawking 1992); su aplicación hace posible visualizar los fenómenos celulares como el resultado de interacciones moleculares que pueden describirse a través de propiedades fundamentales que permiten encontrar los principios básicos que rigen tanto a dichas interacciones, como a los procesos celulares en general. De esta manera, la relación estadística de estructura-efecto que encontramos, representa una generalización de la modulación purínica del RyR1; dicha generalización se logra gracias a que se basa en una propiedad fundamental de todas las moléculas, tal como lo es su distribución electrónica.

A pesar de que los métodos de cálculo derivados de la mecánica cuántica aún son muy limitados –sobre todo cuando de macromoléculas se trata–, la metodología empleada en este estudio no sólo salva el problema de no contar con la estructura tridimensional de la proteína –o al menos del sitio de unión–, sino además pone de manifiesto la utilidad de la mecánica cuántica para basar –tal como se ha dicho– una interacción intermolecular en una propiedad fundamental. No obstante, está claro que el contar con tal información estructural, facilitaría un entendimiento más detallado del problema. Por ello, cada día es más necesaria la información que experimentalmente se obtiene de las estructura tridimensional de las proteínas y de las macromoléculas biológicas en general. Actualmente, muchos esfuerzos están encaminados para reunir los elementos que provean de una visión molecular de la fisiología celular.

Entender las interacciones intermoleculares que se realizan dentro de la célula es una tarea titánica, pero importante; ya que se trata de un fenómeno cotidiano dentro de la fisiología celular. Por ello su entera comprensión permitirá una explicación molecular de los procesos vitales y de los mecanismos que la naturaleza ha seguido para seleccionar estructuras que específicamente realizan las funciones celulares. Asimismo, este conocimiento permitiría diseñar moléculas específicas con efectos controlados, lo que fructificaría en diversas aplicaciones (terapéuticas, herbicidas, etc.) encaminadas a lograr el bienestar colectivo.

REFERENCIAS

Aghdasi, B., Reid, M. B. y Hamilton, S. L. **Nitric Oxide Protects the Skeletal Muscle Ca^{2+} Release Channel from Oxidation Induced Activation.** *J. Biol. Chem.* (1997). 272: 25462-25467.

Ahern, G. P., Junankar, P. R. y Dulhunty, A. F. **Single Channel Activity of the Ryanodine Receptor Calcium Release Channel is Modulated by FK-506.** *FEBS Lett.* (1994). 352: 369-374.

Ahern, G. P., Junankar, P. J. y Dulhunty, A. F. **Subconductance States in Single-Channel Activity of Skeletal Muscle Ryanodine Receptor after Removal of FKBP12.** *Biophys. J.* (1997). 72: 146-162.

Altona, C. y Sundaralingam, M. **Conformational Analysis of the Sugar Ring in Nucleosides and Nucleotides. A new Description Using the Concept of Pseudorotation.** *J. Am Chem. Soc.* (1972). 94: 8205-8212.

Antaramián, A. Butanda-Ochoa, A. Díaz-Muñoz, M. Vázquez-Martínez, Vaca-Domínguez, L. **"Functional Expression of Recombinant Type 1 Ryanodine Receptor in Insect sf21 Cells".** *Cell Calcium.* (2001). 30: 9-17.

Balog, E.M., Fruen, B.R., Kane, P.K., and Louis C.F. **Mechanism of Pi Regulation of the Skeletal Muscle SR Ca^{2+} Release Channel.** *Am. J. Physiol.* (2000) 278: C601-C611.

Benacquista, B. L., Sharma, M. R., Samsó, M., Zorzato, F., Treves, S. y Wagenknecht, T. **Amino Acid Residues 4425-4621 Localized on the Three-Dimensional Structure of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor.** *Biophys. J.* (2000). 78: 1349-1358.

Bennett, M. R. **The Concept of a Calcium Sensor in Transmitter Release.** *Progr. Neurobiol.* (1999). 59: 243-277.

Berridge, M. J. **Elementary and Global Aspects of Calcium Signalling.** *J. Physiol.* (1997). 499: 291-306.

Bhat, M. B., Zhao, J., Hayek, S., Freeman, E., Takeshima, H. y Ma, J. **Deletion of Amino Acids 1641-2437 from the Foot Region of Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Alters the Conduction Properties of Ca Release Channel.** *Biophys. J.* (1997). 73: 1320-1328.

^aBhat, M. B., Zhao, J., Takeshima, H. y Ma, J. **Functional Calcium Release Channel Formed by the Carboxy-terminal Portion of Ryanodine Receptor.** *Biophys. J.* (1997). 73:1329-1336

^bBhat, M. B. Zhao, J., Zang, W., Blake, C. W., Takeshima, H., Wier, W. G., y Ma, J. **Caffeine Release of Intracellular Ca^{2+} from Chinese Hamster Ovary Cells Expressing Skeletal Muscle Ryanodine Receptor. Effects on Full-length and Carboxy-terminal Portion of Ca^{2+} Release Channels.** *J. Gen. Physiol.* (1997). 110: 749-762.

Bianchi, C. P., **Role of Calcium Channels of Sarcolemma and the Sarcoplasmic Reticulum in Skeletal Muscle Functions.** *Adv. Exp. Med. Biol.* (1992). 311: 237-244.

Blazev, R. y Lamb, G. D. **Adenosine Inhibits Depolarization-induced Ca^{2+} Release in Mammalian Skeletal Muscle.** *Muscle Nerve.* (1999). 22: 1674-1683

Bourguignon, L. Y. W., Chu, A., Jin, H. y Brant, N. R. **Ryanodine Receptor-Ankirin Interaction Regulates Internal Ca^{2+} Release in Mouse T-Lymphoma Cells.** *J. Biol. Chem.* (1995) 27: 17917-17922.

Brillantes, A. M., Ondrias, O. K., Scott, A., Kobrinsky, E., Ondriasová, E., Moschella, M. C., Jayaraman, T., Landers, M., Ehrlich, B. E., y Marks, A. R. **Stabilization of Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Function by FK506-Binding Protein.** *Cell.* (1994). 77. 513-523.

Buck, E., Zimanyi, I. Abramson, J. J., y Pessah, I. N. **Ryanodine Stabilizes Multiple Conformational States of Skeletal Muscle Calcium Release Channel.** *J. Biol. Chem.* (1992). 267: 23560-23567.

Burns, K. y Michalak, M. **Interactions of Calreticulin with Proteins of the Endoplasmic and Sarcoplasmic Reticulum Membranes.** *FEBS. Lett.* (1993). 318: 181-185.

Butanda-Ochoa, A., Cañedo, R., Martínez, T. y Díaz M. **Entendiendo los Canales Iónicos de Membranas Celulares. Un Enfoque Multidisciplinario.** *Psiquis (México).* (1996). 5: 34-50.

Butanda-Ochoa A. **Modulación por Carga Energética y Catabolitos de Adenosina del Receptor de Ryanodina (RyR) de Músculo Esquelético.** *Tesis-Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.* (1997). 108 pp

Butanda-Ochoa, A. y Díaz-Muñoz, M. **Modulation of the Calcium Release Channel/Ryanodine Receptor from Skeletal muscle by Energy Charge.** *Neurobiol.* (1998). 6: 1-12.

Callaway, C., Seryshev, A. Wang, J., Slavik, K. J., Needleman, D. H., Cantu, C., Wu, Y., Jayaraman, T., y Marks, A. R. **Localization of the High and Low Affinity [³H]Ryanodine Binding Sites on the Skeletal Muscle Ca²⁺ release Channel.** *J. Biol. Chem.* (1994). 269: 15876-15884.

Caswell, A. H., Brandt, N. R., Brunschwing, J. P., y Purkerson, S. **Localization and partial characterization of the Oligomeric Disulfide-linked Molecular Weight 95000 Protein (Triadin) Which Bind the Ryanodine and Dihydropyridine Receptors in Skeletal Muscle Triadic Vesicles.** *Biochemistry.* (1991). 30: 7507-7513.

Chan, W. M., Welch, W. y Sitsapesan, R. **Structural Factors that Determine the Ability of Adenosine and Related Compounds to Activate the Cardiac Ryanodine Receptor.** *British. J Pharmacol.* (2000). 130: 1618-1626.

Chan, W. M. Welch, W. y Sitsapesan, R. **Structural Characteristics that Govern Binding to, and Modulation through, the Cardiac Ryanodine Receptor Nucleotide Binding Site.** *Molec. Pharmacol.* (2003). 63: 174-182.

Chen, S. R. W. y MacLennan D. H. **Identification of Calmodulin-, Ca²⁺-, and Ruthenium Red-Binding Domains in the Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor) of Rabbit Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum.** *J. Biol. Chem.* (1994). 269: 22698-22704

Chen, S. R. Ebisawa, K., Li, X. y Zhang, L. **Molecular Identification of the Ryanodine Receptor Ca²⁺ Sensor.** *J. Biol. Chem.* (1998). 14675-14678.

Chenon, M. Th., Pugmire, R. J., Grant, D. M., Panzica, R. P. y Townsend, L. B. **Carbon-13 magnetic resonance. XXVI. A Quantitative Determination of the Tautomeric Populations of Certain Purines.** *J. Am. Chem. Soc.* (1975). 97: 4636-4642.

Chu, A., Sumbilla, C., Scales, D., Piazza, A. e linesi, G. **Trypsin Digestión of Junctional Sarcoplasmic Reticulum Vesicles.** *Biochem.* (1988). 27: 2827-2833.

Chu, A., Díaz-Muñoz, M., Hawkes, J., Brush, K. y Hamilton, S. L. **Ryanodine as a probe for the Functional State of the Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum Calcium release Channel.** *Molec. Pharmacol.* (1990). 37: 735-741.

Cramer III, R. D. y Patterson, D. E. **Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). I. Effect of Shape on Binding of Steroids to Carrier Proteins.** *J. Am. Chem. Soc.* (1988). 110: 5959-5967.

Díaz-Muñoz, M., Hamilton, S. L., Kaetzel, M. A., Hazarika, P. y Dedman J. R. **Modulation of Ca²⁺ Release Channel Activity from Sarcoplasmic Reticulum by Anexin VI (67-KDa Calcimedín).** *J. Biol. Chem.* 265: 15894-15899.

Du, G. G. y MacLennan, D. **Functional Consequences of Mutations of Conserved, Polar Amino Acids in Transmembrane Sequences of the Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor) of Rabbit Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum.** *J. Biol. Chem.* (1998). 273: 31867-31872.

Du, G. G. y MacLennan, D. H. **Ca²⁺ Inactivation Sites are Located in the COOH-terminal Quarter of Recombinant Rabbit Skeletal Muscle Ca²⁺ Release Channels (Ryanodine Receptors).** *J. Biol. Chem.* (1999). 274: 26120-26126.

Du, G. G., Khanna, K. y MacLennan D. H. **Mutation of Divergent Region 1 Alters Caffeine and Ca²⁺ sensitivity of the Skeletal Muscle Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor).** *J. Biol. Chem.* (2000). 275: 11778-11786.

Du, G. G., Oyamada, H. Khanna V. K. Y MacLennan, D. **Mutations to Gly²³⁷⁰, Gly²³⁷³ or Gly²³⁷⁵ in Malignant Hyperthermia Domain 2 Decrease Caffeine and Cresol Sensitivity of the Rabbit Skeletal-Muscle Ca²⁺-Release Channel (Ryanodine Receptor Isoform 1).** *Biochem. J.* (2001). 360: 97-105.

El-Hayek, R., Antoniu, B., Wang, J., Hamilton, S. L. y Ikemoto, N. **Identification of the Calcium Triggering and Blocking Regions of the II-III Loop of the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor.** *J. Biol. Chem.* (1995). 270: 22116-22118.

El-Hayek, R., Lokuta, A. J., Arevalo, C., y Valdivia, H. H. **Peptide Probe of Ryanodine Receptor Function. Iperatoxin A, A Peptide from the Venom of Scorpion, Pandinus imperator, Selectively activates the Skeletal Type Ryanodine Receptor Isoforms.** *J. Biol. Chem.* (1995). 270: 28696-28704.

El-Hayek, R. y Ikemoto, N. **Identification of the Minimum Essential region in the II-III Loop of the Dihydropyridine Receptor α_1 Subunit Required for Activation of Skeletal Muscle-Type Excitation Contraction Coupling.** *Biochem.* (1998). 37: 7015-7020.

Eu, J. P. Sun, J., Xu, L., Stamler, J. S. y Meissner, G. **The Skeletal Muscle Calcium Release Channel: Coupled O₂ Sensor and NO Signaling Functions.** *Cell.* (2000). 102: 499-509.

Fano, G. M. V., Angelella, P. Aisa, M. C., Giambanco, I. y Donato, R. **S-100 α Protein Stimulates Ca²⁺- Induced Ca²⁺ Release from Isolated Sarcoplasmic Reticulum Vesicles.** *FEBS Lett* (1989). 255: 381-384.

Favero, T. G., Zable, A. C. y Abramson, J. J. **Hydrogen Peroxide Stimulates the Ca²⁺ Release Channel from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum.** *J. Biol. Chem.* (1995). 270: 25557-25563.

Feng, W., Liu, G., Allen, P. D. y Pessah, I. **Transmembrane Redox Sensor of Ryanodine Receptor Complex.** *J. Biol. Chem.* (2000). 275: 35902-35907.

Fessenden, J. D., Wang, Y., Moore, R. A., Chen, S. R. W., Allen, P. D., y Pessah I. N. **Divergent Functionality Properties of Ryanodine Receptor Types 1 and 3 Expressed in a Myogenic Cell Line.** *Biophys. J.* (2000). 79: 2509-2525.

Fleischer, S. e Inui, M. **Biochemistry and Biophysics of Excitation-Contraction Coupling.** *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* (1989). 18: 333-364.

- Franzini-Armstrong, C. y Protasi, F. **Ryanodine Receptors of Striated Muscles: a Complex Channel Capable of Multiple Interactions.** *Physiol. Revs.* (1997). 77: 699-729.
- Fuentes, O., Valdivia, C., Vaughan, D., Coronado, R., y Valcivia H. H., **Calcium-Dependent Block of Ryanodine Receptor Channel of Swine Skeletal Muscle by Direct Binding of Calmodulin.** *Cell Calcium.* (1994). 15: 305-316.
- Furukawa, K. I., Funayama, K., Ohkura, M., Oshima, Y., Tu, A. T. y Ohizumi, Y. **Ca²⁺-Release by Myotoxin a, A Radio-Labellable Probe Having Novel Ca²⁺ Release Properties in Sarcoplasmic Reticulum.** *Br. J. Pharmacol.* (1994). 113: 233-239.
- Ghosh, A. y Greenberg, M.E. **Calcium Signaling in Neurons: Molecular Mechanisms and Cellular Consequences.** *Science.* (1995). 268: 239-246.
- Gilchrist, J. S. C., Belcastro, A. N. y Katz, S. **Intraluminal Ca²⁺ Dependence of Ca²⁺ ad Ryanodine-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Release.** *J. Biol. Chem.* (1992). 267: 20850-20856.
- Guo, W. Joergensen, A. y Campbell, K. *J. Biol. Chem.* (1994). 269: 28359-28365.
- Hain, J., Mayrleitner, M., Fleischer, S., Schindler, H. **Phosphorylation Modulates the Function of the Calcium Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum from Skeletal Muscle.** *Biophys. J.* (1994). 67: 1823-1833.
- Hamilton, S. L., Serysheva, I. y Strasburg, M. **Calmodulin and Excitation-Contraction Coupling.** *NIPS.* (2000). 15: 281-284.
- Hart, J. D., y Dulhunty, A. F. **Nitric Oxide Activates or Inhibits Skeletal Muscle Ryanodine Receptors Depending on its Concentration, Membrane Potential and Ligand Binding.** *J. Membr. Biol.* (2000). 173: 227-236.
- Hasselbach, W. y Migala, A. **Cations and Anions as Modifiers of Ryanodine Binding to the Skeletal Muscle Calcium Release Channel.** *J. Membr. Biol.* (1998). 164: 215-227.
- Hayek, S. M. Zhu, X. Bhat, M. B. Zhao, J., Takeshima, H., Valdivia H. H. y Ma, J. **Characterization of a Calcium-Regulation Domain of the Skeletal-Muscle Ryanodine Receptor.** *Biochem. J.* (2000). 351: 57-65.
- Hawking, W. S. **Historia del Tiempo.** Ed Planeta-Agostini. (1992) 247 pp.
- Hermann-Frank, A., y Varsanyi, M. **Enhancement of Ca²⁺ Release Channel Activity by Phosphorylation of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor.** *FEBS Lett.* (1993). 332: 237-42.
- Herzog, A., Segedi, C., Jona, I., Herberg, F. W. Y Varsanyi, M. **Surface Plasmon Resonance Studies Prove the Interaction of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticular Ca(2+) Release Channel/Ryanodine Receptor with Calsequestrin.** *FEBS Lett.* (2000). 472: 73-77.
- Hille, B. **Ionic Channels of Excitable Membranes.** 2nd ed Sinauer Associates Inc. Sderland, Massachussets. (1992). 426 pp
- Hodgkin, A. L. y Huxley, A. F. **A Quantitative Description of Membrane Current and its Application to Conduction and Excitation in Nerve.** *J. Physiol.* (1952). 117: 500-544.
- Holden, C. P., Padua, R. A. and Geiger, J. D. **Regulation of Ryanodine Receptor Calcium Release Channels by Diadenosine Polyphosphates.** *J. Neurochem.* (1996). 67: 574-580.

Hruska, S. y Danyluk, S. S. **Conformational Changes of Ribose Group in Dinucleoside Mono- and Diphosphates. Temperature Dependence.** *J. Am. Chem. Soc.* (1968). 90: 3266-3267.

Ikemoto, N. Ronjat, M., Mézaros, L. G. y Cosita, M. **Postulated Role of Calsequestrin in the Regulation of Calcium Release from Sarcoplasmic Reticulum.** *Biochem.* (1989). 28: 6764-6771.

Ikemoto, N., Antoniu, B., Kang, J. J. Mezaros, L. G. y Rnjat, M. **Intravesicular Calcium Transient During Calcium Release from Sarcoplasmic Reticulum.** *Biochem.* (1991). 30: 5230-5237.

Jenden, D. J. y Fairhurst, A. S. **The Pharmacology of Ryanodine.** *Pharmacol. Rev.* (1969). 21: 1-25.

Jensen, F. **Introduction to Computational Chemistry.** John Wiley and Sons. New York. (1999). 429 pp.

Jona, I., Szegedi, C., Sarközi, S., Szentesi, P., Csernoch, L. y Kovacs, L. **Altered Inhibition of the Rat Skeletal Ryanodine Receptor/Calcium Release Channel by Magnesium in the Presence of ATP.** *Pflügers Arch.* (2000). 441: 729-738.

Jorgensen, A. O., Shen, A. C., Campbell, K. P., y MacLennan, D. H. **Ultrastructural Localization of Calsequestrin in rat Skeletal Muscle by Immunofluorescence Labeling of Ultrathin Frozen Sections.** *J. Cell. Biol.* (1983). 97: 1573-1581.

Kawasaky, T. y Kasai, M. **Regulation of Calcium Channel in Sarcoplasmic Reticulum by Calsequestrin.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1994). 199: 1120-1127.

Kim, S., Shin, D. W. Kim, D. H. y Eom S. H. **Crystallization and Preliminary X-Ray Crystallographic Studies of the D2 region of the Skeletal Muscle ryanodine Receptor.** *Biol. Cryst. D55:* 1601-1603.

Knudson, C. M., Stang, K. K., Jorgensen, A. O. y Campbell, K. P. **Biochemical Characterization and Ultrastructural Localization of a Major Junctional Sarcoplasmic Reticulum Glycoprotein (Triadin).** *J. Biol. Chem.* (1993). 268: 12637-12645

Knighton, D. R., Zheng, J., Eyck, L. F. T., Ashford, V. A., Xuong N., Taylor, S. S. and Sowadski, J. M. **Crystal Structure of the Catalytic Subunit of Cyclic Adenosine Monophosphate-Dependent Protein Kinase.** *Science.* (1991). 253: 407-413.

Knudson, C. M., Stang, K. K., Moomaw, C. R., Slaughter, C. A. y Campbell, K. P. **Primary Structure and Topological Analysis of Skeletal Muscle-Specific Junctional Sarcoplasmic Reticulum Glycoprotein (Triadin).** *J. Biol. Chem.* (1993). 268. 12646-12654.

Kurebayashi, N. y Ogawa, Y. **Effect of luminal calcium on Ca²⁺ release channel activity of sarcoplasmic reticulum in situ.** *Biophys. J.* (1998). 74: 1795-1807.

Lamb, G. D. **Excitation-Contraction Coupling in Skeletal Muscle: comparisons with cardiac muscle.** *Clinical Exp. Pharmacol. Physiol.* (2000). 27: 216-224

Laver, D. R., Eager, K. R., Taoube, L., y Lamb, G. D. **Effects of Cytoplasmic and Luminal pH on Ca²⁺ release Channel from Rabbit Skeletal Muscle.** *Biophys. J.* (2000). 78: 1835-1851.

Lange, N. A., y Dean, J. A. Eds. **Lange's handbook of chemistry.** McGraw-Hill Book Co.: New York, (1985). pp. 5.19-5.61.

Laver, D. R., Lenz, G. K. E. y Lamb, G. D. **Regulation of the Calcium Release Channel from Rabbit Skeletal Muscle by the Nucleotides ATP, AMP, IMP and Adenosine.** *J. Physiol.* (2001). 537. 763-778.

Leong, P. y MacLennan, D. H. A **37-Amino Acid Sequence in the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Interacts with the Cytoplasmic Loop between Domains II and III in the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor.** *J. Biol. Chem.* (1997). 273: 7791-7794.

Levine, I. N. **Quantum Chemistry.** Prentice Hall. (1991). New Jersey. 629 pp.

Liu, W. and Meissner, G. **Structure-Activity Relationship of Xanthines and Skeletal Muscle Ryanodine Receptor/Ca²⁺ Release Channel.** *Pharmacol.* (1997). 54: 135-143.

Liu, Z., Zhang, J., Sharma, M. R., Li, P., Chen, S. R. y Wagenknecht, T. **Three-dimensional Reconstruction Of the Recombinant Type 3 Ryanodine Receptor and Localization of Its Amino Terminus.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (2001). 98: 6104-6109.

Lu, X., Xu, L. y Meissner, G. **Phosphorylation of Dihydropyridine Receptor II-III Loop Peptide Regulates Skeletal Muscle Calcium Release Channel Function.** *J. Biol. Chem.* (1995). 270: 18459-18464.

Mackrill, J. J. **Protein-Protein Interactions in Intracellular Ca²⁺-Release Channel Function.** *Biochem. J.* (1999). 337: 345-361.

Mangoni, M. Roccatano, D. y Di Nola, A. **Docking of Flexible Ligands to Flexible receptors in Solution by Molecular Dynamics Simulation.** *Proteins.* (1999). 35: 153-162.

Marie, V. y Silva, E. **Calcium Pool Size Modulates the Sensitivity of the Ryanodine Receptor Channel and Calcium-Dependent ATPase of Heavy Sarcoplasmic Reticulum to Extravesicular Free Calcium Concentration.** *J. Cellular. Phys.* (1998). 175: 283-294.

Marx, S. O., Ondrias, K. Y Marks, A.R. **Coupled Gating between Individual Skeletal Muscle Ca²⁺ Channel (Ryanodine Receptors).** *Science.* (1998). 281: 818-821.

Mayrleitner, M. Chandler, R., Schindler, H. y Fleischer, S. **Phosphorylation with Protein Kinases Modulates Calcium Loading of Terminal Cisternae of Sarcoplasmic Reticulum from Skeletal Muscle.** *Cell Calcium.* (1995). 18: 197-206.

McGarry, S. J. y Williams, A. J. **Adenosine Discriminates Between the Caffeine and Adenine Nucleotide Sites on the Sheep Cardiac Sarcoplasmic Reticulum Calcium Release Channel.** *J. Membr. Biol.* (1994). 137: 169-177.

McGonigle, P. y Molonoff, P. B. **Receptors and Signal Transduction: Classification and Quantitation.** (Cap. 10). En: Siegel Agranoff, B. W., Alberts, R. W. Y Molinoff, P. B (Eds.). *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects.* (1994). 5th ed. Raven press. pp. 209-230.

Meissner, G. **Adenine Nucleotide Stimulation of Ca²⁺- Induced Release Sarcoplasmic Reticulum.** *J. Biol. Chem.* (1984). 259: 2365-2374.

Meissner, G. **Ryanodine Activation and inhibition of the Ca²⁺ Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum.** *J. Biol. Chem.* (1986). 261: 6300-6306.

Meissner, G., Rousseau, E., y Lai, F. A. **Structural and Functional Correlation of the Trypsin-Digested Ca²⁺ Release Channel of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum.** *J. Biol. Chem.* (1989). 264: 1715-1722.

Meissner, G. **Ryanodine Receptors/ Ca²⁺ Release Channels and their Regulation by Endogenous Effectors.** *Annu. Rev. Physiol.* (1994). 56: 485-508.

Menegazzi, P., Larini, F., Treves, S., Guerrini, R., Quadroni, M., y Zorzato, F. Identification and Characterization of Three Calmodulin Binding Sites of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor. *Biochemistry*. (1994) 33: 9078-9084.

Meszáros, L. G., Minarovic, I., y Zahradnikova, A. Inhibition of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Calcium release Channel by Nitric Oxide. *FEBS Lett.* (1996). 380: 49-52.

Meyers, M. B., Puri, T. S., Chien, A. J., Gao, T., Hsu, P. H., Hosey, M. M. y Fishman, G. I. Sorcin Associates with the Pore-Forming of Voltage-Dependent L-type Ca^{2+} Channels. *J. Biol. Chem.* (1998). 273: 18930-18935.

Mickelson, J. R., y Louis, C. Malignant Hyperthermia: Excitation-Contraction Coupling, Ca^{2+} release Channel, and Cell Ca^{2+} Regulation Defects. *Physiol. Rev.* (1996). 76: 537-592.

Mitchell, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism. *Nature* (1961). 191: 144-148.

Morii, H., and Makinose, M. Adenosine(5')hexaphosphate(5')adenosine Stimulation of a Ca^{2+} -Induced Ca^{2+} -Release Channel from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum. *Eur. J. Biochem.* (1992) 205: 979-984.

Monod, J. *El Azar y la Necesidad*. Ed. Planeta-Agostini. (1993). 204 pp.

Morrisette, J., Kratzschmar, J., Haendler, B., El-Hayek, R., Mochca-Morales, J., Martin B. M., Patel, J. R., Moss, R. L., Schleuning, W. D., Coronado, R. y Possani, L. Primary Structure and Properties of Helothermin, A Peptide Toxin That Blocks Ryanodine Receptors. *Biophys. J.* (1995). 68: 2280-2288.

Morrisette, J., Beurg, M., Sukharev, M. y Coronado, R. Purification and Characterization of Ryanotoxin, A Peptide with Actions Similar to Those of Ryanodine. *Biophys. J.* (1996). 71: 707-721.

Nakai, J., Dirksen, R., Nguyen, H. T. Pesaah, I. N., Beam, K. G. y Allen, P. D. Enhanced Dihydropyridine Receptor Channel Activity in the Presence of Ryanodine Receptor. *Nature*. (1996). 380: 72-75.

Nakai, J. Sekiguchi, N., Rando, T. A., Allen, P. D. y Beam, K. G. Two Regions of the Ryanodine Receptor Involved in Coupling with L-Type Ca^{2+} Channels. *J. Biol. Chem.* (1998). 273: 13403-13406.

^aNakai, J., Tanabe, T., Konno, T., Adams, B. y Beam K. G. Localization in the II-III Loop of the Dihydropyridine Receptor of a Sequence Critical for Excitation-Contraction Coupling. *J. Biol. Chem.* (1998). 273: 24983-24986.

Nakai, J., Gao, L., Xu, L., Chunlin, X., Pasek, D. A. y Meissner, G. Evidence for a Role of C-terminus in Ca^{2+} Release Channel (Ryanodine Receptor). *FEBS Lett.* (1999). 459: 154-158.

Nicholls, J. G., Martin, A. R. y Wallace B. C. *From Neuron to Brain*. 3^{ra} ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts. (1992). pp. 265-266.

Nicoll, R. A. The Coupling of Neurotransmitter Receptors to Ion Channels in the Brain. *Science*. (1988): 241: 545-550.

O'Brien, J. J., Feng, W., Allen, P. D., Chen, S. R., Pessah, I. N., y Beam, K. G. Ca^{2+} Activation of RyR1 is not Necessary for the Initiation of Skeletal-type Excitation-Contraction Coupling. *Biophys. J.* (2002). 82(5): 2428-2435.

Olsson, R.A. **Adenosine Receptors on Vascular Smooth Muscle.** En: Berne, R.M., Rall, Th. W. and Rubio, R. (Eds.) Proceedings of the international symposium on adenosine, Charlottesville, Virginia. June 7-11, 1982. Martinus Nijhoff Publishers: Charlottesville, Virginia, 1983; pp. 33-47.

Orlova, E. V., Serysheva, I. I., van Heel, M., Hamilton, S. L. y Chiu, W. **Two Structural Configurations of the Skeletal Muscle Calcium Release Channel.** *Nat. Struct. Biol.* (1996). 3: 547-551.

Orr, I. and Shoshan-Barmatz, V. **Modulation of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor by Endogenous Phosphorylation of 160/150-kDa Proteins of the Sarcoplasmic Reticulum.** *Biochim. Biophys. Acta.* (1996). 283: 80-88.

Pessah, I., Stambuk, R.A. and Casida, J. **Ca²⁺-activated ryanodine binding: mechanism of sensitivity and intensity modulation by Mg²⁺, Caffeine, and Adenine Nucleotides.** *Mol. Pharmacol.* (1987). 31: 232-238.

Porter, C., Zhang J. Z. y Hamilton, S. L. **A Role for Cysteine 3635 of RyR1 in Redox Modulation and Calmodulin Binding.** *J. Biol. Chem.* (1999). 274: 36831-36834.

Presotto, C. Agnolucci, L., Biral, D., Dainese, P., Bernardi, P. y Salviati, G. **A novel Muscle Protein located inside the Terminal Cisternae of the Sarcoplasmic Reticulum.** *J. Biol. Chem.* (1997). 272: 6534-6538.

Protasi, F. Takekura, H., Wang, Y., Chen, S. R. W., Meissner, G., Allen, P. D. y Franzini-Armatrong, C. **RyR1 and RyR3 Have Different Roles in the Assembly of Calcium Release Units of Skeletal Muscle.** *Biophys. J.* (2000). 2494-2508.

Pullman, B. Berthod, B., Bergmann, F., Neima, Z., Weiler-Feilchenfeld, H. y Bergmann, E. D. **Electronic Structure of Purine Tautomers.** *Tetrahedron.* (1970). 26: 1483-1491.

Radermacher, M., Rao, V., Grassucci, R., Frank, J., Timerman, A. P., Fleischer, S. y Wagenknecht, T. **Cryo-electron Microscopy and Three-dimensional Reconstitution of the Calcium Release Channel Ryanodine receptor from Skeletal Muscle.** *J. Cell. Biol.* (1994). 127: 411-423.

Rardon, D. P., Cefali, D. C., Mitchell, R. D., Seiler, S. M., Hathaway D. R. y Jones R. L. **Digestion of the cardiac and skeletal Muscle Junctional Sarcoplasmic Reticulum Vesicles with Calpain-II. Effects on the Ca²⁺ Release Channel.** *Circ. Res.* (1990). 67: 84-96.

Rao, S.T. y Sundaralingam, M. **Stereochemistry of Nucleic Acids and their Constituents. XIII. The Crystal and Molecular Structure of 3'-O-acetyladenosine. Conformational Analysis of Nucleosides with Syn Glycosidic Torsional Angle.** *J. Am. Chem. Soc.* (1970). 92: 4963-4970.

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

Rousseau, E., LA Dine, Q. And Meissner, G. **Activation of the Ca²⁺ Release Channel of Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum by Caffeine and Related Compounds.** *Arch. Biochem. Biophys.* (1988). 267: 75-86.

Rosseau, E. Pinkos, J. y Saravia, D. **Functional Sensitivity of the Native Skeletal Ca²⁺-Release Channel to Divalent Cations and the Mg-ATP Complex.** *Can. J. Physiol. Pharmacol.* (1992). 70: 394-402.

Saito, A., Inui, M., Radermacher, M., Frank, M. y Fleischer, S. **Ultrastructure of the Calcium Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum.** *J. Cell Biol.* (1988). 107: 211-219

- Samsó, M. y Wagenknecht, T. **Contributions of Electron Microscopy and Single-Particle Techniques to the Determination of the Ryanodine Receptor Three-Dimensional Structure.** *J. Struct. Biol.* (1998). 121: 172-180.
- Samsó, M., Trujillo, R., Gurrola, G. B., Valdivia, H. H. y Wagenknecht, T. **Three-Dimensional Localization of the Imperatoxin A Binding Site on the Ryanodine Receptor.** *J. Cell. Biol.* (1999). 146: 463-499.
- Schafer, B. W., y Heizmann C. W. **The S100 Family of EF-Hand Calcium-Binding Proteins: Functions and Pathology.** *TIPS.* (1996). 21: 134-140.
- Schulz, G. E. y Schirmer, R. H. **Principles of Protein Structure.** (Caps. 1, 9). 2^{da} ed. Springer-Verlag. New York. (1979). pp. 1-16, 166-205.
- Schulz, G. **Binding of Nucleotides by Proteins.** *Curr. Op. Struct. Biol.* (1992) 2: 61-67.
- Sears, F. W., Zemansky M. W. y Young, H. D. **Física Universitaria.** 6^a Ed. Addison-Wesley Iberoamérica. Wilmington, Delaware, EUA. (1986). 1110 pp.
- Serysheva, I. I., Orlova, E. V., Chiu, W., Sherman, M. B., Hamilton, S. L. y van Heel, M. **Electron Cryomicroscopy and Angular Reconstitution Used to Visualize the Skeletal Muscle Calcium Release Channel.** *Nat. Struct. Biol.* (1995). 2: 18-24.
- Serysheva, I.I., Schatz, M., van Heel, M., Chiu, W. y Hamilton S. L. **Structure of the Skeletal Muscle Calcium release Channel Activated with Ca²⁺ and AMP-PCP.** *Biophys. J.* (1999). 1936-1944.
- Sleumer, H. O. **Flacourtiaceae.** *Flora Neotrópica.* (1980). Monografía No. 22: 1-207.
- Sharma, M. Loice, H. J., Fleischer, S. y Wagenknecht, T. **Three-Dimensional Structure of Ryanodine Receptor Isoform Three in Two Conformational States as Visualized by Cryo-electron Microscopy.** *J. Biol. Chem.* (2000). 275: 9485-9491.
- Shoshan- Barmatz, V. y Zarka, A. **Trypsin Digestion of the High Affinity Ryanodine Binding Sites of the Junctional Sarcoplasmic Reticulum.** *J. Biol. Chem.* (1988). 263: 16772-16779.
- Shoshan-Barmatz, V., Weil, S., Meyer, H., Varsanyi, M y Heilmeyer, L. M. **Endogenous, Ca²⁺-Dependent Cysteine-Protease Cleaves Specifically the Ryanodine Receptor/ Ca²⁺ Release Channel in Skeletal Muscle.** *J. Membr. Biol.* (1994). 142: 281-288.
- Solomons T.W.G. **Organic Chemistry.** John Wiley and Sons: New York, 1992; pp. 39-40.
- Sorrentino, V. y Volpe, P. **Ryanodine Receptors: How many, Where and Why?** *TIPS.* (1993). 14: 98-103.
- Stoyanovsky, D., Murphy, T., Anno, P. R., Kim, Y. M. y Salama, G. **Nitric Oxide Activates and Cardiac Ryanodine Receptors.** *Cell Cal.* (1997). 21: 19-29.
- Stange, M., Tripathy, A. y Meissner, G. **Two Domains in Dihydropyridine Receptor Activate the Skeletal Muscle Ca²⁺ Release Channel.** *Biophys. J.* (2001). 81: 1419-1429.
- Suko, J., Maurer-Fogy, I., Plank, B., Bertel, O., Wyskovsky, W., Hohenegger, M. y Hellmann, G. **Phosphorylation of serine 2843 in Ryanodine Receptor-Calcium Release Channel of Skeletal Muscle by c-AMP, c-GMP and CaM-Dependent Protein Kinase.** *Biochem. Biophys. Acta.* (1993). 1175: 193-206.

Suko, J., Drobny, H. y Hellmann, G. **Activation and Inhibition of Purified Skeletal Muscle Calcium Release Channel by NO Donors in Single Channel Current Recordings.** *Biochim. Biophys. Acta.* (1999). 1451: 271-287.

Sun, J., Xu, L., Eu, J. P., Stamler, J. S., y Meissner, G. **Classes of Thiols that Influence the Activity of the Skeletal Muscle Calcium Release Channel.** *J. Biol. Chem.* (2001). 276: 15625-15630.

^aSun, J., Xin, C., Eu, J. P., Stamler, J. S. y Meissner, G. **Cystein-3635 is Responsible for Skeletal Muscle Ryanodine Receptor Modulation by NO.** *PNAS.* (2001). 98: 11158-11162.

Sutko, J. L., Airey, J., Welch, W. Ruest, L. **The Pharmacology of Ryanodine and Related Compounds.** *Pharmacol. Rev.* (1997). 49: 53-98.

Sutko, J. L. y Airey, J. A. **Ryanodine Receptor Ca²⁺ Release Channels: Does Diversity in Form Equal Diversity in Function?** *Physiol. Rev.* (1996). 76(4): 1027-13406.

Szegedi, C., Sarkosi, S., Herzog, A., Jona, I. Y Vrsanyi, M. **Calsequestrin: More than 'Only' a Luminal Ca²⁺ Buffer Inside the Sarcoplasmic Reticulum.** *Biochem. J.* (1999). 337: 19-22.

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

Tanabe, T., Beam, K.G., Powell, J. A. y Numa, S. **Restoration of Excitation-Contraction Coupling and Slow Calcium Current in Dysgenic Muscle by Dihydropyridine Receptor Complementary DNA.** *Nature.* (1988). 336: 134-139.

Tanabe, T., Mikami, A., Numa, S. y Beam, K.G. **Cardiac-Type Excitation-Contraction Coupling in Dysgenic Skeletal Muscle Injected with Cardiac Dihydropyridine Receptor cDNA.** *Nature.* (1990). 344: 451-453.

^aTanabe, T., Beam, K.G., Adams B. A., Niidome, T. y Numa, S. **Regions of the Skeletal Muscle Dihydropyridine Receptor Critical for Excitation Contraction Coupling.** *Nature.* (1990). 346: 567-572.

Timerman, A. P., Ogunbumni, E., Freund, E., Wiederricht, G., Marks, A. R., y Fleischer, S. **The Calcium Release Channel of Sarcoplasmic Reticulum is Modulated by Fk-506-Binding Protein. Dissociation and Reconstitution of the FKBP-12 to the Calcium release Channel of Skeletal Muscle Sarcoplasmic reticulum.** *J. Biol. Chem.* (1993). 268: 22992-22999.

Timerman, A. P., Onoue, H., Xin, H. B. Barg, S., Copello, J., Weiderecht, G., y Fleischer, S. **Selective Binding of FKBP-12.6 by the Cardiac Ryanodine Receptor.** *J. Biol. Chem.* (1996). 271: 20385-20391.

Treves, S., Scutari, E., Robert, M., Groh, S., Ottolia, M., Prestipino, G., Ronjat, M. y Zorzato, F. **Interaction of S100A1 with the Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor) of Skeletal Muscle.** *Biochem* 36: 11469-11503

Trimm, J. L., Salama, G. y Abramson, J. J. **Limited Trypsin Modification Stimulates Activation of Ca²⁺ Release from Isolated Sarcoplasmic reticulum Vesicles.** *J. Biol. Chem.* (1988). 263: 17443-17451.

Tripathy, A. Xu, L., Mann, G. y Meissner, G. **Calmodulin Activation and Inhibition of Skeletal Muscle Ca²⁺ Release Channel (Ryanodine Receptor).** *Biophys J.* (1995). 69: 106-119.

Tipathy, A. y Meissner, G. **Sarcoplasmic Reticulum Lumenal Ca^{2+} Has Access to Cytosolic Activation and Inactivation Sites of Skeletal Muscle Ca^{2+} Release Channel.** *Biophys. J.* (1996). 70: 2600-2615.

Tong, J., Oyamada H., Demareux, N. Grinstein, S., McCarthy, V. and MacLennan, H. **Caffeine and Halothane Sensitivity of Intracellular Ca^{2+} Release is Altered by 15 Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) Mutations Associated with Malignant Hyperthermia and/or Central Core Disease.** *J. Biol. Chem.* (1997) 272: 26332-26339.

Wagenknecht, T., Grassucci, R., Berkowitz, J., Wiederrecht, G. J., Xin H., y Fleischer, S. **Cryoelectron Microscopy Resolves FK506-Binding Protein Sites on the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor.** *Biophys. J.* (1996) 70: 1709-1715.

Wagenknecht, T., Radermacher, M. **Ryanodine Receptors: Structure and Macromolecular Interactions.** *Curr. Op. Struct. Biol.* (1997). 7: 258-265.

Wagenknecht, T., Radermacher, M., Grassucci, R., Berkowitz, J. Xin, H. y Fleischer, S. **Localizations of Calmodulin and FK506-Binding Protein on the Three-Dimensional Architecture of the Skeletal Muscle Ryanodine Receptor.** *J. Biol. Chem.* (1997). 272: 32463-32471.

Weiland, G. A. and Molinoff, P. B. **Quantitative Analysis of Drug-Receptor Interactions: I. Determination of Kinetic and Equilibrium Properties.** *Life Sci.* (1981). 29: 313-330.

Wiesner, K. **The structure of ryanodine.** *Adv. Org. Chem.* (1972). 8:295-316.

Weiss, T., Erxleben, C., y Rathmayer W. **Voltage-clamp análisis of membrane currents and excitation-contraction coupling in a crustacean muscle.** *J. Muscle res. Cell Motil.* (2001). 22: 329-344.

Welch, W. **The Ryanodine Receptor: A Report from the Ryanolds.** *En The Structure and Functions of Ryanodine Receptors.* (1998). Londres. Imperial College Press. pp. 111-138.

Witcher D. R. Kovacs, R. J. Schulman, H. Cefali, D. C. y Jones, L. R. **Unique Phosphorilation Site on the Cardiac Ryanodine Receptor Regulates Calcium Channel Activity.** *J. Biol. Chem.* (1991). 266: 11144-11152.

Witcher, D. R., McPherson, P. S., Kahl, S. D., Lewis, T., Bentley, P., Mullinnix, M. J., Windass, J. D. y Campbell, K. P. **Photoaffinity Labeling of the Ryanodine Receptor/ Ca^{2+} Release Channel with an Azido Derivative of Ryanodine.** *J. Biol. Chem.* (1994). 269: 13076-13079.

Xia, R. H., Cheng, X. Y., Wang, H., Chen, K. Y., Wei, Q. Q., Zhang, X. H. y Zhu P. H. **Biphasic Modulation of Ryanodine Binding to Sarcoplasmic Reticulum Vesicles of Skeletal Muscle by Zn^{2+} Ions.** *Biochem. J.* (2000). 345: 279-286.

Xia, R., Stangler, T. y Abramson, J. **Skeletal Muscle Ryanodine Receptor is a Redox Sensor with a Well Defined Redox Potential that is Sensitive to Channel Modulators.** *J. Biol. Chem.* (2000). 47: 36556-36561.

Yamazawa, T. Takeshima, H., Shimuta, M., y Iino, M. **A Region of the Ryanodine Receptor Critical for Excitation Contraction Coupling in Skeletal Muscle.** *J. Biol. Chem.* (1997). 272: 8161-8164.

Yang, H., Reedy, M. M., Burke, C. L., y Strasburg, G. M. **Calmodulin Interaction with Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum Calcium Channel Protein.** *Biochem.* (1994). 33: 518-525.

Yudkowsky, M. I., Beech, J. y Fletcher, J. E. **Myotoxin a Reduces the Threshold for Calcium-Induced Calcium Release in Skeletal Muscle.** *Toxicol.* (1994). 32: 273-278.

Zable, A. C., Favero, T. G. Y Abramson, J. J. **Glutathione Modulates Ryanodine Receptor from Skeletal Muscle Sarcoplasmic Reticulum.** *J. Biol. Chem.* (1997). 272: 7069-7077.

Zhao, F. Li, P., Chen, S. R., Louis, C. F. y Fruen B. R. **Dantrolen Inhibition of Ryanodine Ca²⁺ Release Channels. Molecular Mechanism and Isoform Selectivity.** *J. Biol. Chem.* (2001). 276: 13810-13816.

Zarka, A. y Shoshan-Barmatz, V. **Characterization and Photoaffinity Labeling of the ATP Binding Site of the Ryanodine Receptor from Skeletal Muscle.** *Eur. J. Biochem.* (1993). 213: 147-154.

Zhou, D., Birkenmeier, C., Williams, M., Sharp, J., Barker, J. y Bloch, R. **Small, Membrane-Bound, Alternatively Spliced Forms of Ankyrin Associated with the Sarcoplasmic Reticulum of Mammalian Skeletal Muscle.** *J. Cell. Biol.* (1997). 136: 621-631.

Zucchi y Ronca-Testoni. **The Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ Channel /Ryanodine Receptor: Modulation by Endogenous Effectors, Drugs and Disease States.** *Pharmacol. Rev.* (1997). 49: 1-52.

APÉNDICE A

(ARTÍCULO)

78-A



Bioorganic & Medicinal Chemistry

Chi-Huey Wong, Editor-in-Chief
Department of Chemistry, BCC483A
The Scripps Research Institute
10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, California 92037
USA

Telephone: 858.784.7525
Facsimile: 858.784.7550
Within USA or Canada: 800.410.1557
E-mail: bmc-bmcl@scripps.edu

October 29, 2002

Dr. Mauricio Diaz-Munoz
Departamento de Neurobiologia Celular y Molecular
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Instituto de Neurobiologia
Campus UNAM-UAQ
Juriquilla, Queretaro 76001
Mexico

Re: Manuscript number BF/2002/000108 (*Please quote this number in all correspondence*)

Dear Dr. Diaz-Munoz:

Enclosed please find a review of your manuscript entitled "Modulation of the Skeletal Muscle Ca^{2+} Release Channel/Ryanodine Receptor by Adenosine and Its Metabolites: A Structure-Activity Approach". Based on the review, I am pleased to accept the work for publication in *Bioorganic & Medicinal Chemistry* without further revision. We need you to provide the manuscript in electronic form. Once we have received a disk (or e-mailed files) we will forward to the publisher. Galley proofs will be sent directly to you from the publisher. You will receive 25 free reprints upon publication of the article.

As the journal is typeset, proofs will be faxed or e-mailed to you for your approval before publication. After corrected proofs have been returned by the author, any amendments will be incorporated and the article will then be published online as an *Article in Press* on Elsevier's *ScienceDirect* (<http://www.sciencedirect.com>). *Articles in Press* take full advantage of the enhanced *ScienceDirect* functionality, including the ability to be cited. This is possible due to the innovative use of the DOI article identifier, which enables the citation of a paper before volume, issue, and page numbers are allocated. The *Article in Press* will be removed once the paper has been assigned to an issue and the issue has been compiled. *ScienceDirect* is the world's largest scientific database, covering over 1,200 scientific journals and containing more than 1.8 million articles online.

Best regards,

Sincerely,

Chi-Huey Wong
Editor-in-Chief

PERGAMON
An Imprint of Elsevier Science

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Modulation of the skeletal muscle Ca^{2+} release channel/ryanodine receptor by adenosine and its metabolites. A structure-activity approach.

Armando Butanda-Ochoa^a, Germund Höjer^b and
Mauricio Díaz-Muñoz^{*,*}.

^a*Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, UNAM, Juriquilla Querétaro 76001. Apdo. Postal 1-1141.* ^b*Departamento de Física y Química Teórica, Facultad de Química. UNAM. Cd. Universitaria. 04510. México D.F.*

***Corresponding author:**

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología. Universidad Nacional Autónoma de México. Campus UNAM-UAQ, Juriquilla. Querétaro 76001. México. Apdo. Postal 1-1141.
Tel. & Fax: (525)6-23-40-35.
e-mail: mdiaz@calli.cnbc.unam.mx

Key Words: ATP/ Caffeine/ Dipolar moment/ Purines/ QSAR/ Xanthine

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

ABSTRACT

Activation of ryanodine receptor (RyR) from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum by adenosine and adenosine's metabolites was studied. The purines tested increased the [^3H]-ryanodine binding as follows: xanthine > adenosine > adenine > inosine \geq uric acid > hypoxanthine. The enhanced [^3H]-ryanodine binding did not involve change in the RyR- Ca^{2+} sensitivity and was due mainly to lower values in the affinity constant (K_d) that corresponded with an increase in the association rate constant (K_{+1}). [^3H]-ryanodine maximum binding (B_{max}) was much less affected. Adenosine and inosine effects were dependent on the presence β -glycosidic bond within the ribose ring, since the combination of adenine or hypoxanthine with ribose was not able to emulate the nucleosides' original activation. Competition experiments with AMP-PCP, a non-hydrolyzable analog of ATP, evidenced a nucleotide's inhibitory influence on the adenosine and xanthine activation of the RyR. As a result of a Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) study, we found a significant correlation between the modulation by adenosine and its metabolites on RyR activity and the components of their calculated dipole moment vector. Our results show that the ribose moiety and the dipole moment vector could be factors that make possible the modulation of the RyR activity by adenosine and its metabolites.

INTRODUCTION

The ryanodine receptor (RyR) from the sarcoplasmic reticulum (SR) plays a key role in the excitation-contraction coupling at the triad junction acting as a calcium release channel. The RyR type 1 is the major isoform in the skeletal muscle, and it has been described as a homotetrameric receptor-channel of high molecular weight (~565 kDa per monomer)¹ with allosteric properties that can be modulated by a great variety of agents, including ATP and caffeine².

Regulation of RyR by purines is not simple, since different modes of activation have been postulated for these purines: The adenine nucleotide stimulates the [³H]-ryanodine binding affinity and enhances the open probability of the channel, in a calcium-independent manner, whereas caffeine activates the RyR by enhancing its affinity to calcium³⁻⁵. The different effects on the activity of RyR have suggested that this receptor-channel has separate (but mutually interactive) binding sites for each of these purines⁶.

Besides the well studied effects of ATP and caffeine on the RyR activity, very few experimental observations exist about the role of other purines as potential modulators of the RyR^{7,8}. This lack of information is more evident when purines of physiological significance are considered.

This study describes the effect of adenosine and its metabolites (adenine, inosine, hypoxanthine, xanthine and uric acid) on the [³H]-ryanodine binding of the RyR from rabbit sarcoplasmic reticulum. It provides evidence that at least two molecular parameters are involved in the RyR modulation by these purines: the dipole moment vector and the presence of the ribose ring. Finally, it is demonstrated that the activation of RyR by adenosine and xanthine is modulated by AMP-PCP.

RESULTS

Modulation of RyR by adenosine and its metabolites.

[³H]-Ryanodine binding assay can be used as a probe of the functional state of the RyR channel^{6,9}. According to these reports, experimental conditions that increase the activity of the RyR lead to an increase of [³H]-ryanodine binding, whereas the RyR inhibition is associated to a diminution in the bound [³H]-ryanodine. Hence, our first approach to assess the modulating action of adenosine and its metabolites on the activity of the skeletal muscle RyR was to elaborate [³H]-ryanodine binding dose-response curves for adenosine and its metabolites.

Fig. 1 shows the pattern of activation of [³H]-ryanodine binding associated to the presence of adenosine (Panel A), inosine (Panel B), hypoxanthine (Panel C), xanthine (Panel D) and uric acid (Panel E). The dose-response curves were normalized with respect to the control condition (no purine addition). RyR was activated differentially by all the purines tested, but in each case the pattern of activation was neither hyperbolic nor sigmoid. Distinct to ATP which activates RyR at mM range³, adenosine and its metabolites increased the [³H]-ryanodine binding acting in the range of 1-10 nM (adenosine, inosine, xanthine and uric acid) or low μM (hypoxanthine) concentrations.

Adenosine reached its maximal activation (4.40 ± 0.46 times over control) at 1 nM. When adenosine concentration was increased into the μM-mM range, its activation diminished to half of the maximal response.

Inosine showed a maximal activation (2.60 ± 0.35 times over control) at 10 nM. At higher concentrations, its activation decreased near the control level.

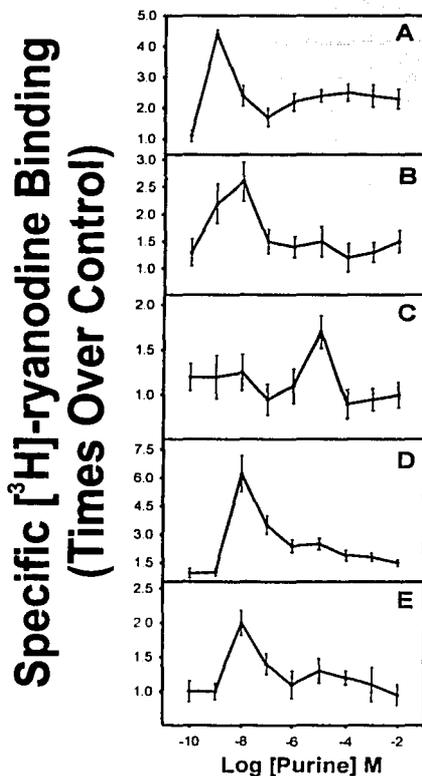


Figure 1. Effect of adenosine and its metabolites on [³H]-ryanodine binding. Each dose-response curve was normalized with respect to control condition (1.00 ± 0.08 pmol/mg protein). (A) adenosine, (B) inosine, (C) hypoxanthine, (D) xanthine and (E) uric acid. Heavy SR membranes (10 μ g) were incubated for 12-14 h in assay buffer (see experimental section) containing 6 nM [³H]-ryanodine and 100 μ M of Ca^{2+} . Data are means \pm SEM of at least four independent experiments. α set at $p < 0.05$.

Hypoxanthine was the weakest activating purine tested. It only caused a modest activation of 1.70 ± 0.18 times over control at $10 \mu\text{M}$. In contrast, xanthine was the most effective reaching a maximal [^3H]-ryanodine binding of 6.20 ± 0.95 times over control at 10 nM . As with the inosine effect, the xanthine activation decreased gradually at higher concentrations.

The dose-response curve of uric acid exhibited a pattern similar to xanthine. However, uric acid was less potent and its maximal activation at 10 nM (2.00 ± 0.18 times over control) was 66% minor than the activation promoted by xanthine.

Role of ribose ring

Distinctively to the rest of the purines tested, adenosine and inosine present a ribose moiety joined through a β -glycosidic bond to the purine ring. To investigate whether or not the activation of RyR by optimal concentrations of adenosine (1 nM) and inosine (10 nM) was dependent of the ribose ring within their structure, the [^3H]-ryanodine binding assay was done with the next protocols: For adenosine: 1) adenosine (purine with the sugar), 2) adenine (only the purine), 3) ribose (only the sugar) and 4) the mixture of adenine and ribose. For inosine: 1) inosine (purine with the sugar), 2) hypoxanthine (only the purine), 3) ribose (only the sugar) and 4) the mixture of hypoxanthine and ribose. Figure 2 shows that the activation of RyR by adenosine and inosine was dependent on the presence of the ribose within their structure, since neither the sole purine (adenine or hypoxanthine), nor the sugar or the combination of purine and sugar, were able to increase the [^3H]-ryanodine binding.

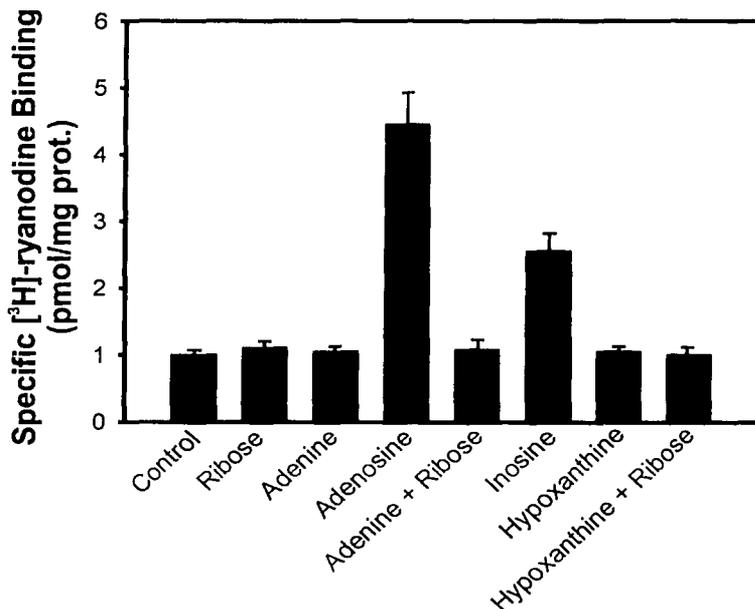


Figure 2. Role of ribose ring in the activation of the RyR by adenosine and inosine. [³H]-Ryanodine binding was done in the presence of the nucleosides (adenosine 1 nM or inosine 10 nM), the purine bases (adenine 1 nM or hypoxanthine 10 nM), ribose (1 or 10 nM) and the mixture of purine bases and ribose. The result corresponding to Ribose is an average of the two concentrations used, since no difference between them was observed. Heavy SR membranes (10 μg) were incubated for 12-14 h in assay buffer (see experimental section) containing 6 nM [³H]-ryanodine and 100 μM of Ca²⁺. Data are means ± SEM of at least four independent experiments. α set at p < 0.05.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RyR Binding Constants

To discriminate if the enhancement in [^3H]-ryanodine binding in presence of adenosine and its metabolites was due to an increase in the [^3H]-ryanodine affinity (K_d) or in the number of binding sites (B_{max}), Scatchard analysis was applied to [^3H]-ryanodine saturation isotherms for each purine tested at their most effective concentration. Values of K_d , B_{max} , and Hill coefficient of each experimental condition are shown in Table 1, which also includes the [^3H]-ryanodine binding parameters in presence of adenine assessed at 1 mM. This concentration corresponds to the maximum response obtained by other groups using ^{45}Ca release and electrophysiological studies^{10,11}. Adenine was able to increase 2.9 ± 0.01 times over control the [^3H]-ryanodine binding. The [^3H]-ryanodine binding parameters obtained in presence of adenine were later used in the QSAR analysis.

The [^3H]-ryanodine binding values in control conditions were similar to those previously reported ($K_d = 8.22 \pm 1.16$, $B_{\text{max}} = 14.48 \pm 2.73$ and Hill coefficient = 1.05 ± 0.12)^{9,12}. We were able to reproduce the increase in [^3H]-ryanodine binding promoted by AMP-PCP that involves a significant enhance in the [^3H]-ryanodine affinity, ($K_d = 1.38 \pm 0.26$ nM), a modest augmentation in the number of [^3H]-ryanodine binding sites ($B_{\text{max}} = 17.41 \pm 2.98$ pmol/mg protein) and a significant cooperativity (Hill coefficient = 1.89 ± 0.26)^{6,10}. The binding constants in the presence of adenosine and its metabolites were similar, if not totally, to those promoted by AMP-PCP. The action of adenosine, adenine, inosine, hypoxanthine, xanthine and uric acid was to activate the [^3H]-ryanodine binding primarily by decreasing the K_d (range from 1.39 nM for xanthine to 2.96 nM for hypoxanthine), and increasing only moderately the B_{max} (range from 16.73 pmol/mg protein for hypoxanthine to 19.88 pmol/mg protein for xanthine). However, differently to

Table 1

[³H]-Ryanodine constants in presence of activator concentrations of adenosine and adenosine metabolites. Experimental conditions were described in the Experimental section. K_d and B_{max} were obtained directly from binding isotherms ($r_{mean} = 0.9975$), the Hill Coefficients by linear regression analysis ($r_{mean} = 0.9424$). The association rate constants (K_{+1}) were derived from the slope of association plots ($r_{mean} = 0.9694$). Data are means \pm SEM of at least four independent experiments, α set at $p < 0.05$.

| Modulator | K_d (nM) | B_{max} (pmol/mg protein) | Hill Coefficient | K_{+1} ($\mu M^{-1} min^{-1}$) |
|--------------------------------|------------------|-----------------------------------|---------------------|---------------------------------------|
| Control | 8.22 \pm 1.16 | 14.48 \pm 2.73 | 1.05 \pm 0.12 | 0.38 \pm 0.05 |
| + Adenosine (1nM) | 1.45 \pm 0.25* | 19.37 \pm 2.99 | 1.04 \pm 0.15 | 1.52 \pm 0.23* |
| + Inosine (10 nM) | 2.00 \pm 0.22* | 17.45 \pm 2.60 | 1.10 \pm 0.09 | 1.10 \pm 0.20* |
| +Hypoxanthine (10 μM) | 2.96 \pm 0.29* | 16.73 \pm 2.21 | 0.95 \pm 0.14 | 0.74 \pm 0.09* |
| + Xanthine (10 nM) | 1.39 \pm 0.19* | 19.88 \pm 2.54 | 0.99 \pm 0.17 | 1.58 \pm 0.28* |
| + Uric acid (10 nM) | 2.15 \pm 0.27* | 18.43 \pm 3.02 | 0.98 \pm 0.20 | 1.02 \pm 0.17* |
| + AMP-PCP (1 mM) | 1.38 \pm 0.26* | 17.41 \pm 2.98 | 1.89 \pm 0.26* | 1.59 \pm 0.24* |
| + Adenine (1 mM) | 1.96 \pm 0.18* | 18.32 \pm 3.39 | 1.02 \pm 0.21 | 1.13 \pm 0.21* |

(*) indicates statistical significance vs control. α set at $p < 0.05$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

the effect of AMP-PCP, adenosine and its metabolites did not change the cooperativity of the saturation isotherms, being in all the cases the Hill coefficient close to 1.

We further explored if the increase in [^3H]-ryanodine affinity promoted by adenosine and its metabolites was due to an enhancement in the association rate constant (K_{+1}). The results are also shown in Table 1. Again, adenosine and its metabolites had a similar action to the one reported for AMP-PCP: they increased significantly the association rate constant of the [^3H]-ryanodine binding assay. The mechanism explaining the augmentation in affinity of [^3H]-ryanodine by adenosine and its metabolites seems coincident to the one associated to the action of ATP.

Calcium Dependence

To further explore the molecular mechanisms by which adenosine and its metabolites activate the skeletal muscle RyR, the Ca^{2+} dependence to stimulate [^3H]-ryanodine binding was tested. Increment in free $[\text{Ca}^{2+}]$ produced a bell-shaped curve in [^3H]-ryanodine binding under control conditions, with an optimal binding at micromolar range (Figure 3). In the presence of 20 mM caffeine, it was observed a shift in the curve towards lower Ca^{2+} concentrations, with a clear increase in the [^3H]-ryanodine binding at 1 nM of free Ca^{2+} confirming previous reports^{2,13}. In contrast, 1 mM AMP-PCP increased the total amount of [^3H]-ryanodine binding, without a significant influence in the Ca^{2+} sensitivity.

Figure 3 shows that similarly to AMP-PCP, and in contrast to caffeine, adenosine and its metabolites also enhanced the total amount of [^3H]-ryanodine binding, without any effect in the Ca^{2+} sensitivity of the RyR. The Hill analysis applied to the activation and inactivation segments of the calcium-dependence curves, showed no difference between the

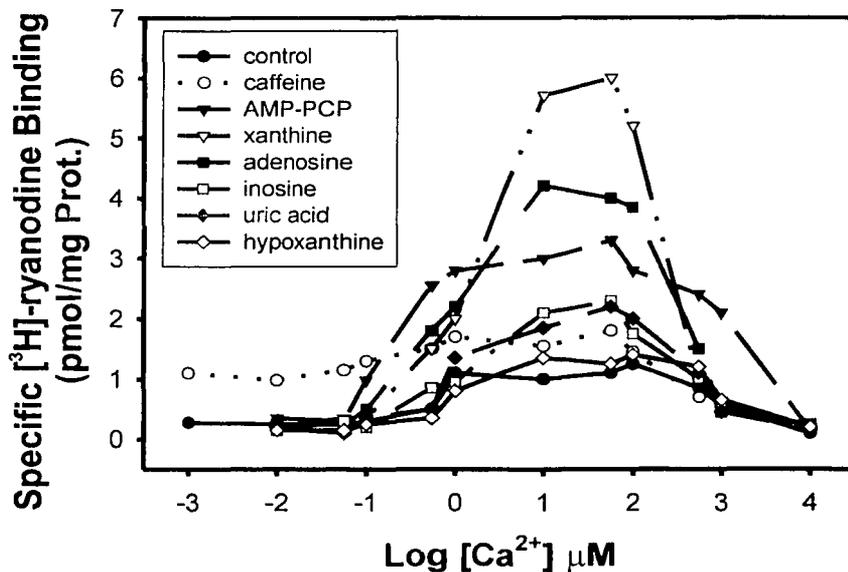


Figure 3. Calcium dependence of the action of adenosine and its metabolites on [³H]-ryanodine binding. Experiments were done using the most effective concentrations of adenosine and its metabolites: 1 nM adenosine, 10 nM inosine, 10 μM hypoxanthine, 10 nM xanthine, 10 nM uric acid. To compare with actions already reported, 1 mM AMP-PCP and 20 mM caffeine were also included. Heavy SR membranes (10 μg) were incubated for 12-14 h in assay buffer (see Experimental section) containing 6 nM [³H]-ryanodine. Data are means of at least four independent experiments. SEM are not shown to clarify the Figure, and varied between 7% – 22% of the mean values.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

control condition and the responses elicited by adenosine and its metabolites (data not shown).

Influence of AMP-PCP on Activation of RyR by Adenosine and Xanthine

Given the lack of effect of adenosine and its metabolites in the calcium sensitivity of [^3H]-ryanodine binding, and the coincidence between AMP-PCP and the purines tested in increasing the [^3H]-ryanodine binding by enhancing the association constant rate (K_{+1}), we hypothesized that adenosine and its metabolites were more predisposed to interact with the ATP binding site in the RyR, more than with the caffeine binding site. Figure 4 shows competition experiments aimed to explore the influence of AMP-PCP on [^3H]-ryanodine binding enhanced by adenosine and xanthine (Panel A and B), as well as the effect of adenosine and xanthine on the [^3H]-ryanodine binding promoted by AMP-PCP (Panel C). Adenosine and xanthine were selected for these experiments since they were the more effective purines to stimulate the activation of RyR (see Figure 1).

Figures 4, in Panels A and B, show that AMP-PCP was able to counteract the optimal stimulation of [^3H]-ryanodine binding elicited by 1 nM adenosine and 10 nM xanthine. A remarkable aspect of this inhibitor action of AMP-PCP was that occurred at nM- μM concentrations of the nucleotide, range in which AMP-PCP does not promote any activation of RyR by itself. The IC_{50} values showed that adenosine activation of [^3H]-ryanodine binding was less susceptible to be inhibited by AMP-PCP than xanthine ($\text{IC}_{50} = 0.706 \pm 0.058 \mu\text{M}$, for adenosine and $\text{IC}_{50} 0.063 \pm 0.052 \mu\text{M}$, for xanthine, $n = 4$).

Figure 4, Panel C shows that neither adenosine nor xanthine at their optimal stimulatory concentrations (1 and 10 nM, respectively) were effective to change the hyperbolic stimulatory pattern of [^3H]-ryanodine binding elicited by mM concentrations of

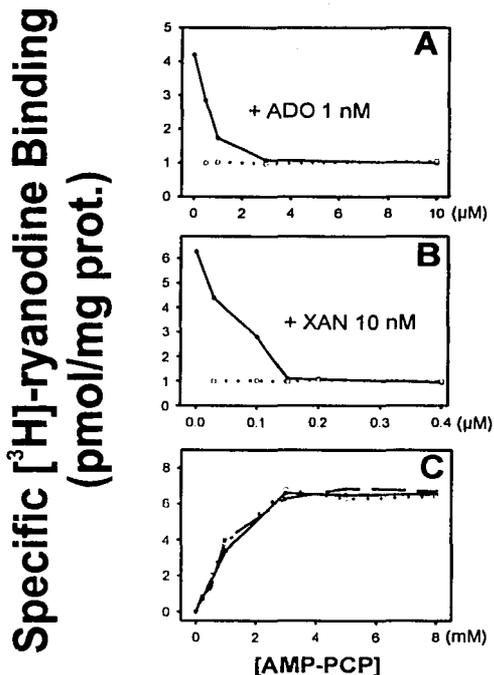


Figure 4. AMP-PCP blocks the increase in $[^3\text{H}]$ -ryanodine binding promoted by adenosine and xanthine. Panels A and B are competition experiments that show the influence of AMP-PCP, at nM- μM range, on $[^3\text{H}]$ -ryanodine binding enhanced by 1 nM adenosine and 10 nM xanthine, respectively. Adenosine and xanthine are depicted as ADO and XAN, respectively. In Panel C, the effect of 1 nM adenosine and 10 nM xanthine on the $[^3\text{H}]$ -ryanodine binding promoted by AMP-PCP at μM -mM range is shown. Heavy SR membranes (10 μg) were incubated for 12-14 h in assay buffer (see experimental section) containing 6 nM $[^3\text{H}]$ -ryanodine and 100 μM of Ca^{2+} . Data are means \pm SEM of at least four independent experiments. α set at $p < 0.05$. Where not shown error bars are smaller than symbols.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AMP-PCP. The cooperativity promoted by AMP-PCP in the [^3H]-ryanodine binding was not affected either (data not shown).

Dipole Moment Calculations

The dipole moment vector (μ) was calculated to gain comprehension about the mechanism by which adenosine and its metabolites activate skeletal muscle RyR. To represent μ graphically, we adopted the standard chemical convention with the vector pointing from the positive to the negative charge¹⁴. The μ orientation and magnitude of each purine are shown in Table 2. The origin of the coordinate system was fixed at the C4 of each purine ring, N9 defines the positive x -axis, C8 is placed in the first quadrant of the xy -plane, and the positive z -axis points perpendicularly up from the xy -plane (paper plane). Only the syn conformers of adenosine and inosine were considered, since they are the predominant forms of these molecules in aqueous solution¹⁴⁻¹⁸.

Figure 5 shows the graphic representation of μ for adenosine and its metabolites. Adenosine and xanthine, the most effective purines in increasing [^3H]-ryanodine binding, presented xy -components of their μ towards the region between C6 and N3. The z -component of μ in xanthine was zero whereas for adenosine was positive (Table 2). In adenine, which was less efficient than adenosine at nM range to activate the RyR, the in-plane component of μ was directed to the same region as xanthine and adenosine (C6 and N3), but due the pyramidal amino group in C6, it presents a negative z -component.

The in-plane components of the dipole vectors in the less effective purines, hypoxanthine, inosine and uric acid, were oriented towards the region limited by C5, N7 and C8. The only one of these purines with a positive z -component was inosine (Table 2).

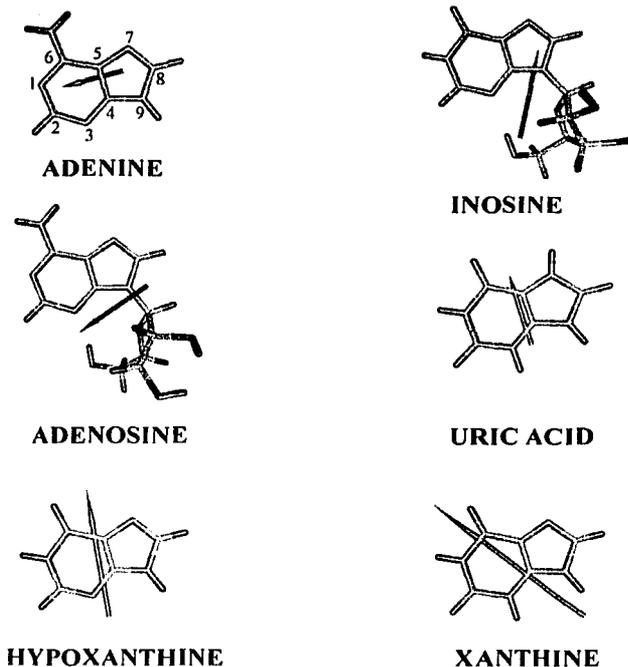


Figure 5. Molecular structures and dipole moment vector (μ) of adenosine and its metabolites. Predominant keto tautomers at pH 7 were calculated by *ab initio* methods (see experimental procedures). The origin of the coordinate system was fixed at C4 of the purine ring, N9 defines the positive *x*-axis, and C8 is placed in the first quadrant of the *xy*-plane, and the positive *z*-axis points perpendicularly up from the *xy*-plane (paper plane). The numbers correspond to the purine atoms. Only the *syn* conformers of adenosine and inosine were taken into account, since they are the favored conformation of nucleosides in aqueous solution.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 2

Calculated dipole moment vector (μ) 3D-components of adenosine and its metabolites. The origin of the coordinate system was fixed at C4 of the purine ring, N9 defines the positive x -axis, and C8 is placed in the first quadrant of the xy -plane, and the positive z -axis points perpendicularly up from the xy -plane (paper plane). The calculation algorithm follows the physical definition of the dipole moment (components reported in this table). In the graphical representation shown in Fig.5 the standard chemical convention is used, the dipole vector points from the positive to the negative charge. As a result, a vector with calculated positive z -component points into the paper, and a vector with calculated negative z -component points out of the paper. All the structures were calculated according to their predominating tautomeric (keto-enol) form at pH 7.

| Metabolite | Binding (times over control) | X | y | z | Polarity (Debyes) |
|--------------------|------------------------------------|-------|-------|-------|----------------------|
| Xanthine | 6.20 | 5.92 | -4.87 | 0.00 | 7.66 |
| Adenosine (syn) | 4.40 | 2.85 | 2.20 | 1.58 | 3.93 |
| Adenine | 2.90 | 2.38 | 0.69 | -0.56 | 2.54 |
| Inosine (syn) | 2.60 | -0.74 | -3.98 | 1.57 | 4.34 |
| Uric Acid | 2.00 | 0.93 | -3.07 | 0.00 | 3.20 |
| Hypoxanthine | 1.70 | 0.92 | -5.53 | 0.00 | 5.60 |

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A positive value of the z -component in the nucleosides, adenosine and inosine, correlated with the presence of the ribose ring in these molecules. The activation of the nucleosides in the [^3H]-ryanodine binding was more efficient than their corresponding sugar-less bases, adenine and hypoxanthine, which presented a negative or a null z -component, respectively.

To explore a potential association between the effectiveness of [^3H]-ryanodine binding modulation by adenosine and its metabolites and the components of their dipole moment vector, a Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) was performed based in the μ values listed in Table 2 and the value of maximum level of activation on [^3H]-ryanodine binding depicted in Figure 1. The QSAR revealed a significant correlation between the x - and z -components and the maximal value of activation of [^3H]-ryanodine binding. The results are summarized in the linear equation:

$$y = 0.763 x + 0.810 z + 1.391$$

Where:

y = Maximal response
 x = x -component of μ
 z = z -component of μ

$r^2 = 0.95$
 $r_{\text{adj}}^2 = 0.92$ (6 observations)
 $F = 28.79$ (significant at the 1.1% level)

r_{adj}^2 , the squared adjusted linear correlation coefficient, is a more convenient and stricter parameter to validate significant results in situations that involve a not very large number of observations¹⁹.

Exclusively the syn conformers of adenosine and inosine were considered for the QSAR analysis. ATP, which modulates the RyR through its deprotonated Mg^{2+} -complex²⁰, was excluded since the QSAR analysis was based solely on the non-ionic form of the

purines, which is the preponderant form of adenosine and its metabolites at physiological pH^{21,22}.

DISCUSSION

Adenosine and its metabolites as modulators for skeletal muscle Ryanodine Receptor

It is well known that RyRs are modulated by purines acting at mM concentrations such as ATP and caffeine^{2,6,23}. Here, for the first time, we report that purines such as adenosine and its metabolites are able to perform a modulating role but at nM- μ M range. The increase in [³H]-ryanodine binding elicited by adenosine and its metabolites did not show a simple pattern (Figure 1). The existence in all cases of a maximum in the RyR activation, strongly suggests the presence of purine recognition sites with high and low affinity sites, for [³H]-ryanodine binding activation and inhibition, respectively.

The importance of the ribose moiety in the effect of adenosine and inosine was evident when the action of these nucleosides on [³H]-ryanodine binding were compared with the effect promoted by adenine and hypoxanthine, and also when they were mixed with ribose (Figure 2). These data indicate that the presence within the molecule of a β -glycosidic bond is necessary to elicit a full response. It is probable that the β -glycosidic bond between the purine and the ribose ring permits the correct orientation of both moieties to interact in a more effective way with the RyR. The relevance of the ribose moiety could be extended to other kind of interactions since the brain RyR appears to require the oxidation of the ribose moiety to achieve a higher activation of [³H]-ryanodine binding⁷.

Adenosine and its metabolites increased [³H]-ryanodine binding without changing the calcium sensitivity of RyR (Figure 3). This result makes the effect of adenosine and its metabolites different to that of caffeine. We do not know if adenosine and its metabolites

are recognized at the same binding sites as AMP-PCP in the RyR structure. However, as adenosine and its metabolites increased the [^3H]-ryanodine binding affinity through the same mechanism as the nucleotide (enhancing the association rate constant, Table 1), it is possible that adenosine and its metabolites could be recognizing the same binding sites that AMP-PCP (ATP). Another possibility is the existence of separate, but interacting, binding sites for ATP and adenosine and its metabolites. Data in Figure 4 show that AMP-PCP in μM and sub- μM concentrations inhibits the increase of [^3H]-ryanodine binding promoted by adenosine and xanthine. The action exerted by AMP-PCP is unexpected since no effect on RyR has been reported for AMP-PCP or ATP in concentrations below the mM range. Two possible interpretations of this result are: 1) AMP-PCP competes directly with adenosine and xanthine at their binding sites, or 2) there is a high affinity binding site for AMP-PCP that is modulating the affinity of adenosine and xanthine binding sites. In both possibilities the molecular structure of the purine modulator is a relevant factor since the AMP-PCP was 11 times more effective to inhibit the increase of [^3H]-ryanodine binding promoted by xanthine than the one promoted by adenosine. Further experiments should be made to investigate this point.

Eight ATP binding domains (Gly-loops) are found in each monomer of RyR type 1 according to the primary structure of this Ca^{2+} release channel²⁴. The crystallized structure of this motif was resolved for the protein kinase A²⁵, but nothing is known about the accessibility, folding or 3D-structure of these ATP binding domains in the RyR type 1. Shoshan-Barmatz's group has reported that skeletal muscle²⁶ and brain²⁷ RyR bind the ATP analog O-(4-benzoyl)benzoyl ATP with a stoichiometry of 1:1. This number is in contrast with the potential 32 different sites for ATP that are present in the amino acid sequence of

the RyR. This group reported that adenosine was able to antagonize the binding of the ATP analog to the skeletal muscle RyR, suggesting that both molecules could be bound to the same site²⁴.

Using a comparative molecular field analysis (COMFA), Chan *et al.* reported that among the structural factors determining the ability of ATP to activate the cardiac RyR, is the large electrostatic field in the vicinity of the ionized phosphate groups¹¹. According to these authors, adenosine tested at mM concentration activates the cardiac RyR with lower efficacy than ATP since the strength of the field is reduced by the absence of the phosphate groups. They also observed that steric interactions between the cardiac RyR and the α -phosphate and ribose moieties are correlated with the open probability of the receptor. For several reasons, we cannot compare directly the results obtained by Chan *et al.* with the findings of this work: 1) They did not use skeletal muscle RyR as subject for their study; 2) all the purine tested were used in mM range and 3) unitary activity for channels incorporated in bilayers was used to determine the RyR activity. However, it is interesting that our results confirm the discrimination between the caffeine and adenine nucleotide sites in skeletal muscle RyR by adenosine reported previously in cardiac RyR²⁸.

Role of the dipole moment vector in the modulation of the RyR by adenosine and its metabolites

The way in which a molecule with ligand properties, orientates in the electric field of a receptor binding site, is a fundamental factor that governs the recognition between these two entities. The QSAR analysis strongly suggests the importance of the x - and z -components of the dipole moment vector in the modulatory action of adenosine and its metabolites on skeletal muscle RyR. These μ components could be related to the optimal

orientation of the purine modulators to achieve the RyR activation. The results imply that the μ vector of the most effective modulators of [^3H]-ryanodine binding such as adenosine, xanthine, inosine and adenine, is mainly directed towards the purine ring, but also with an important component orientated out of the purine plane.

The activation of [^3H]-ryanodine binding by adenosine and its metabolites, depends on all components of the dipole moment vector. A change in the value of one of these components may be fully or partially compensated by a change in other different component. For example, the large value of the x -component in xanthine, the most effective purine to increase [^3H]-ryanodine binding, compensates the complete lack of a z -component. In comparison, the x -component of adenosine is smaller ~ 3 debyes compared to the one of xanthine. However, an increment of ~ 1.6 debyes in the positive z -component of adenosine compensates the reduction in the x -component, resulting in that the maximal [^3H]-ryanodine binding promoted by adenosine was only 29% smaller than the response of xanthine. Adenine, as adenosine, presented a reduction in its x -component (~ 3.5 debyes), but because of a negative value for its z -component, its maximal [^3H]-ryanodine binding was 50% lower. For hypoxanthine and uric acid, the smaller values of their x -components did not compensate the lack of a z -component, and their maximal [^3H]-ryanodine binding were only 30% of that promoted by xanthine. However, inosine also with an unfavorable x -component presents a compensating positive z -component, and its maximal [^3H]-ryanodine binding was 12% higher than the ones of hypoxanthine and uric acid.

The ribose ring in the nucleosides, adenosine and inosine, is important to confer a positive value to the z -component of the dipolar moment vector (Table 2). However, it also could be involved in some other interactions (i.e. through its $-\text{OH}$ groups) which may

enhance the activation of the RyR. This is coincident with the fact that the alteration of the ribose ring i.e. oxidation in diadenosine polyphosphates derivatives, produced a higher activation of the cerebral RyR than the non oxidized derivatives⁷.

In summary, adenosine and its metabolites are purine derivatives that positively stimulates the [³H]-ryanodine binding and therefore the activity of the skeletal muscle RyR. This activation correlated significantly with the x and z components of the calculated dipole moment vector, suggesting that the purine orientation in the electric field at the binding site(s) is a feature involved in the optimal activation of the RyR by these purine derivatives. The results are also consistent with the idea that the RyR binding sites for adenosine and its metabolites could be the same as those for ATP.

EXPERIMENTAL

Materials. Adenosine, adenine, inosine, hypoxanthine, xanthine, uric acid, caffeine and EGTA were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Ryanodine and adenosine-5'-(β,γ -methylene)-triphosphate lithium (AMP-PCP) were purchased from Calbiochem (San Diego, CA.) and [³H]-ryanodine (82 Ci/mmol) was from Dupont, (Wilmington, DE). Other chemicals used were of the best quality available.

Sarcoplasmic Reticulum (SR) Fraction. Heavy sarcoplasmic reticulum (SR) membrane fraction was isolated from fast twitch skeletal muscle from the back and hindlegs of 4 kg rabbits (New Zealand), according to Hamilton et al.¹². The RyR enriched fraction collected at the 35-40% sucrose interface was suspended to a final concentration of about 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in a buffer containing 10% sucrose, 0.1 M KCl, and 10 mM MOPS (pH 7.4), and stored at -70°C. Protein concentration was determined by the method of Lowry et al.²⁹, using BSA as standard.

Radioligand Binding Studies. Equilibrium [^3H]-ryanodine binding was performed following the methodology described by Chu et al.⁹. Heavy SR membranes (10 μg) were incubated with 6 nM [^3H]-ryanodine for 12-14 h at room temperature in 0.25 ml of binding buffer containing 20 mM MOPS (pH 7.4), 300 mM KCl, 100 μM CaCl_2 , 100 $\mu\text{g/ml}$ bovine serum albumin, and variable concentrations of the modulators. When necessary, free calcium levels were adjusted in presence of 1 mM EGTA as calculated with the program CHELATOR³⁰. Non-specific binding was defined in the presence of 20 μM unlabeled ryanodine. Samples were filtered through Whatman GF/F glass fiber filters using a multifilter apparatus (Brandel, Gaithersburg, MD). Filters were washed with five 5 ml aliquots of cold 300 mM KCl and counted in a scintillation spectrometer after the addition of 10 ml scintillation liquid (Tritosol).

Binding data analysis. The effect of calcium concentration on [^3H]-ryanodine binding in the presence or absence of compounds tested was analyzed applying the Hill equation. B_{max} and K_d were estimated directly from binding isotherms³¹.

[^3H]-ryanodine association kinetics. The protocol followed was the reported previously by Chu et al.⁹. Briefly, heavy SR vesicles (100 μg of protein with ~ 15 pmol/mg of [^3H]-ryanodine binding sites) were added to [^3H]-ryanodine (7 nM), binding buffer, and 0.1 mg BSA, at room temperature, in 0.3 M KCl, 20 mM MOPS (pH 7.0), in the presence of the indicated modulators (see Figure 1). At 15 min intervals, 300 μl aliquots were filtered, washed, and processed for radioactivity, as described above. Equilibrium values were obtained at 8 h. An association plot of $\ln \text{Beq}/(\text{Beq}-B)$ vs. time was analyzed, where Beq and B are the amounts of [^3H]-ryanodine bound at equilibrium and time t , respectively. The observed $K_{\text{a}1}$ was derived from the slope. Association curves where the amount of

[³H]-ryanodine bound at equilibrium exceeded 5% of the [³H]-ryanodine added were discarded.

Statistics. All results were expressed as mean \pm SEM. The significance of the differences among groups was assessed by two-way ANOVA test followed by a Tukey multiple comparisons post hoc test with α set at $p < 0.05$.

Dipole Moment Calculations. Dipole moments were calculated theoretically^{32,33}. A preliminary geometry of each purine derivative was obtained using the molecular mechanics program PCMODEL 4.0 (Serena Software, Bloomington, IN). The resulting geometries were optimized with the quantum mechanical, *ab initio*, all electron, restricted hartree-fock method, RHF, with the 6-31G* basis set. This level of theory has been found to predict quite accurately the experimental geometries and very reasonable charge distributions^{32,33}. The calculations were carried out with the program package PC GAMESS Ver. 6.1^{34,35}.

The calculated dipole vectors were visualized with the program package gOpenMol 2.1³⁶. All molecules were aligned in the same way in the graph to facilitate the analysis.

All structures were calculated in their keto form, which is the predominant neutral tautomer at pH 7^{21,22}.

Combining the theoretical information derived from the calculations of dipole moments and the biochemical binding experiments for each purine, a Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) was determined. The aim of this kind of analysis is to find a quantitative relationship between the activity of different related compounds with some of their structural features through a multiple regression analysis and an analysis of variance (ANOVA)³⁷. The analysis was performed with the programmed Microsoft Excel worksheet

QSARDEMO built from the multilinear regression and ANOVA tool included in Microsoft Excel. The sheet is available upon request from the author, Dr. G. Hójer, Departamento de Física y Química Teórica, Facultad de Química. UNAM., Cd. Universitaria, 04510. México D. F.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Drs. Ataulfo Martínez and Manuel Aguilar for their critical review of the manuscript. We are also grateful to Lic. in Nut. Fernando López-Barrera and Biol. Olivia Vázquez-Martínez for helping to prepare the artistic design of the figures. This research was partially supported by a grant from DGAPA (IN 200-500). A.B.O. was a fellow from CONACyT and DGEP.

REFERENCES

1. Fleisher, S.; Inui, M. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1989, 18, 333.
2. Rousseau, E.; LA Dine, Q.; Meissner, G. *Arch. Biochem. Biophys.* 1988, 15, 75.
3. Smith, J.; Imagawa, T.; Ma, J.; Fill, M.; Campbell, K.P.; Coronado, R. *J. Gen. Physiol.* 1988, 92, 1.
4. Seryseva, I.; Schatz, M.; van Heel, M.; Chiu, W.; Hamilton, S. *Biophys. J.* 1999, 77, 1936.
5. Takeshima, H.; Nashimura, S.; Matsumoto, T.; Ishida, H.; Kangawa, K.; Minamino, N.; Matsuo, H.; Ueda, M.; Hanaoka, M.; Hirose, T.; Numa, S. *Nature.* 1989, 339, 439.
6. Pessah, I.; Stambuk, R.A.; Casida, J. *Mol. Pharmacol.* 1987, 31, 232.
7. Holden, C.P.; Padua, R.A.; Geiger, J.D. *J. Neurochem.* 1996, 67, 574.
8. Morii, H.; Makinose, M. *Eur. J. Biochem.* 1992, 205, 979.
9. Chu, A.; Díaz-Muñoz, M.; Hawkes, M.J.; Brush, K.; Hamilton, S.L. *Mol. Pharmacol.*

- 1990, 37, 735.
10. Meissner, G. *J. Biol. Chem.* 1984, 259, 2365.
 11. Chan, W.M.; Welch, W.; Sitsapesan, R. *British J. Pharmacol.* 2000, 130, 1618.
 12. Hamilton, S.L.; Mejia, R.; Fill, M.; Hawkes, M.J.; Brush, K.; Schilling, W.P.; Stefani, E. *Anal. Biochem.* 1989, 183, 31.
 13. Antaramián, A.; Butanda-Ochoa, A.; Vázquez-Martínez, O.; Vaca, L. *Cell Calcium.* 2001, 30, 9.
 14. Solomons, T.W.G. In *Organic Chemistry*; Ed. John Wiley and Sons: New York, pp. 39-40.
 15. Hruska, S.; Danyluk, S.S. *J. Am. Chem. Soc.* 1968, 90, 3266.
 16. Rao, S.T.; Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1970, 92, 4963.
 17. Altona, C.; Sundaralingam, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1972, 94, 8205.
 18. Olsson, R.A. In *Proceedings of the International Symposium on Adenosine*, Berne, R.M.; Rall, Th. W.; Rubio, R. Eds. Martinus Nijhoff Publishers: Charlottesville, Virginia, 1982, pp. 33-47.
 19. Liu, S.S.; Yin, C.S.; Wang, L.S. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2002, 42, 749.
 20. Rosseau, E.; Pinkos, J.; Saravia, D. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1992, 70, 394.
 21. Chenon, M.Th.; Pugmire, R.J.; Grant, D.M.; Panzica, R.P.; Townsend, L.B. *J. Am. Chem. Soc.* 1975, 97, 4636.
 22. Lange, N.A.; Dean, J.A. In *Lange's handbook of chemistry*. Ed. McGraw-Hill Book Co.: New York, 1985; pp. 5.19-5.61.
 23. Bhat, M.B.; Zhao, J.; Zang, W.; Balke, C.W.; Takeshima, H.; Wier, W.G.; Ma, J. *J. Gen. Physiol.* 1997, 110, 749.
 24. Du, G.G.; Oyamada, H.; Khanna, V.K.; MacLennan D.H. *Biochem. J.* 2001, 360: 97.

25. Knighton, D.R.; Zheng, J.; Eyek, L.F.T.; Ashford, V.A.; Xuong N.; Taylor, S.S.; Sowadski, J.M. *Science*. 1991, 253, 407.
26. Zarka, A., Shoshan-Barmatz, V. *Eur. J. Biochem.* 1993, 213, 147.
27. Hadad, N.; Martin, C.; Ashley, R.H.; Shosan-Barmatz, V. *FEBS Lett.* 1999, 455, 251.
28. McGarry, S. J.; Williams, A. J. *J. Membr. Biol.* 1994, 137: 169177.
29. Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.L. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265.
30. Shoenmakers, T.J.M.; Visser, G.J.; Flik, G.; Theuvenet, A.P.R. *Biotechniques*. 1992, 12, 870.
31. Weiland, G.A.; Molinoff, P.B. *Life Sci.* 1981, 29, 313.
32. Leach A.R. In *Molecular modeling principles and applications*. Ed. Longman: Essex, England, 1996; 595 pp.
33. Jensen, F. In *Introduction to Computational Chemistry*. Ed. John Wiley and Sons. New York. 1999, 429 pp.
34. Schmidt, M.W.; Baldrige, K.K.; Boatz, J.A.; Elbert, S.T.; Gordon, M.S.; Jensen, J.J.; Kodeki, S.; Matsunaga, N.; Nguyen, K.A.; Su, S.; Windus, T.L.; Dupuis, M. *J. Comput. Chem.* 1993, 14, 1347.
35. Granovsky, A.A. <http://www.clasic.chem.msu.su/gran/games/index.html>
36. Laaksonen, L. <http://www.csc.fi/laaksonen/gopenmol/>
37. Hansch, C.; Fujita, T. *J. Am. Chem. Soc.* 68, 1616.

APÉNDICE B

(Bases para el cálculo teórico)

El μ para un sistema polielectrónico como la adenosina o cada uno de sus metabolitos, se puede calcular teóricamente una vez que se conoce la función de onda Ψ . Ésta contiene toda la información del sistema y se obtiene resolviendo la ecuación de Schrödinger.

$$\hat{H}(1, \dots, n) \Psi_k(1, \dots, n) = E_k \Psi_k(1, \dots, n) \quad k=0,1,2, \dots$$

Esta ecuación es de un tipo conocido como de valores propios. El estado basal del sistema corresponde a la solución Ψ_0 de menor energía E_0 . Una propiedad representada por el operador \hat{O} que se calcula de la siguiente manera:

$$\langle \hat{O} \rangle = \int \Psi^* \hat{O} \Psi \, d\tau \quad ; \quad \int \Psi^* \Psi \, d\tau = 1$$

En nuestro caso \hat{O} sería el operador vectorial del momento dipolar (μ). La ecuación de Schrödinger sólo ha sido resuelta exactamente para el átomo del nitrógeno.

En lugar de buscar la solución exacta, se busca la mejor solución aproximada aplicando el principio variacional (P. V.) (Levine 1991; Jensen, 1999), el cual establece que para un sistema cuyo operador hamiltoniano (\hat{H}) es independiente del tiempo y cuyo eigenvalor de menor energía es E_0 , si Ψ_{aprox} es cualquier función (normalizada) de las coordenadas del sistema de partículas tal que satisface las condiciones a la frontera, entonces el valor esperado para dicho \hat{H} es mayor o igual a la energía del estado fundamental:

$$E_{\text{aprox}} = \langle \hat{H} \rangle = \int (\Psi_{\text{aprox}})^* \hat{H} \Psi_{\text{aprox}} \, d\tau \geq E_0$$

$$\int (\Psi_{\text{aprox}})^* \Psi_{\text{aprox}} \, d\tau = 1$$

es decir, que a partir del P. V. se obtiene un valor superior al valor de la energía del estado fundamental del sistema (E_0). Para ello, basta hacer que Ψ_{aprox} dependa de un conjunto de parámetros y obtener el valor mínimo esperado de \hat{H} respecto a ellos. Este procedimiento dará el valor óptimo de dichos parámetros y la estimación de la energía (en este caso la E_0) buscado para una función del tipo propuesto. Utilizando una Ψ_{aprox} más flexible se obtiene una E_{aprox} de menor valor y una mejor descripción del sistema.

Ahora bien, el P. V. establece que es posible obtener una Ψ_{aprox} , que en el caso ideal es igual a la función de onda real o del estado fundamental (Ψ_0). Entonces si se escoge un conjunto ortonormal de funciones monoeléctricas es posible construir una Ψ_{aprox} conocida como el Determinante de Slater:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$\Psi_{\text{aprox.}(1,\dots,n)} = 1/\sqrt{n!} \begin{vmatrix} \Phi_{k1}(1) & \dots & \Phi_{k1}(n) \\ \vdots & & \vdots \\ \Phi_{kn}(1) & \dots & \Phi_{kn}(n) \end{vmatrix} \quad (\text{Determinante de Slater})$$

Esta función es la aproximación más sencilla que cumple con el principio de antisimetría de Pauli, que es un requisito fundamental. Aplicando el P.V. a esta función aproximada se obtienen las ecuaciones de Hartree-Fock (HF):

$$\underbrace{\hbar^2(1)\Phi_i(1)}_{\text{Energía Cinética del electrón en el orbital } i} + \underbrace{\sum_{j=1}^n [\Phi_j(1) \int (1/r_{12}) \Phi_j^*(2) \Phi_j(2) d\tau_2 - \Phi_j(1) \int (1/r_{12}) \Phi_j^*(2) \Phi_i(2) d\tau_2]}_{\text{Energía Potencial promedio de repulsión entre el electrón en el orbital } i \text{ y los demás electrones}} = \underbrace{\epsilon_i \Phi_i(1)}_{\text{Energía del electrón en el orbital } i}$$

Estas ecuaciones, que son del tipo de Schrödinger, están acopladas para n orbitales Φ_i y se resuelven a través de ciclos iterativos. De esta manera, las ecuaciones HF presentan una forma similar a la ecuación de onda, pero cada una describe a un sólo electrón en el campo promedio de los demás electrones en la molécula.

Si el sistema es un átomo, las funciones Φ_i se denominan orbitales atómicos (OA) y en el caso molecular se les llama orbitales moleculares (OM).

Cuando se calculan todas las integrales de HF, se dice que se ha aplicado un método de cálculo "*ab initio*" y cuando algunas de estas integrales son sustituidas por valores obtenidos experimentalmente, entonces el tipo de cálculo se conoce como "semimpiórico".

Utilizando orbitales Φ_i flexibles en el método HF *ab initio* se obtiene una muy buena aproximación a E_0 y las propiedades como el momento dipolar, se estiman muy razonablemente. Fue precisamente esta metodología la que se utilizó para calcular el momento dipolar de la adenosina y sus metabolitos.

FALTA DE ORIGEN
PARA CON