

6  
2Ej.



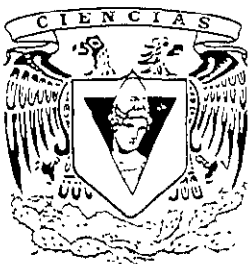
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO.

FACULTAD DE CIENCIAS

Caracterización del Receptor de Ryanodina (Canal  
liberador de  $Ca^{2+}$ ) por Microscopía de Fuerza  
Atómica.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
ALVAREZ PEREZ MARCO ANTONIO



DIRECTOR DE TESIS: DR. MAURICIO DIAZ MUÑOS  
M. EN C. OCTAVIO ALVAREZ FREGOSO

1999

27/11/06

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Banule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
"Caracterización del Receptor de Ryanodina (Canal Liberador de  $Ca^{2+}$ )  
por Microscopía de Fuerza Atómica".

realizado por Alvarez Pérez Marco Antonio

con número de cuenta 9028855-7 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
 Propietario  Dr. Mauricio Díaz Muñoz *M Díaz M*  
 Propietario  M. en C. Octavio Alvarez Fregoso *[Firma]*  
 Propietario  Biol. Miguel Angel Palomino Garibay *[Firma]*  
 Suplente  Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez *Luis Vaca*  
 Suplente  IBQ. María Cristina Trejo Solís *M Cristina Trejo* FACULTAD DE CIENCIAS  
 U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología  
*Edna María Suárez Díaz*  
 Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

## Dedico este trabajo:

A mis padres (Octavio y Esperanza) por creer en mi y apoyarme en los momentos más difíciles de un humano que apenas empieza a decidir su futuro.

A mis queridos hermanos (Rosa y Titino Jones) por estar siempre compartiendo nuevas e interrogantes aventuras conmigo.

A mis abuelos que me han enseñado muchas de las cosas por las cuales verdaderamente hay que luchar

Manifiesto mi más sincero agradecimiento:

Al Dr. Mauricio Díaz Muños por su apoyo y disposición para dirigir este trabajo. Además por sus conocimientos y acertados comentarios de constante motivación que contribuyeron al desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Dr. Jaime Ortiz López de la Escuela Superior de Física y Matemáticas del IPN, le deseo rendir un merecido reconocimiento por permitirme y darme las facilidades para utilizar el equipo (Microscopio de Fuerza Atómica) así como a la M. en C. Gabriela Rueda Morales por su apoyo y disposición entusiasta y llena de alegría en la realización de los experimentos.

Al Biol. Rogelio Frago Soriano por su amistad y asesoría en el procesamiento de las imágenes obtenidas de los experimentos de MFA.

Al Quím. Armando Butanda Ochoa por su sincera amistad y por su apoyo hasta en los más difíciles momentos.

Al Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez por darse tiempo de revisar concienzudamente esta tesis pese a su apretada agenda de trabajo, por sus valiosos consejos y aclaraciones en varios puntos oscuros tanto del contenido de esta tesis como del olvidado español bien escrito.

Al Programa de Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (PROBETEL) por su apoyo económico para la realización de este trabajo.

A todos aquellos que no aparecen en estos agradecimientos pero que participaron de una u otra manera en la realización de esta tesis.

# INDICE

<b>INTRODUCCION</b>	1
El Calcio como Mensajero Intracelular	2
El Receptor de Ryanodina (RyR)	4
Papel del RyR en el Acople Excitación-Constracción	6
Estudios de Alta Resolución del RyR	10
Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)	13
Principio de Operación	13
Modalidad de Contacto	16
Resolución Espacial	18
Resolución Temporal	19
Aplicaciones en el Area Biológica	20
<b>HIPOTESIS</b>	23
<b>OBJETIVOS</b>	25
<b>METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b>	27
Reactivos	28
Métodos	29
Obtención del Músculo Esqueletico Rápido	29
Procedimiento para Aislamiento del Retículo Sarcoplásmico Pesado (RSP)	29

Determinación de la Concentración de Proteína de la Fracción Aislada	30
Preparación de Muestra y Proceso de Imagen por MFA	31
<b>RESULTADOS</b>	32
Substratos de Mica, Vidrio, Cuarzo Amorfo y Monocristal de Silicio	33
Exploración de la Membrana de RS depositada en Substratos de Silicio Monocristalino	37
Caracterización Estructural y de los Cambios Conformacionales del RyR	40
<b>DISCUSION</b>	44
<b>CONCLUSION</b>	48
<b>PERSPECTIVAS</b>	50
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	52

## El Calcio como Mensajero Intracelular.

En décadas recientes, el  $\text{Ca}^{2+}$  ha ido ganando relevancia como un agente regulador intracelular ubicuo y muy importante, así como por ser uno de los mensajeros que relaciona las respuestas intracelulares con las señales extracelulares transducidas por la membrana plasmática y sus receptores. Entre las muchas funciones reguladas o desencadenadas por la elevación de los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  se incluyen: La liberación de transmisores sinápticos, la contracción muscular, la motilidad citoplásmica, la división celular, etc..

Existen tres reservorios importantes para el  $\text{Ca}^{2+}$ . El espacio extracelular, el citoplásmico y los depósitos intracelulares como el retículo endoplásmico (RE), el retículo sarcoplásmico (RS) y las mitocondrias

El incremento de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol sigue diversos mecanismos, a continuación se abordarán los más importantes.

En células no excitables tales como glóbulos rojos, hepatocitos y endotelios, las señales de  $\text{Ca}^{2+}$  siguen la vía del inositol (1,4,5)-trifosfato ( $\text{InsP}_3$ ). En esta vía se encuentran involucrados dos clases de receptores, los acoplados a proteínas G y los receptores de tirosina cinasas (RTC). Las proteínas G activan a las fosfolipasas  $\text{C}\beta$  ( $\text{PLC}\beta$ ), mientras que los RTC estimulan a las fosfolipasas  $\text{C}\gamma$  ( $\text{PLC}\gamma$ ) para convertir el fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato ( $\text{PtdInsP}_2$ ) en  $\text{InsP}_3$  y diacilglicerol. El  $\text{InsP}_3$  actúa como un segundo mensajero intracelular que al unirse al receptor de inositol (1,4,5)-trifosfato ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) localizado en la membrana del RE libera calcio hacia el citosol.

El  $\text{Ca}^{2+}$  puede también penetrar al citoplasma en las células no excitables atravesando la membrana plasmática a través de canales independientes de voltaje.

Otro factor que participa en el control del  $\text{Ca}^{2+}$  celular son las denominadas bombas metabólicas conocidas como ATPasas, que transportan los iones  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el RE (SERCA) o al espacio extracelular (PMCA) con un gasto de energía de 1 a 2 ATPs por ión  $\text{Ca}^{2+}$  removido

Por otro lado, en las células excitables como las neuronas, el ión  $\text{Ca}^{2+}$  entra a través de canales dependientes de voltaje que activan directamente al receptor de ryanodina (RyR), que libera  $\text{Ca}^{2+}$  desde pozas intracelulares como el RS, permitiendo que estas células incrementen el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico.

En músculo esquelético el mecanismo es más especializado y será abordado más adelante en el papel del RyR en el acople excitación-contracción que se lleva a cabo en músculo, por ser parte fundamental de esta tesis

Estos mecanismos que conforman la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular pueden ilustrarse con el esquema siguiente (Fig. 1, Clapham, 1995)



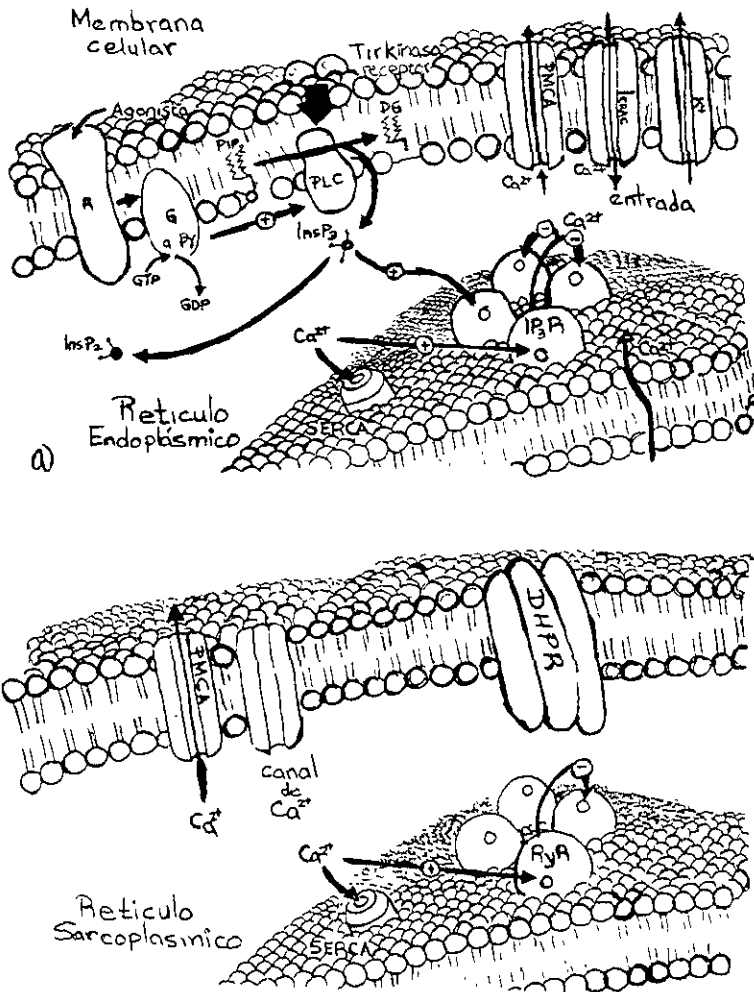


FIG. 1 (A) Señales de calcio en células no excitables. Las abreviaturas corresponden a R, receptor; G, proteína G; PLC, fosfolipasa C; InsP<sub>3</sub>, inositol 1,4,5-trifosfato; GTP, trifosfato de guanósina; GDP, difosfato de guanósina; DG, diacilglicerol; PMCA, bomba ATPasa de calcio de la membrana plasmática; I<sub>Ca</sub>, activación de la liberación de calcio por corriente; K, canales selectivos a potasio; IP<sub>3</sub>R, receptor de inositol. SERCA, bomba ATPasa de calcio de retículo sarcoplásmico de músculo. El signo positivo indica estimulación y el signo negativo indica inhibición. (B) Señales de calcio en células excitables. El sistema descrito en (A) coexiste con la presencia del sistema de muchas células excitables. Ca<sub>v</sub>, indica canales de calcio dependientes de voltaje; RyR, receptor a ryanodina (sensible a calcio). DHPR, receptor a dihidropiridinas.

## El Receptor de Ryanodina .

Ya se ha mencionado la importancia del  $Ca^{2+}$  como mensajero intracelular, ahora es necesario analizar al receptor de ryanodina (RyR) que está involucrado en la actividad muscular y en general en el control de la homeostasis intracelular del  $Ca^{2+}$ .

El RyR, recibe su nombre debido a la gran afinidad que presenta por un alcaloide la ryanodina (Ryanodol 3-[1H-pirrol-2-carboxilato], figura 2) que se extrae de la *Ryania speciosa*, un árbol originario de la región tropical del continente americano (Franzini-Armstrong, 1997). Este alcaloide es soluble en agua, etanol y cloroformo y es prácticamente insoluble en benceno y éter de petróleo (Index Merck, 1989). La ryanodina fue aislada por E.F. Rogers en 1948 y su estructura determinada en 1965 por Rabbín y Santroch.

El RyR funciona como un canal liberador de calcio ubicado en el retículo endo(sarco)plásmico (RS) del músculo esquelético y otros tejidos. El RyR del músculo esquelético, es una proteína con estructura homotetramérica de muy alto peso molecular (450-560 kDa) por subunidad cuya estructura primaria consta de 5037 aminoácidos.

En el músculo esquelético, la parte  $NH_2$ -terminal del RyR se proyecta al citoplasma como una estructura similar a un cuadrado, extendiéndose hacia las membranas de los túbulos T donde se localizan los receptores a dihidropiridinas (DHPR) que actúan como sensores de voltaje (Saito *et al.*, 1984)

Por estudios de su estructura primaria, algunos autores sugieren que el dominio transmembranal del RyR consta de cuatro segmentos que atraviesan la membrana (Takehima *et al.*, 1989 y Hakamata *et al.*, 1992), y otros postulan que son al menos diez (Sorrentino y Volpe, 1993 y Serisheva *et al.*, 1995) En estos segmentos se localiza el poro por donde permean los iones  $Ca^{2+}$ . Ambas posturas ubican estos segmentos transmembranales hacia el extremo carboxilo terminal del RyR (Figura 3).

Por medio de técnicas de biología molecular se ha demostrado que la distribución del RyR es tejido específica. La isoforma RyR1 se expresa principalmente en músculo esquelético, en algunas partes del cerebro, más prominentemente en las células de Purkinje, en esófago y algunos músculos lisos. La isoforma RyR2 es una forma predominante en músculo cardíaco y también la más extensamente distribuida en cerebro. La isoforma RyR3 se expresa pobremente en cerebro y es considerada la de menor expresión de las tres, pero es ubicua en muchos tejidos (Sutko *et al.*, 1996).

En músculos de vertebrados no mamíferos como son aves, anfibios, reptiles y peces, existen dos isoformas del RyR inicialmente llamadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Estudios moleculares demostraron que la isoforma  $\beta$  del músculo esquelético de pollo y rana es equivalente a la isoforma RyR3, mientras que la isoforma  $\alpha$  es reconocida como homóloga del RyR1 (Coronado *et al.*, 1994) En lo sucesivo, se hará referencia simplemente como RyR, ya que no obstante de las diferencias, todos los RyRs muestran propiedades similares.

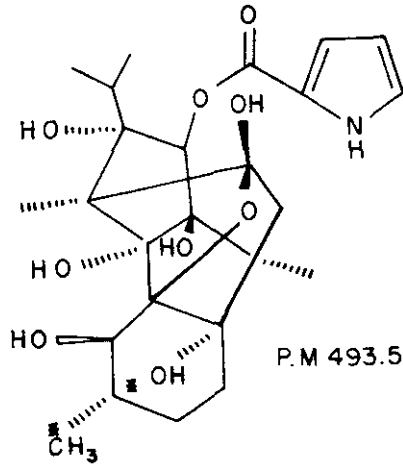


Fig.2. Estructura molecular del alcaloide que da el nombre al RyR la ryanodina. Los asteriscos indican la posición en donde se sustituyen los átomos de hidrógeno por átomos de tritio.

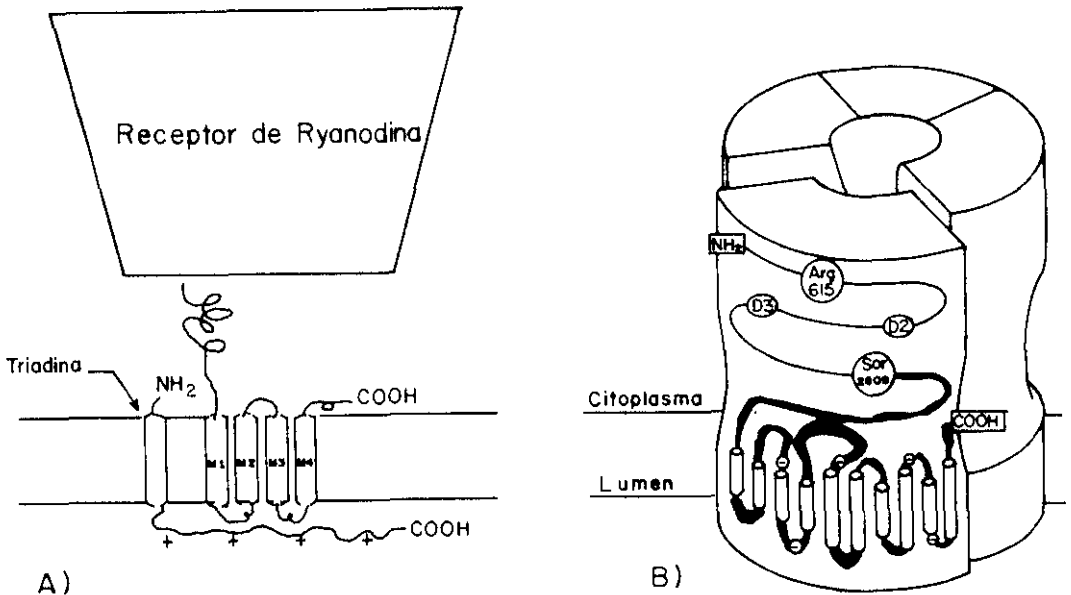


Fig.3 Esquema del canal liberador de calcio (RyR). El número de segmentos es tentativo aún. A) Se postulan 4 segmentos y en B) se postulan 10 segmentos que atraviezan la membrana. La Ser 2809 es el único sitio de fosforilación en el RyR cardíaco

La caracterización de la actividad del canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS por medio de técnicas electrofisiológicas ha demostrado que el RyR puede modularse tanto positiva como negativamente por una gran variedad de agentes con importancia farmacológica y/o fisiológica, lista que año con año se incrementa (Ashley *et al.*, 1991).

El calcio en el rango nanomolar (nM) y los nucleótidos de adenina, poliaminas y esfingosinas, en concentraciones milimolares (mM) han mostrado ser activadores fisiológicos. Mientras que la cafeína, doxorubicina y agentes tiol, a concentraciones milimolares (mM) son activadores farmacológicos.

El calcio a concentraciones micromolares ( $\mu\text{M}$ ), el  $\text{Mg}^{2+}$  y la calmodulina en concentraciones milimolares (mM) son inhibidores fisiológicos. Algunos inhibidores farmacológicos incluyen al rojo de rutenio, el dantroleno, la neomicina, entre otros.

Dentro de la modulación del RyR, es esencial mencionar que el alcaloide ryanodina ejerce un efecto complejo sobre el receptor. Concentraciones de 10 a 50 nM activan al canal. Concentraciones de 10 a 300  $\mu\text{M}$  provocan una inhibición (cierre) del canal. Y si se utilizan concentraciones intermedias a las ya descritas, se observa un estado intermedio de conductancia (Fleisher e Inui, 1989).

En 1990, Chu *et al.* y Pessah *et al.*, 1987, demostraron que la unión específica de la [ $^3\text{H}$ ]Ryanodina sirve como una prueba del estado funcional del RyR, de tal manera que, el trabajar a concentraciones alrededor de la constante de disociación ( $K_d = 10$  nM), permite determinar el efecto de activadores o inhibidores del canal por métodos bioquímicos, sin necesidad de medir directamente la actividad eléctrica del RyR.

### **Papel del RyR en el Acople Excitación-Constracción.**

El RyR es el responsable de la liberación rápida de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el proceso de acople excitación-contracción (E-C) en el músculo. Dicha contracción se induce por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RS después de la despolarización que sufre la membrana de los túbulos transversos (Orlova *et al.*, 1997). Este proceso se lleva a cabo cuando una señal eléctrica llega a las inervaciones del nervio en el músculo (placa neuromuscular), provocando la liberación de un neurotransmisor (acetilcolina), que es reconocido por su receptor nicotínico permeable al sodio, ubicado en la membrana plasmática. Esto trae consigo una movilización de iones  $\text{Na}^+$  a través de este canal y posteriormente una despolarización provocando la activación de diferentes canales de sodio sensibles a voltaje, ubicados a lo largo de la membrana.

Posteriormente, ocurre una hiperpolarización mediante la introducción de iones  $\text{K}^+$  al interior celular por canales de  $\text{K}^+$  selectivos. Este intercambio de iones genera un potencial de acción que se propaga por el sarcolema hasta las invaginaciones de los túbulos T, que presentan una gran abundancia de canales de calcio denominados receptores a dihidropiridinas (DHPR), los cuales funcionan como sensores de voltaje en el músculo esquelético (Fig. 4; Block *et al.*, 1988)

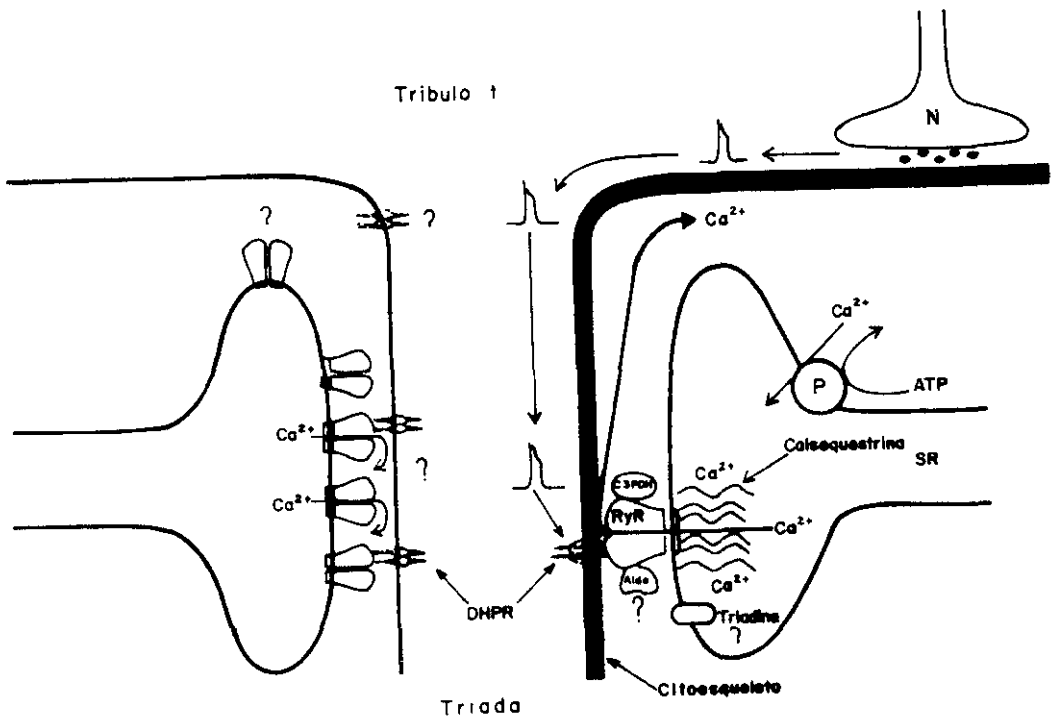


Fig.4. Esquema del proceso de acople excitación-contracción en músculo, además se ilustra la organización estructural de la triada. N, neurona motora; t, túbulos transversos; aldo, aldolasa, C3PDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; P, bomba de calcio; DHPR, receptor a dihidropiridinas, RyR, receptor de ryanodina; SR, retículo sarcoplásmico

Esta despolarización del DHPR resulta en un desplazamiento de dipolos en la subunidad  $\alpha 1$  (175kd) propiciando un cambio conformacional en este canal, que se propaga directamente al RyR, dando lugar a que éste último se active y libere calcio hacia el citoplasma celular.

Por otro lado, los estudios de microscopía electrónica indican que los DHPR forman grupos de cuatro entidades (tétradas) que están localizados en exacta correspondencia con las cuatro subunidades de los RyR (Franzini-Armstrong *et al* 1983, 1994). Sugiriendo un mecanismo de acople E-C del tipo postulado por Schneider y Chandler (Block *et al* 1988, Rios *et al* 1991) en el cual la detección del voltaje por los DHPR resulta en la apertura de los RyR, por alguna interacción molecular directa entre estas dos proteínas.

La propuesta de interacción directa, sugiere que el acoplamiento puede ocurrir a través de una proteína adicional de 95 kDa localizada entre los DHPR y los RyRs (Franzini-Armstrong C. y Protasi F., 1997).

En contraste con la situación anterior, en corazón y en todo músculo liso la liberación de  $Ca^{2+}$  ocurre por el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio (LCIC). Esto significa que cuando ocurre la despolarización de la membrana, los DHPR se abren y permiten la entrada de iones  $Ca^{2+}$  procedentes del exterior celular por lo que se incrementa la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular y ello provoca la liberación de  $Ca^{2+}$  por parte del RyR. En corazón al igual que en el músculo esquelético el RyR es el encargado de la liberación de  $Ca^{2+}$  al citoplasma, mientras que en el músculo liso esta responsabilidad se comparte con el  $IP_3R$  (Ashley *et al*, 1991)

También se ha reportado la existencia de una diferencia fisiológica en el mecanismo de acople E-C entre el músculo esquelético y el músculo cardíaco. Esta diferencia se refleja en el arreglo anatómico de los DHPR (Protasi *et al*, 1998).

En músculo cardíaco los DHPR, a comparación con los del músculo esquelético mencionados con anterioridad, se localizan en las proximidades de los RyR, sin estar agrupados en tetradas y sin estar anclados a los RyR (Sun *et al*, 1995 y Protasi *et al*, 1996 y 1998). Esto apoya la hipótesis mencionada arriba del mecanismo de LCIC como el responsable del acople E-C en músculo cardíaco. La figura 5 ilustra estos mecanismos de acople.

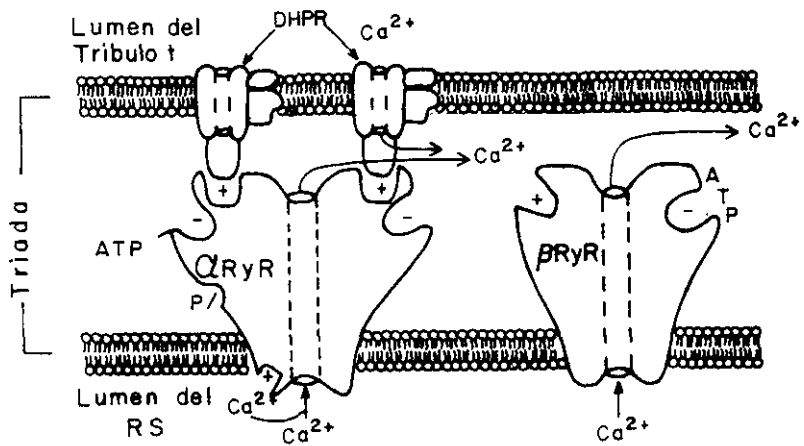


Fig.5. Sistema hipotético de la liberación de calcio de RS por los RyRs. Ambos ( $\alpha$ ) y ( $\beta$ ) RyRs, están arreglados en series y los signos (+) y (-) en cada isoforma corresponden a los sitios de unión en los cuales el calcio se une para activar o inhibir al canal. ( $\alpha$ )RyR es activado por el acople directo de la interacción de el asa citoplásmica de la subunidad  $\alpha_1$  del DHPR. ( $\beta$ )RyR es activado por la liberación de calcio por la isoforma ( $\alpha$ ) RyR y/o por el calcio liberado por el DHPR. Ambos procesos resultan en la liberación de calcio por parte de las isoformas RyR.

## Estudios de Alta Resolución del RyR.

Uno de los primeros estudios llevados a cabo para dilucidar la cuestión de cómo y dónde el  $\text{Ca}^{2+}$  es liberado del RS, consistió en la observación de células aisladas del RS de músculo esquelético en 1970 por Franzini-Armstrong, aproximándose a este problema por medio de sus estudios de microscopía electrónica donde reportó que existían pequeñas proyecciones las cuales denominó pies del RS.

Así mismo Saito y col. en 1984 estudiaron vesículas enriquecidas y aisladas del RS de músculo esquelético por microscopía electrónica para visualizar la organización de la estructura del pie de la cisterna terminal, combinando técnicas de criofractura y tinción negativa (Fig. 6a).

Posteriormente Block y col. en 1988 visualizaron la arquitectura de la conexión de las membranas del RS y los túbulos T, y la morfología de las proteínas embebidas en estas dos membranas: el pie o RyR y el DHPR. Estos estudios compararon las imágenes de criofractura de ambas membranas. Lo anterior se ilustra con la figura (6b).

En los años 90, el aislamiento y purificación del RyR como una sola entidad, permitió aplicar nuevas técnicas de imagen por computadora que lograron la reconstrucción de la estructura tridimensional del RyR.

Inicialmente los estudios de reconstrucción fueron realizados con la técnica de tinción negativa donde reportaron la estructura nativa del canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS de músculo esquelético (Wagenknecht y Radermacher, 1995). Posteriormente, con el surgimiento de nuevas técnicas en microscopía se estudio al RyR con la técnica de Criomicroscopía.

La técnica se basa en que el RyR es embebido en hielo y analizado por microscopía electrónica utilizando una cámara especial para realizar vacío y evitar así la descongelación del material. En esta técnica se aplica la aproximación para reconstruir la imagen en tres dimensiones con una resolución de aproximadamente 3 nm, lo cual detalla el dominio citoplásmico y algunos datos de la región transmembranal (Serysheva *et al.*, 1995, Wagenknecht *et al.*, 1996 y 1997, y Orlova *et al.*, 1997).

Estos estudios han reportado la estructura tetramérica que se había logrado dilucidar por los primeros estudios realizados del RyR, teniendo una aproximación en su forma a un prisma cuadrado de 27 x 27 nm.

Por otro lado, se reportó que el dominio citoplásmico tiene una altura de 12 a 15 nm. Este valor es suficiente para atravesar la distancia entre la membrana del RS y la membrana de los túbulos T, estableciéndose así una posible continuidad entre las dos. Los dominios intramembranales son claramente delimitados del ensamble citoplásmico pero se muestran en poco detalle, ya que estos se calculan matemáticamente y dependen de la preparación de la muestra y de los modelos propuestos. Lo anterior se ilustra con la Fig. 7.



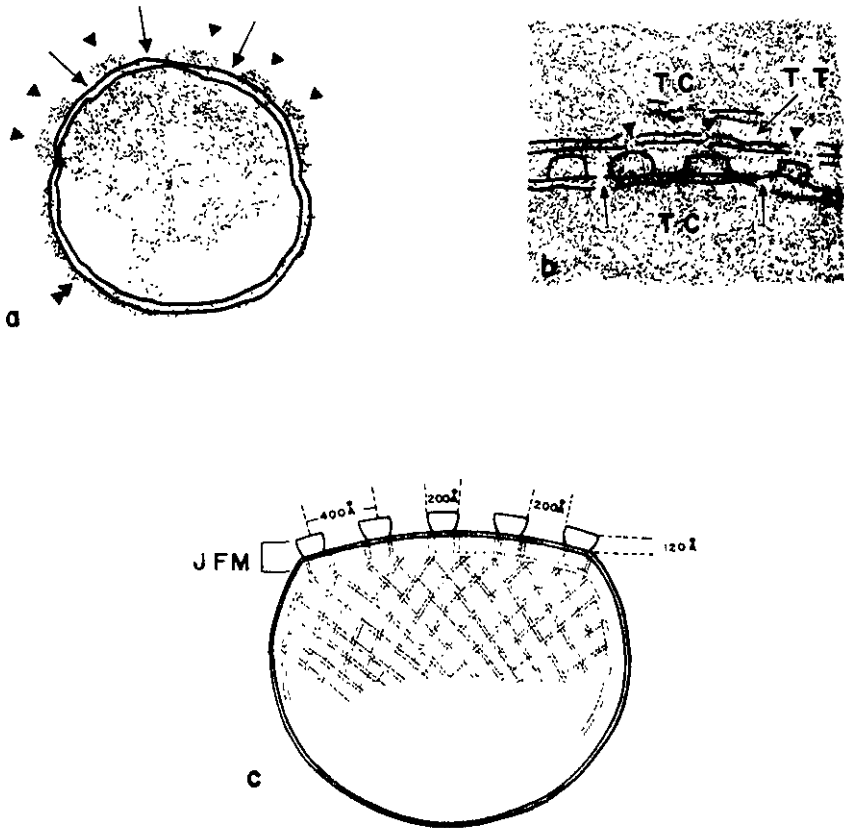


Fig.6. Imágenes del RyR estudiado por microscopía de transmisión (TEM) y de barrido (SEM). a) Vesícula de la cisterna terminal observada en tinción negativa. Las cabezas negras de flechas indican la estructura pie del RyR que se proyecta 16 nm de la superficie de la membrana con una separación repetida de 40 nm (flechas). b) Separación entre la membrana de los túbulos t y la membrana de la cisterna terminal de la triada. c) reconstrucción de la vesícula del inciso a) donde se ilustra al pie del RyR. TC, cisterna terminal; TT, túbulos transversos; JFM, pie de membrana.

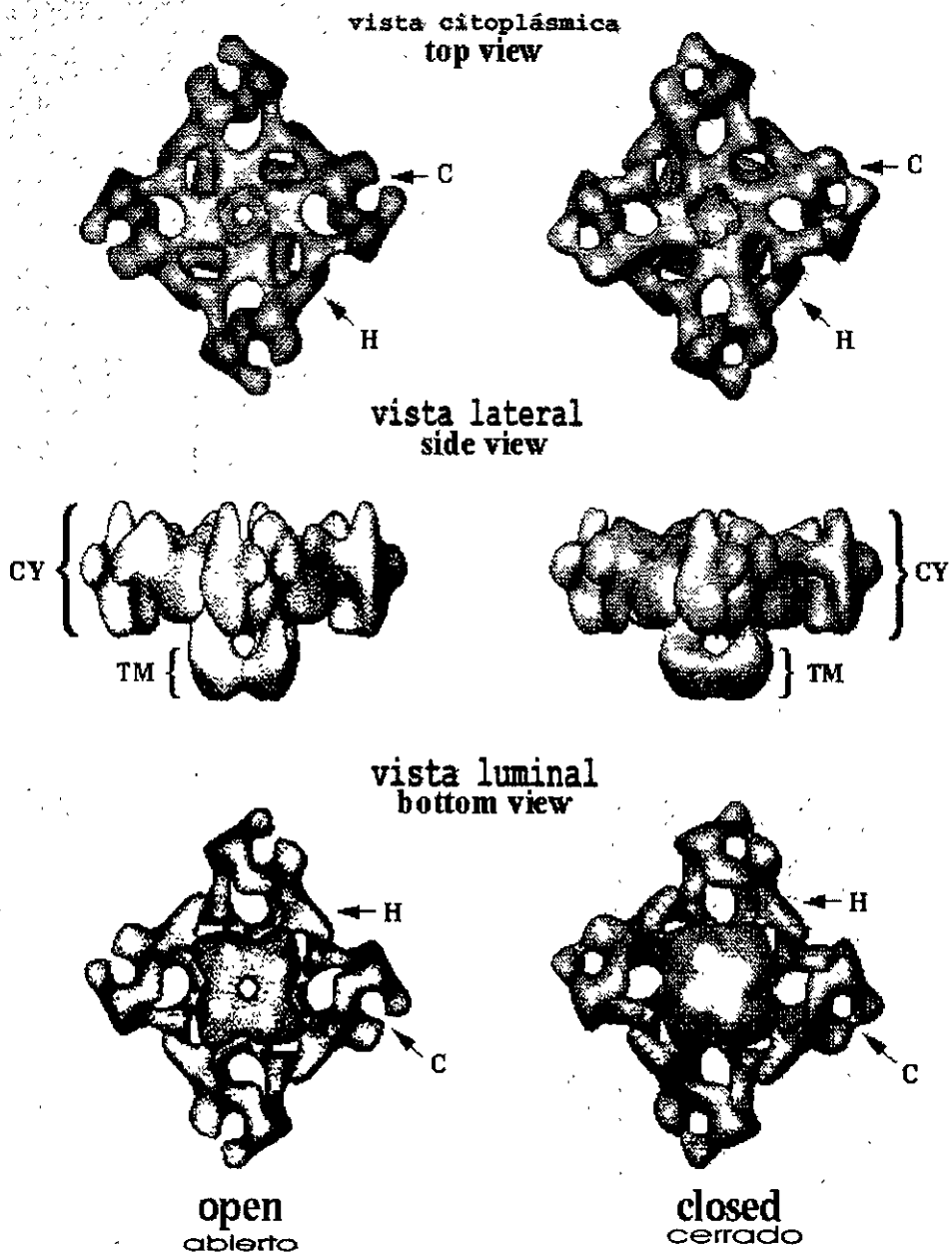


Fig.7. Reconstrucción por computadora del estado abierto y cerrado del RyR en tres diferentes vistas. C, dominio de abrazadera, H, dominio llamado manija; CY, dominio citoplásmico, TM, región transmembranal

## **Microscopía de Fuerza Atómica.**

El nombre del microscopio se atribuye a que diversas fuerzas interatómicas interaccionan para crear las imágenes tridimensionales, entre éstas se tienen a los enlaces de hidrógeno, las fuerzas electrostáticas, las de capilaridad y las de Van der Waals. Pero la fuerza más comúnmente asociada a este microscopio es la fuerza de Van der Waals.

### **Principio de Operación.**

La operación del MFA es análogo a un tocadisco. Es decir, una punta fina del orden de micras y menor a 100 Å de diámetro se localiza al final de un muelle tipo resorte de unas 100 o 200 μm de longitud. Esta pieza es la que interactúa directamente con la superficie de la muestra. De tal manera que las fuerzas existentes entre los átomos de la punta y los átomos de la muestra interaccionen causando en el muelle una deflexión que se detecta por técnicas ópticas. Estas consisten en reflejar un láser de Néon, en dirección angular al final del muelle (inicio de la punta), donde los cambios que sufre la punta al barrer la superficie de la muestra en el plano (XY) y en la posición vertical (Z) son monitoreadas y a su vez controladas por un piezoeléctrico XYZ-scanner.

Todos estos cambios o deflexiones son una medida de las fuerzas detectadas por el muelle en las tres coordenadas. Por lo cual, la reflexión del láser se captura y se convierte en una señal eléctrica por medio de un fotodetector sensible de posición (PSPD) y llevadas a una computadora para generar un mapa de la topografía de la muestra, creando así las imágenes tridimensionales (Fig.8).

Usando un sistema apropiado de retroalimentación, la deflexión del muelle puede mantenerse constante o quedar libre como respuesta a las fuerzas sensitivas. El radio de la vía extendida entre el muelle y el detector produce una amplificación mecánica y como resultado el sistema puede detectar movimientos verticales en sub-angstroms en la punta.

Una técnica nueva consiste en utilizar muelles de un material piezoresistivo, así que éste puede detectar su deflexión eléctrica. Esto es debido a que la piezoresistividad da una ventaja para detectar la alineación del rayo láser con el muelle y el PSPD. Una vez que la deflexión del muelle es detectada se pueden generar datos topográficos en varias vías.

Una primera vía es el de "Deflexión Constante", también llamado de fuerza constante, donde la retroalimentación cambia la altura de la muestra (manteniendo constante la deflexión) por ajustar el voltaje aplicado para la porción Z del scanner XYZ-piezoeléctrico

La suma de los cambios corresponde a Z, para la altura topológica de la muestra en cada punto del rastreo (XY) Al mantener la deflexión constante, el total de fuerzas aplicadas a la muestra es constante y la velocidad de barrido está limitada por el tiempo de respuesta del circuito de retroalimentación. El total de fuerzas lo controla el usuario.

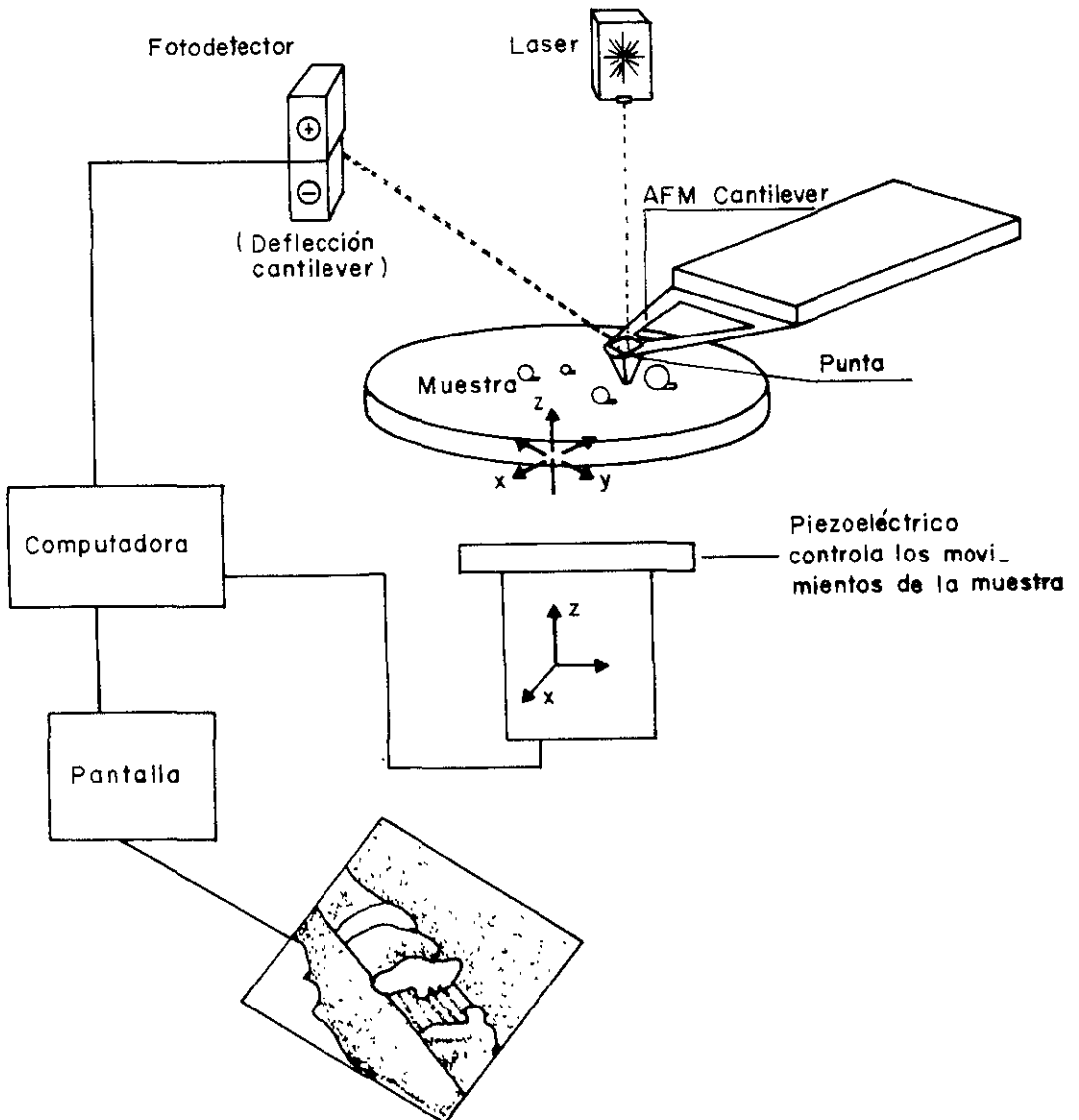


Fig.8. Esquema del principio de operación del microscopio de fuerza atómica (MFA). El cantiliver es traducido como muelle en la parte introductoria.

Una segunda vía es la de “Deflección Variable” o de altura constante: aquí la retroalimentación es abierta, de tal forma que el muelle se mueve bajo una deflección proporcional para el cambio de la interacción punta-muestra.

La superficie de la imagen se construye a partir de la información de la deflección, esto es llamado de altura constante, porque el componente Z del piezoeléctrico no cambia apreciablemente. Este proceso es usualmente inapropiado para muestras con superficies corrugadas como células, debido a que la fuerza fluctúa y entonces la deflección del muelle es enorme, resultando en la liberación de la interacción punta-muestra.

La última vía es la operación del Modo de Error, la cual remedia las imperfecciones en la altura minimizando la señal necesaria para la retroalimentación cuando se opera en el modo de deflección constante. La señal de error amplifica el contorno de la información en el plano Z. En este modo la retroalimentación reúne la información de alta frecuencia normalmente no adquirida en el modo de deflección constante. Esta información de alta frecuencia provee detalles de los cambios del contorno en la muestra. La mayor ventaja de esta vía, es que las imágenes se obtienen sin ejercer una fuerza sobre la muestra.

En el MFA existen varias modalidades entre las cuales están.

- a) El MFA en la modalidad de no contacto, la punta se encuentra oscilando a una distancia finita (grande o a unos nanómetros) de la superficie de la muestra. La ventaja más grande que se tiene es que no perturba a la muestra. Sin embargo los errores por humedad hacen de esta modalidad muy pobre en resolución y es raramente utilizado por los biólogos.
- b) El MFA en su modalidad de contacto intermitente o tapping, en la cual la punta oscila a una alta frecuencia para barrer la superficie de la muestra. La oscilación amplifica los cambios en la superficie y esta señal es utilizada para crear las imágenes. La desventaja es que la fuerza vertical puede ser muy grande, incrementando la posibilidad de dañar a la muestra y además cualquier ruido en el intervalo de la frecuencia puede alterar la lectura e introducir errores.
- c) En el MFA en modalidad de contacto, la punta puede ser llevada lo suficientemente cerca de la superficie de la muestra para que este en contacto directo con ella. En el siguiente punto se abordará con todo detalle esta variedad del microscopio, ya que es la más utilizada en las ciencias biológicas

### **Modalidad de Contacto (MFA-C).**

Esta modalidad también se conoce como repulsiva. Para examinar este escenario en más detalle, hay que empezar con la curva de fuerza de Van der Waals (Fig. 9).

En el lado derecho de la curva, los átomos están separados por una distancia larga y conforme los átomos son gradualmente llevados a estar juntos, se atraen débilmente unos con otros. Esta atracción se incrementa hasta que los electrones empiezan a repelerse electrostáticamente, y esta repulsión progresiva disminuye la fuerza atractiva así como la separación inter-atómica, que continúa decreciendo hasta que la fuerza llega a cero. Esto sucede cuando la distancia entre los átomos alcanza el nivel de angstroms, cerca de la longitud del enlace químico.

Cuando el total de fuerzas de Van der Waals se vuelve positiva (repulsiva), los átomos están en contacto y es de aquí de donde el MFA-C recibe su nombre.

Además de la fuerza repulsiva de Van der Waals descrita arriba, otras dos fuerzas están generalmente presentes durante la operación del microscopio en la variedad de contacto: la fuerza de capilaridad, ejercida por pequeñas capas de agua frecuentemente presente en un ambiente experimental, y la fuerza ejercida por el muelle mismo.

La fuerza de capilaridad se incrementa cuando la humedad se encuentra alrededor de la punta, aplicando una fuerte fuerza atractiva cercana a los  $10^{-8}$  N, que sostiene la punta en contacto con la superficie. La magnitud de la fuerza de capilaridad depende de la separación que existe entre la punta y la muestra.

La fuerza ejercida por el muelle es parecida o igual al de un movimiento compresor. La magnitud y señal (repulsiva o atractiva) de la fuerza del muelle depende de la deflexión del muelle y de la constante piezoeléctrica.

La fuerza total que la punta ejerce sobre la muestra es la suma de la fuerza de capilaridad más la fuerza del muelle, y debe ser balanceada por la fuerza repulsiva de Van der Waals. La magnitud de la fuerza total ejercida sobre la muestra varía de  $10^{-8}$  N hasta el más típico rango de operación de  $10^{-7}$  a  $10^{-6}$  N.

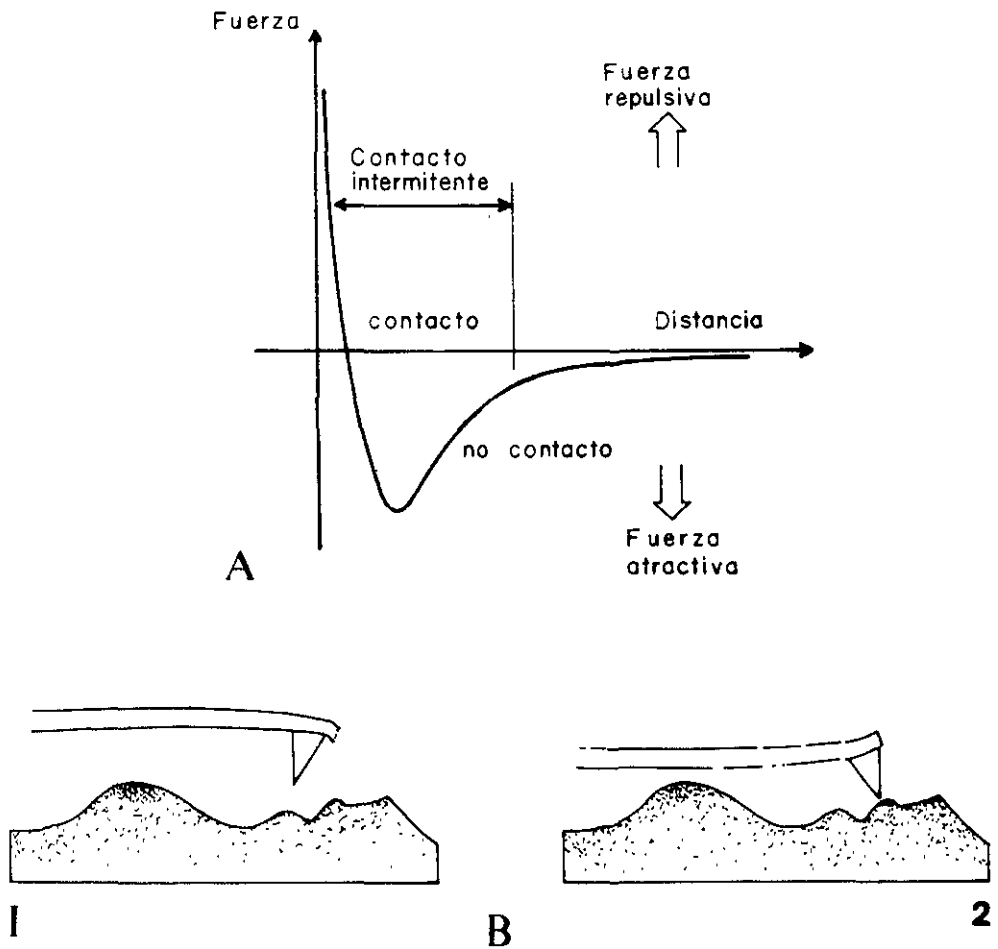


Fig 9 (A) Grafico que muestra la relación de la fuerza de Van der Waals contra la separación punta-muestra durante un barrido con el MFA. (B) Comparación de los dos tipos de operación del MFA con base a la gráfica anterior (1) corresponde a la región de no contacto y (2) pertenece a la región de contacto.

## Resolución Espacial

El límite de la resolución espacial para el MFA no está bien definida en lo que respecta a las ciencias biológicas (Binnig *et al.*, 1986).

Con el MFA, las imágenes se forman por reconstrucción del contorno de las fuerzas ejercidas entre la muestra y la punta. Al seleccionar una área pequeña de barrido y una condición apropiada de trabajo, se puede distinguir dos estructuras adyacentes que son menores de 1 nm.

La señal de un MFA es suficientemente grande para no requerir de una señal promedio y del análisis de imágenes que es a menudo necesaria para un microscopio electrónico y algunas otras técnicas.

En el MFA la resolución puede dividirse en dos categorías:

### 1) Resolución instrumental:

La resolución lateral es  $\sim 0.1$  nm y se determina por la limitación del hardware. La resolución vertical es de 0.01 nm y por tanto puede introducir pequeñas perturbaciones sobre la superficie de la muestra.

### 2) Resolución en muestras biológicas:

Para muestras biológicas la resolución que se tiene es relativamente pobre, pero más alta que la microscopía de luz y que el microscopio electrónico de barrido. Además, la resolución depende de las características de la punta y del ambiente de operación.

En una muestra biológica donde la densidad de partículas, como las proteínas de membrana, es alta y su movilidad limitada, la resolución puede ser comparable con una muestra cristalina logrando alcanzar hasta una resolución de  $\sim 0.1-0.2$  nm.

Se ha reportado una resolución para la polimerización de lípidos en Langmuir-Blodgett (LB) de 0.3 nm, y usando multicapas de LB se tienen imágenes individuales de lípidos así como resoluciones moleculares de lípidos reconstituidos en vesículas y membranas (Bustamante C. y Keller D., 1995).

La resolución de imágenes moleculares de proteínas de membranas se están obteniendo recientemente gracias a esta técnica y los estudios sugieren que la naturaleza de la muestra así como el método de preparación de la misma, juegan un papel importante en la determinación de la resolución del MFA.



## Resolución Temporal

Muy poco se sabe sobre la resolución temporal en el MFA debido a que ésta es limitada por la velocidad máxima en la cual una muestra biológica puede ser explorada y la exactitud que tiene la punta al barrer la superficie.

Estudios recientes sugieren que, para muestras con superficies duras, la resolución que se puede lograr en las imágenes es de  $\sim 0.1$  nm con una velocidad de barrido de  $< 2.2$   $\mu\text{m/s}$ . Para materiales biológicos que en general son suaves y deformables una resolución espacial de 1 nm se puede lograr con una velocidad de barrido de  $\leq 0.1$   $\mu\text{m/s}$ .

Reduciendo el área del barrido se puede incrementar la resolución temporal por lo cual es posible tener información espacial aun en pequeños intervalos de tiempo.

La resolución temporal en muestras biológicas depende del material y del movimiento molecular que presentan las macromoléculas correlacionado con su constante de difusión lateral. Un ejemplo de ello son los lípidos en una bicapa, los cuales tienen una constante típica de difusión lateral de  $10^{-8}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ , correspondiendo a un promedio de velocidad de  $\sim 2$   $\mu\text{m/s}$ .

Por otro lado, las proteínas embebidas en biomembranas naturales tienen una constante de difusión lateral menor. Por ejemplo el receptor nicotínico de acetilcolina (AChR) estudiado en parches de mioblastos tiene una constante de difusión de  $< 3.0 \times 10^{-12}$   $\text{cm}^2/\text{s}$ , por lo tanto, es posible obtener excelentes imágenes de macromoléculas que están bien adheridas como en una bicapa lipídica o inmovilizadas sobre un sustrato (Bertazzon *et al*, 1992).

El factor que limita la resolución temporal depende del ambiente de operación (solventes, viscosidad, elasticidad, etc ), de la naturaleza de las interacciones punta-muestra y del modo de operación: En el modo de altura constante, la velocidad de barrido es limitada por la rápida deflexión del muelle, mientras que en el modo de deflexión constante, la velocidad de barrido es limitado por la rapidez con que el piezoeléctrico barre y puede cambiar el componente en Z.

Por último, la resolución temporal está limitada por el filtro electrónico de pasabajos, utilizado para eliminar el ruido de la muestra. Este filtro típico tiene un corte de frecuencia del orden de 15 kHz, correspondiente a un tiempo de resolución de 67  $\mu\text{s}$ .

Para entender mejor el alcance en la resolución de la técnica de microscopía de fuerza atómica, se presentarán algunos ejemplos obtenidos con muestras biológicas.

### Aplicaciones del MFA en el Area Biológica.

En años recientes el MFA ha sufrido un rápido desarrollo como método de obtención de imágenes en las ciencias biológicas por su gran resolución espacial y temporal.

La MFA ha sido aplicada al estudio estructural de células, como los glóbulos rojos, para entender su función en el transporte de oxígeno y del dióxido de carbono (Fig. 10, Mikrut *et al.*1994)

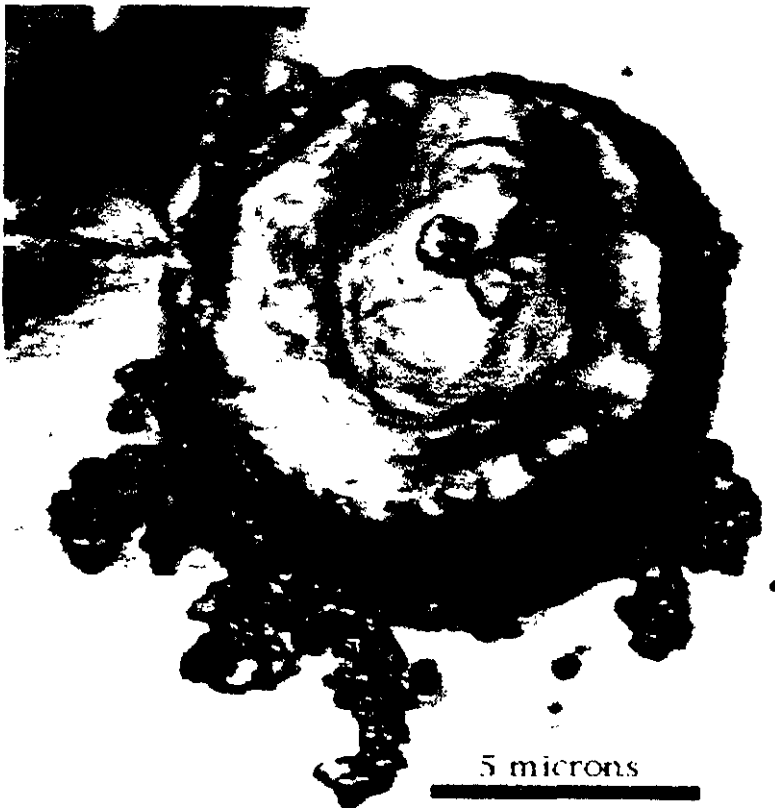


Fig 10. Célula sanguínea estudiada por MFA en su modalidad de contacto. El glóbulo rojo fue depositado sobre sustratos de mica y fijado con glutaraldehído.

También la MFA se ha utilizado para estudiar los complejos de la envoltura nuclear (NPC) de la cara citoplasmica de los ovocitos de *Xenopus*. Cada NPC está compuesto de ocho subunidades que se encuentran rodeando el canal central a través del cual ocurre el transporte de ciertos iones y macromoléculas (Fig. 11)

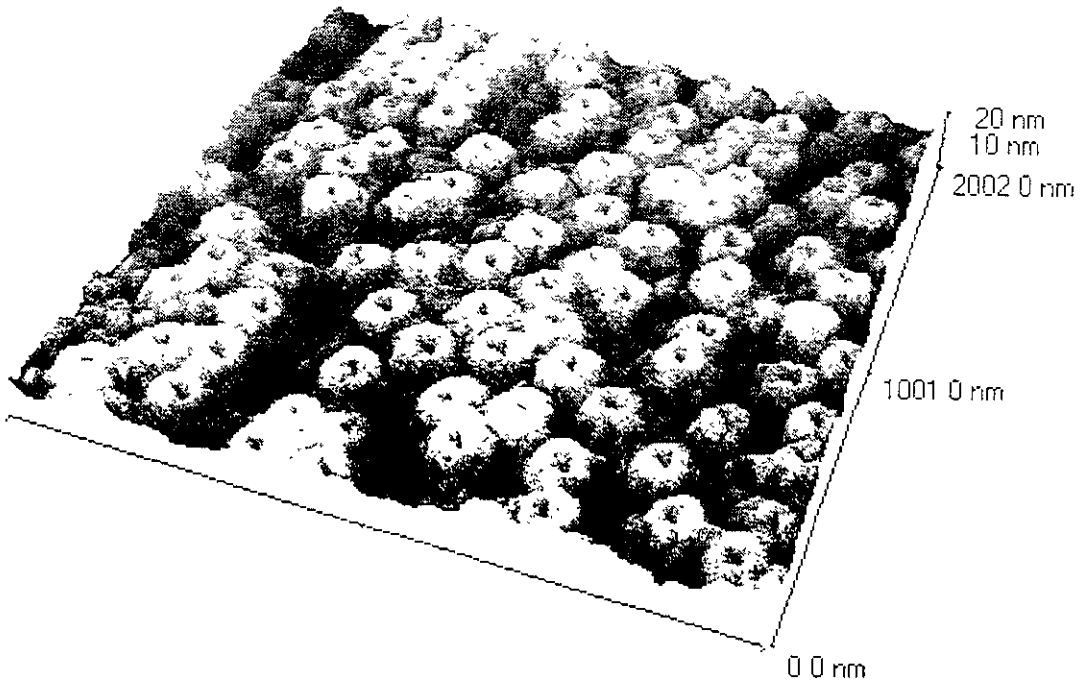


Fig 11. Imagen de la cara citoplasmica de un ovocito de *Xenopus leavis*, donde se puede observar la gran densidad de complejos de poros nucleares

Por otro lado, el MFA ha permitido el estudio de proteínas de membrana con gran éxito. Un estudio de este tipo es la caracterización estructural del receptor nicotínico de acetilcolina (AChR), el cual fue expresado en ovocitos de *Xenopus*. El MFA permitió determinar la estructura pentamérica del AChR en la cara de la membrana celular que da hacia el espacio extracelular, detectándose un poro central rodeado por las cinco subunidades (Fig. 12).

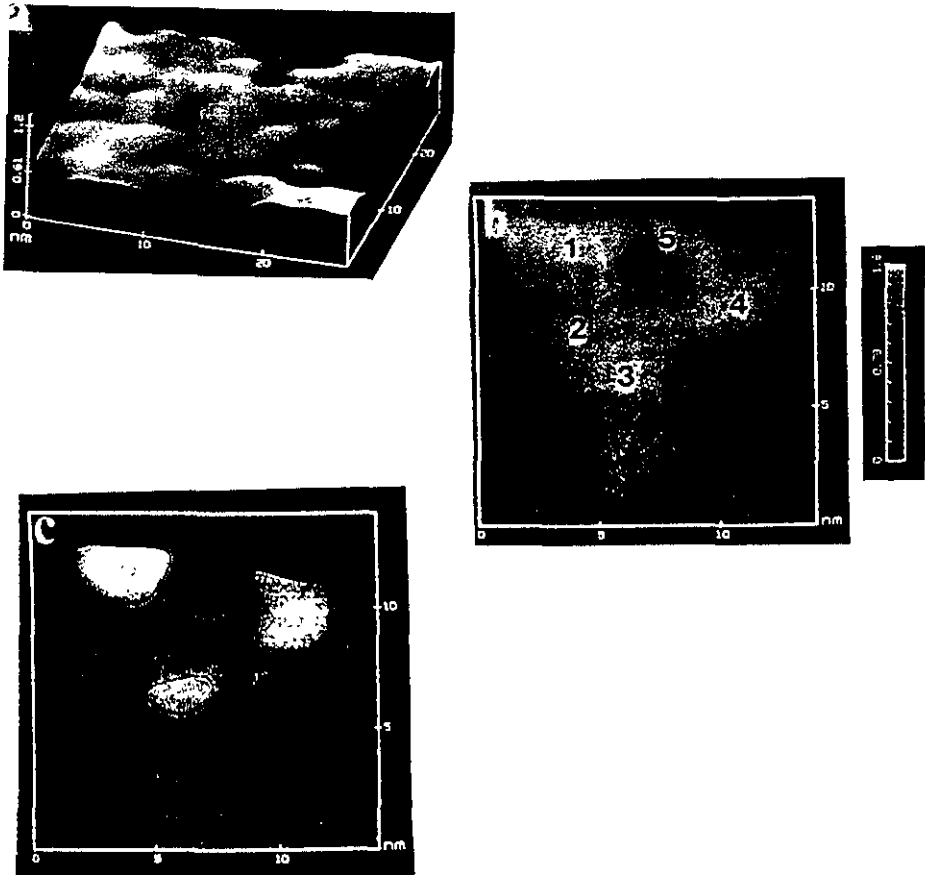


Fig.12. a) Imagen de alta resolución por MFA de la superficie del ovocito de *Xenopus* expresando el canal de acetilcolina (AChR) b) Imagen de un solo canal de AchR visto desde la parte superior donde son marcadas las cinco subunidades respectivamente, su altura relativa esta en 0.53, 0.42, 0.47, 0.50 y 0.35 nm para cada subunidad. c) AchR resaltando su contorno, donde se aprecian las subunidades y el canal central.

Dadas las dimensiones calculadas y reportadas para el canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  (RyR), será posible obtener una resolución de la superficie del dominio citoplásmico y de la estructura cuaternaria de este canal al ser analizado por la técnica de Microscopía de Fuerza Atómica (MFA).

El uso de la MFA permitirá observar cambios estructurales en la región del dominio citoplásmico del RyR debido a la acción de diversas concentraciones de moduladores, permitiendo diferenciar el estado abierto y cerrado de este canal.

Con base en los antecedentes y la hipótesis anteriormente presentados se proponen los siguientes objetivos.

**Generales :**

- 1) Se utilizará el MFA como herramienta para conocer y estudiar la estructura del canal liberador de  $\text{Ca}^{2+}$  (RyR) embebido en su membrana nativa de RS de músculo rápido de conejo.
- 2) Se detectará el cambio conformacional del RyR asociado a la presencia del alcaloide ryanodina a concentraciones activadoras (100 nM) e inhibidoras (100  $\mu\text{M}$ ).

**Particulares :**

- 1) Aislar el retículo sarcoplásmico pesado a partir del músculo esquelético rápido de conejo.
- 2) Identificar al RyR por medio de MFA, en membranas nativas de RS de músculo rápido de conejo.

**Reactivos.****Sigma:**

CaCl<sub>2</sub>, grado 1, 99%, PM = 147  
MOPS, sigma ultra, 99.5%, PM = 209.3  
PMSF, PM = 174.2  
Sacarosa, sigma ultra, 99.5%, PM = 342.3  
Pepstatina A, 75%, PM = 685.9  
Aprotinina, 4 TIU/mg  
Benzamida, 97%, PM = 156.6  
Leupeptina, 68%, PM = 475.6  
Reactivo de Folin y Ciocalteus, 2N  
BSA, 98-99%

**Baker:**

KCl, R.A., 99%, PM = 74.55

**Calbiochem:**

Ryanodina, 98.5%, PM = 493.5

## MÉTODOS.

### OBTENCIÓN DEL MÚSCULO ESQUELÉTICO RÁPIDO.

El tejido requerido para este estudio se obtiene de la espalda baja y patas traseras de conejos adultos jóvenes machos, de la raza Nueva Zelanda albino (*Oryctolagus uniculus*), de aproximadamente 4 kg de peso.

Antes de sacrificar al animal se le inyecta, vía intraperitoneal Anestésico (25 mg/kg peso), producido por Smith Kline Beechman. Una vez dormido, se aplica un corte en la yugular del conejo y se deja desangrar. Posteriormente, se elimina la piel y se extrae el tejido con ayuda de material quirúrgico. Finalmente, se envuelve el tejido en secciones con papel aluminio y se congela en un ultrarefrigerador a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### PROCEDIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DEL RETÍCULO SARCOPLÁSMICO PESADO (RSP).

El procedimiento se siguió con base a lo reportado por Hamilton *et al.*, 1989.

#### Homogenizado.

a) Colocar 150 g de tejido finamente cortado en 150 ml de buffer A (sacarosa 0.3 M, tris-malato 20 mM, pH 7 e inhibidores de proteasas: Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo (PMSF), 100  $\mu\text{M}$ ; benzamida, 100  $\mu\text{M}$ ; pepstatina A, 1  $\mu\text{M}$ ; leupeptina. 1  $\mu\text{g/ml}$ ; aprotinina, 1  $\mu\text{g/ml}$ ).

b) Licuar a alta velocidad dos veces durante 30 seg. cada una.

c) Adicionar 400 ml de buffer A y licuar otros 30 seg.

#### Fraccionamiento.

d) Centrifugar el homogeneizado en un rotor GSA a 5500 rpm (3000 g), durante 30 min.

e) Filtrar el sobrenadante a través de una gasa procurando exprimir bien.

f) Centrifugar la fracción líquida con un rotor GSA a 9800 rpm (10,000 g), durante 30 min.

g) Filtrar el sobrenadante a través de una gasa

h) Adicionar KCl hasta alcanzar una concentración de 0.5 M (3.7 g/100 ml).

i) Ultracentrifugar con rotor 45Ti, a 41,000 rpm (130,000 g) durante 45 min.



j) Resuspender el sedimento en 400 ml de buffer (sacarosa 0.3 M, KCl 0.6 M, ácido 3-[N-morfolino]propan sulfónico (MOPS) 10 mM y pH 7.4 y homogenizar (homogenizador Caframa tipo RZRI).

k) Ultracentrifugar con rotor 45Ti a 41,000 rpm (130,000 g) durante 30 min.

l) Resuspender el sedimento en un buffer que contenga sacarosa 0.3 m, KCl 0.4 M, MOPS 10 mM a pH 7.4 y homogeneizar en 20-25 ml.

### **Gradiente.**

m) Depositar la fracción separada en un gradiente discontinuo de sacarosa constituido por soluciones al 20% (superficie), 25%, 30%, 35% y 40% (fondo inferior). Cada solución contiene además KCl 0.4 M, MOPS 10 mM, pH 7.4.

n) Ultracentrifugar con un rotor SW 28 a 27,000 rpm (130,000 g) durante 14 horas.

o) Diluir la interface obtenida entre 35 y 40 % de sacarosa en 3-4 volúmenes de MOPS 10 mM pH 7.4

p) Ultracentrifugar con un rotor 60Ti a 42,800 rpm (130,000 g) durante 30 min.

q) Resuspender el sedimento en una solución que contenga sacarosa al 10%, KCl 0.1 M, MOPS 10 mM, pH 7.4.

r) Separar alícuotas de aproximadamente 30 ul y congelar a -70°C. Esta fracción se denomina retículo sarcoplasmico pesado (RSP).

### **DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA EN LA FRACCION AISLADA.**

La determinación de la concentración de proteína en la fracción aislada de RSP, se realizó espectrofotométricamente por la técnica de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). La lectura de la absorbancia se hace a 660 nm y la curva estandar se construye con 5, 10, 20, 50, 100 y 300 µg/ul de una solución stock de seroalbúmina de bovino (BSA).

## PREPARACION DE MUESTRA Y PROCESO DE ANALISIS DE IMAGEN POR MICROSCOPIA DE FUERZA ATOMICA (MFA).

Para el análisis de la muestra de RSP se usaron los procedimientos descritos en la literatura relacionada con la utilización del MFA en el área biológica. Se utilizaron discos de mica, de vidrio y de cuarzo amorfo, de 5 mm de diámetro, donde se depositó la fracción aislada de RSP, pero todos fueron descartados por no mostrar una buena adherencia con la membrana.

Para el estudio, se implementó un sustrato de silicio monocristalino de alta pureza y con orientación (1,1,1), de aproximadamente de 1 cm de diámetro, el cual se limpió con ácido fluorhídrico (HF) en solución al 30 % para evitar el óxido superficial y obtener una superficie limpia.

La fracción aislada de RSP se depositó en el sustrato colocando 5  $\mu$ l que corresponden a 38.3  $\mu$ g de proteína/ $\mu$ l presentando una Bmax. de 12.3 pmol/mg de proteína. Esto con el fin de obtener imágenes de la membrana de RSP y del estado basal del RyR. Para determinar el estado activado y bloqueado del receptor de ryanodina, la fracción aislada de RSP se incubó durante 3 h. con ryanodina fría a una concentración que favoreciera ambos estados conformacionales (100nM y 100 $\mu$ M). Posteriormente las muestras se deshidrataron por medio de un vacío dinámico, que extrajo las moléculas de agua presentes en el medio muy lentamente, evitando el burbujeo que produce un vacío normal. Con esto se contribuye al reacomodo de la membrana con respecto al sustrato (Murray *et al.*, 1995).

Se trabajó en el análisis de las muestras con un MFA-C (modalidad de contacto), Auto Probe CP "Park Scientific Instrument" (Sta. Barbara California, USA). El proceso de adquisición de datos para analizar la topografía de la membrana de RSP se llevó a cabo a fuerza constante y aplicando la fuerza desde un intervalo de 1 a 10 nN. La rapidez del barrido es del orden de 1Hz y con una ganancia en Z (altura) de  $1.2 \times 10^{-4}$   $\mu$ m/step. Las imágenes se filtran utilizando la correlación de transformada de Fourier para valores promedios, para quitar el ruido generado por el aparato.

Las primeras sesiones que se efectuaron en el microscopio de fuerza atómica (MFA) se dedicaron por entero a conocer todas y cada una de sus partes. Esto, con el objeto de familiarizarse con el equipo y el programa de adquisición de datos, para reconocer y analizar los efectos del ruido generado en los alrededores del laboratorio, para considerarlos y descartarlos de los datos adquiridos durante las exploraciones topográficas de la membrana de RS.

### **Substratos de Mica, Vidrio, Cuarzo Amorfo y Monocristal de Silicio.**

La membrana de RS fue depositada en diferentes substratos y explorada con el sacaner de 100 micras ( $\mu\text{m}$ ), con el objeto de empezar a establecer los parámetros en el MFA.

Los primeros barridos correspondieron a los discos de mica. En estas imágenes se puede observar que durante el barrido existió dificultad en lograr una buena resolución de la membrana. Esto es debido a una baja adherencia de la membrana con respecto al substrato utilizado, reflejando la fuerte interacción punta-membrana durante la exploración de la muestra con el MFA.

Al ser arrastrada la muestra por la punta, se falsea la información de la superficie de la membrana, ya que conforme la punta regresa al inicio de partida, ésta contendrá pequeñas cantidades de membrana que pueden interferir con la medición.

Cuando la fracción de membrana de RSP se deposita sobre porta objetos de vidrio, se mejora la resolución, pero aún la adherencia del substrato es inadecuada. Además, la membrana se presenta en forma de grumos dificultando la exploración topográfica, debido a las grandes deflecciones que debe sufrir el muelle para ajustar la topografía de la muestra. Este hecho evita una óptima interacción punta-membrana por lo accidentado de la superficie y porque en este caso se tuvo que aumentar la fuerza del barrido así como la velocidad para poder registrar la topografía de la muestra. Esta práctica trajo desgracias en cuanto a la preservación de la muestra y de la punta.

Por último, las exploraciones topográficas de la membrana depositada en discos de cuarzo amorfo presentó una mejor adherencia, pero la interacción de la punta con respecto a la muestra es todavía ineficiente, debido a que la muestra todavía es arrastrada en pequeñas zonas. Lo anterior, impide continuar con los barridos, ya que muchas veces se termina por romper la punta por la fricción existente entre los componentes debido al incremento de la fuerza que causa la deflexión en el cantilever conforme se aumentan los intervalos de registro.

Lo común en las anteriores observaciones, son las rayaduras fácilmente reconocibles como arrastre y desgarramientos de la membrana de RSP ilustradas con la figura 13.

En resumen, la falta de adherencia entre la membrana y los substratos de vidrio, cuarzo amorfo y mica impidió la obtención de imágenes. De esto se puede inferir que es de vital importancia optimizar algún material como substrato que cumpla con los siguientes requisitos :

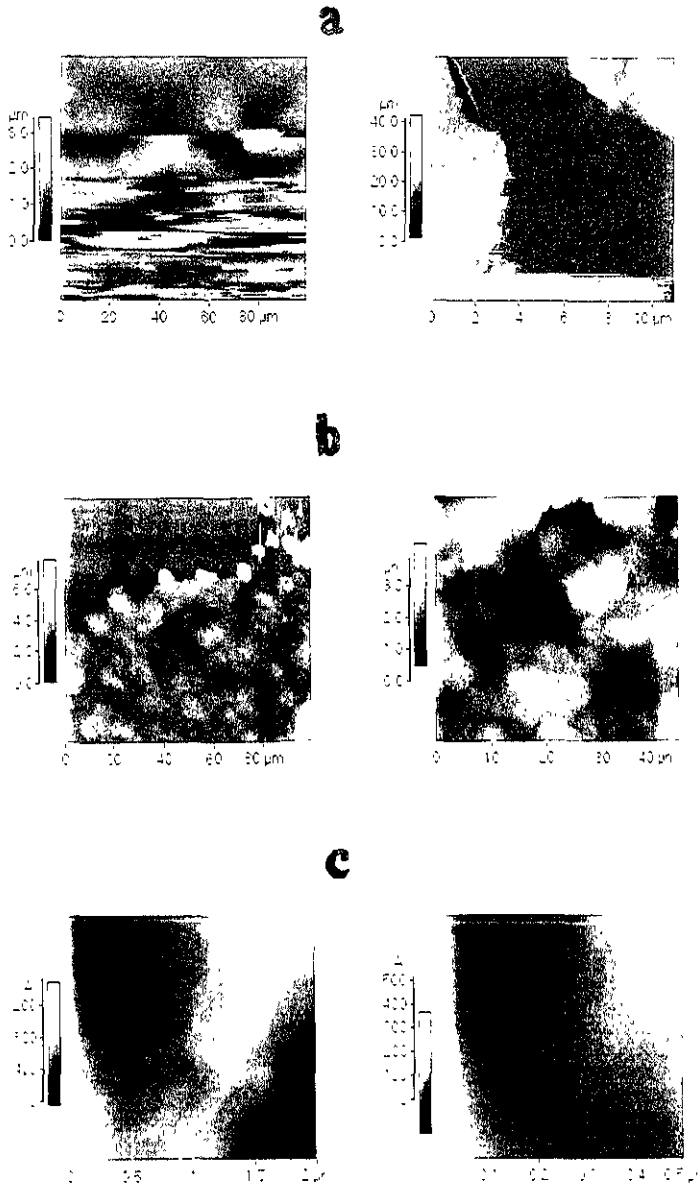


Fig.13. Arrastres y desgarramientos de la membrana de RSP por la falta de adherencia mostrada por los diferentes sustratos utilizados (a) mica, (b) vidrio, (c) cuarzo amorfo .

- 1) Qué el sustrato permita una buena adherencia de la muestra.
- 2) De ser posible, que la interacción sustrato-muestra induzca una orientación topográfica, es decir, que la muestra no se aglomere o que presenten regiones con grumos,
- 3) Que la interacción de la punta del MFA en el proceso de barrido no afecte ni la morfología de la muestra ni su adherencia al sustrato. Esto para poder efectuar múltiples barridos usando una misma muestra.

Por ende, los problemas técnicos que se tuvieron que resolver y que fueron en común encontrados en la investigación se pueden desglosar en tan sólo una pregunta, ¿Cuál es el tipo de sustrato que permita una buena interacción con la membrana para lograr la resolución con el MFA que se necesita en la visualización del RyR?

La respuesta, aunque un poco empírica en cuanto a la decisión del sustrato a elegir se basó en una colaboración multidisciplinaria. Esta colaboración aprovechó la experiencia de los investigadores del área de ciencia de materiales, principalmente en el campo de estudio de películas delgadas a base de nanopartículas; donde es necesario un sustrato que induzca un arreglo así como la existencia de una buena adherencia para que la técnica de MFA permita obtener la morfología tridimensional.

En consecuencia se optó por utilizar como sustrato a un monocristal de silicio de alta pureza con orientación cristalográfica (1,1,1), que tiene las siguientes propiedades: superficie lisa (acabado tipo espejo), material duro, resistente al rayado y no adsorbe agua (Fig. 14).

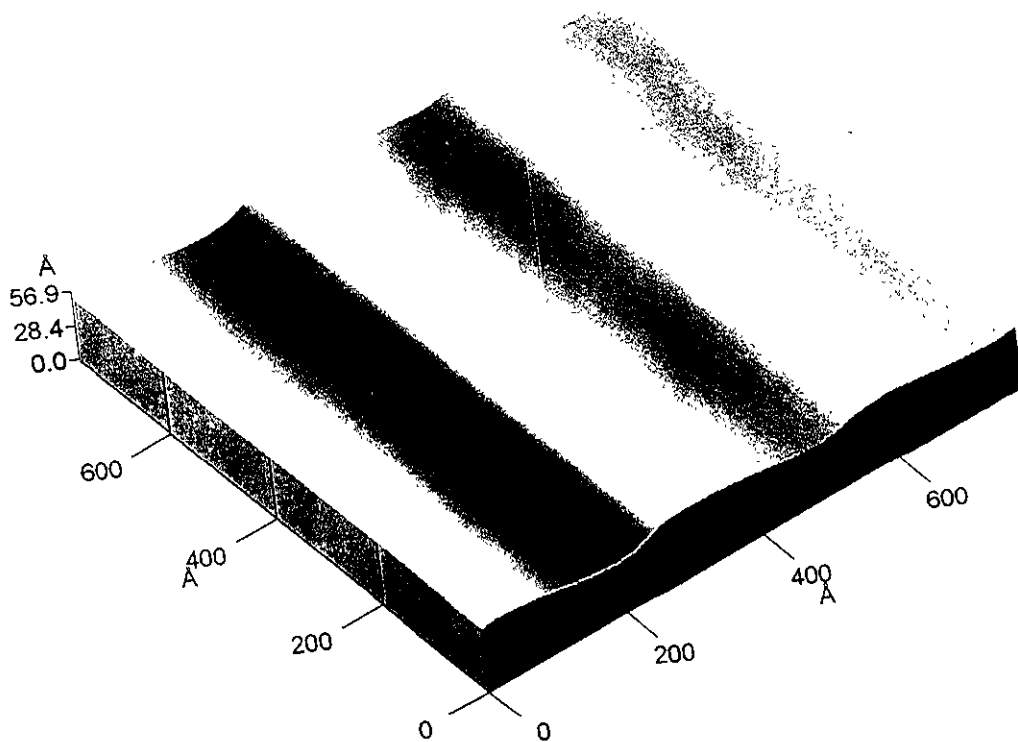


Fig.14. Topografía superficial del sustrato de silicio monocristalino.

## **Exploración de la Membrana de RSP depositada en sustrato de Silicio Monocristalino.**

La decisión de utilizar al monocristal de silicio para visualizar la membrana del RS por MFA, nos lleva a discutir ampliamente su estructura recordando que las membranas biológicas se presentan en todas las células ya sea animal o vegetal.

Esta envoltura lejos de ser inanimada, permite muchas interacciones selectivas, desempeñando múltiples funciones:

- Regula el paso de materiales hacia dentro o hacia afuera de la célula.
- Mantiene el medio intracelular en virtud de su capacidad de permeabilidad selectiva y mecanismos de transporte.
- Regula el metabolismo determinando las concentraciones de los cofactores enzimáticos y sustratos intracelulares.
- Capta y transduce señales químicas extracelulares mediante moléculas receptoras externas y moléculas localizadas en la membrana.
- Conduce mensajes, señales eléctricas y/o regula el transporte de sustancias a través de ella.
- Mantiene relaciones estructurales y químicas con células vecinas.
- Protege a la célula y participa en su movimiento o secreción.
- Permite la compartimentalización celular

Pero los mecanismos moleculares precisos que están involucrados en las variadas funciones de la membrana son pocos conocidos, debido a que la integridad estructural y funcional de la membrana se pierde cuando se aíslan y purifican sus componentes, lo que provoca importantes limitaciones en los estudios sobre la organización y subestructura de este tipo de organelos.

En cuanto a su estructura se puede hablar de una arquitectura fundamental de las membranas, la cual fue propuesta por Singer y Nicholson en 1972, y que es conocida como el modelo de mosaico fluido de la membrana.

Dicho modelo aborda la estructura como una bicapa lipídica, en la que las cabezas hidrofílicas de las moléculas de fosfolípidos miran hacia el exterior y las colas lipofílicas (hidrófobas) miran hacia el interior, donde además las proteínas están integradas en la bicapa lipídica, con algunas moléculas de proteínas penetrando por completo la bicapa, y otras haciéndolo parcialmente. Este modelo parece ofrecer la imagen estructural más aceptable de la membrana (Fig.15).

Las proteínas intrínsecas de la membrana desempeñan funciones esenciales, ejemplos de estas proteínas incluyen a: los canales iónicos, transportadores, bombas metabólicas, moléculas receptoras y de reconocimiento (Ekert y Randall, 1994). Sin embargo, en la actualidad la información estructural y la organización de las membranas biológicas procede principalmente del desarrollo de los métodos de corte ultrafino de tejidos fijados químicamente para la microscopía electrónica, y más recientemente, de los métodos de criofractura combinados con la microscopía electrónica que han permitido la visualización de la estructura fina de la superficie de la membrana.

La arquitectura topográfica de la membrana del RS en tres dimensiones que se presenta en la figura 16, ilustra una gran densidad de proteínas insertadas en la membrana, lo cual concuerda con la propuesta del modelo del mosaico fluido de membrana. Por otro lado, al realizar un acercamiento de una pequeña área, se puede distinguir la textura lipídica de la bicapa del RS como pequeñas granulosidades o estructuras esféricas, los fosfolípidos.

El arreglo lipídico de la membrana es uniforme y se aprecia una orientación en el plano (XY) adoptada cuando la membrana es depositada en el sustrato de silicio. Tal orientación puede ser fundamentada debido a que los soportes pueden ser modificados ajustando su hidropaticidad, su densidad de carga y/o su polaridad (Lal *et al.*, 1994 y Sackmann E., 1996).

El lograr una adecuada resolución espacial de la superficie de la membrana de RS, el siguiente paso fue la localización del RyR, el cual esta enriquecido en esta preparación. Para ello se realizaron barridos con mayor resolución espacial.

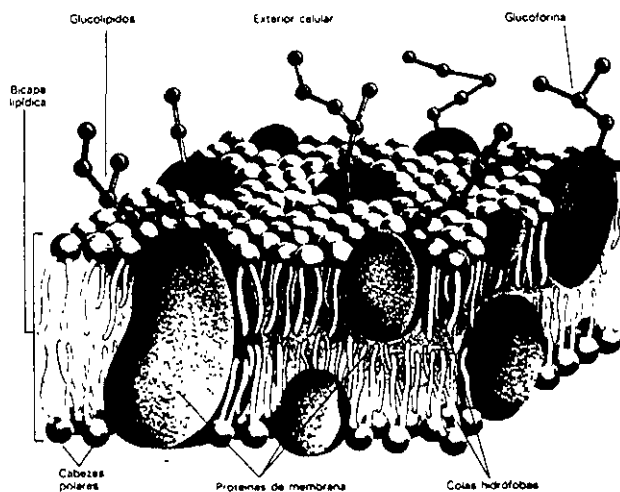


Fig.15. Sección de la membrana plasmática, en la que se puede observar su aspecto típico en doble capa lipídica.



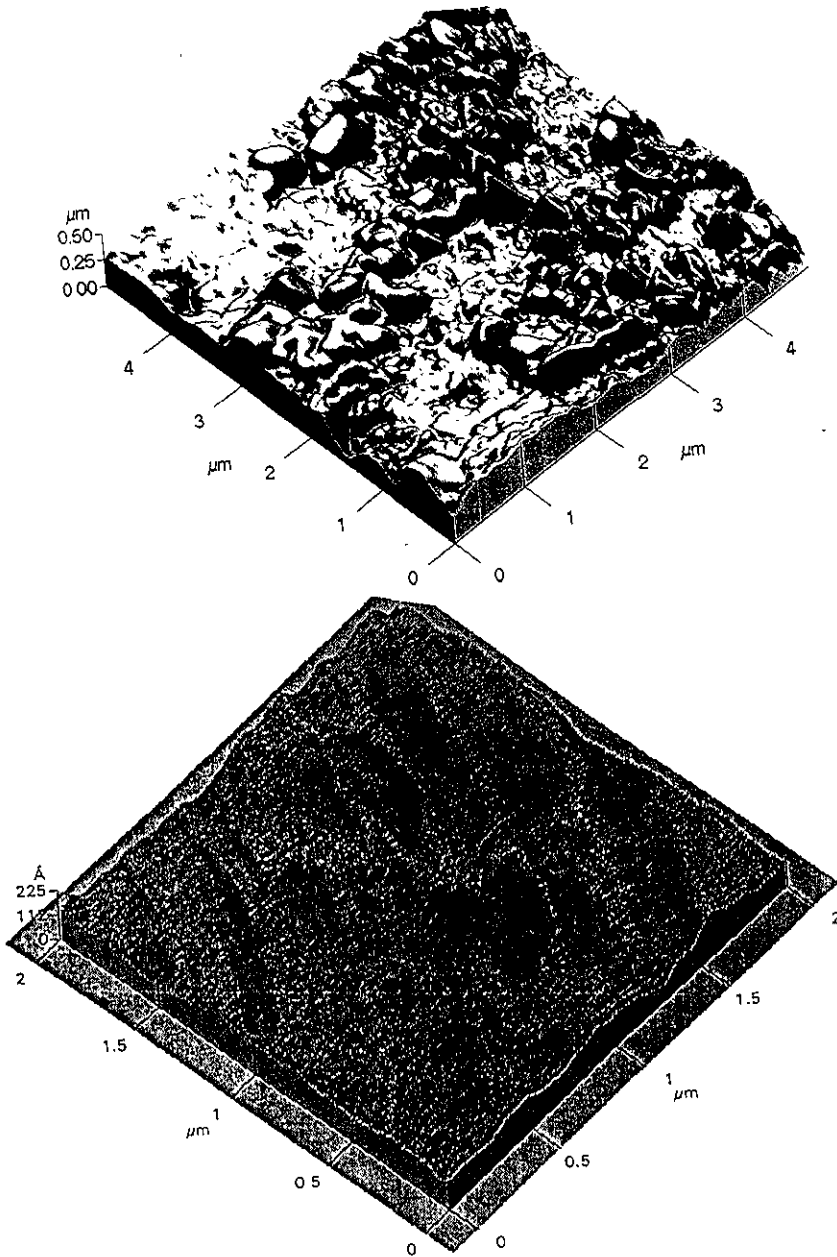


Fig.16. Superficie de la membrana de RSP donde se ilustra la densidad de proteínas insertadas en ella y a su vez una imagen de la textura lipídica de la misma.

## **Caracterización Estructural y de los Cambios Conformacionales asociados al RyR.**

Los estudios estructurales realizados al RyR, se basaron en la estructura tetramérica cuando el receptor es purificado completamente cuyo valor varía desde 21 x 21 nm hasta 27 x 27 nm por lado; y el tamaño característico del pie o región citoplásmica cuando se localiza en la membrana cuyo valor de altura varía desde 12 nm hasta 15nm. Ambos parámetros se han valorado en una gran variedad de músculos de vertebrados e invertebrados por estudios de microscopía electrónica, a base de simulación de imagen.

Para obtener diversas imágenes de RyRs localizados en una misma área de barrido es necesario explorar diferentes zonas de la membrana durante los barridos realizados por MFA. A su vez, es necesario realizar acercamientos para tratar de evaluar la región citoplásmica teniendo en cuenta que es uno de los marcos estructurales importantes para estudiar y evaluar al RyR por MFA.

El estado nativo del receptor, así como sus cambios asociados al ponerlo en contacto con el modulador (ryanodina) y promover el estado activado y el estado cerrado se muestran en tres dimensiones, donde se visualizan sus dominios citoplásmicos. Su aspecto se distingue como una estructura cuadrada detallada por las subunidades que están circundando al vestíbulo del canal central marcado como PC (Fig. 17).

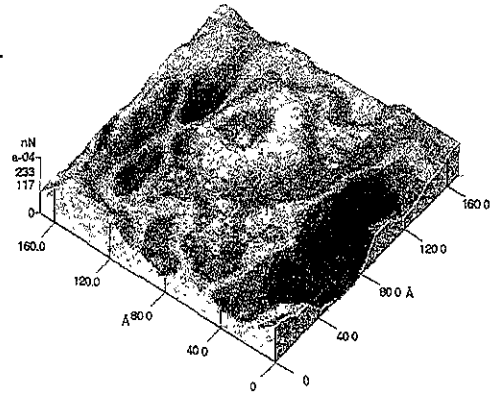
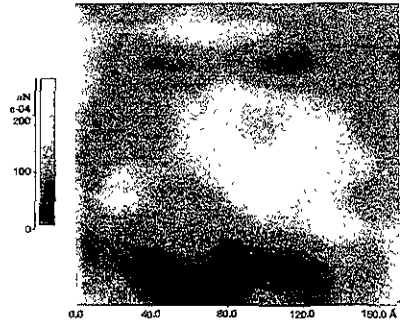
En el estado abierto y cerrado, el dominio citoplásmico se ve afectado por la interacción de la ryanodina a su receptor. La concentración utilizada de 100 nM favorece la probabilidad de apertura del canal y la concentración de 100µM favorece la probabilidad de bloquear al canal.

Para determinar y relacionar los cambios conformacionales presentes en la estructura del receptor con respecto al estado basal cuando la fracción de membrana fue incubada con la ryanodina, se evaluaron los siguientes parámetros: el diámetro del canal, la profundidad del mismo, la altura del dominio citoplásmico y los diámetros de la silueta del mismo. Los valores están resumidos en la Tabla 1 e ilustrados en la fig.18.

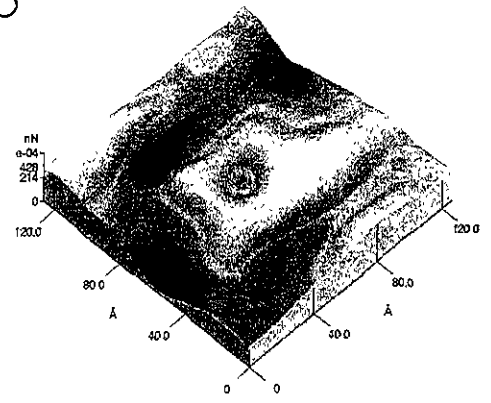
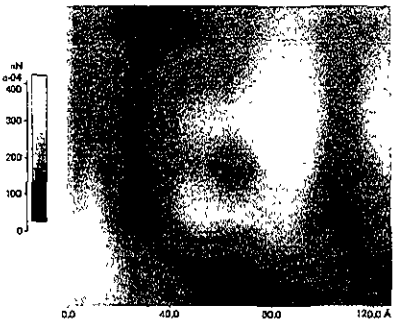
El diámetro del canal central se ilustra como (DPC). Los valores nos indican el promedio de la apertura o cierre del canal asociado a la unión del modulador. Los porcentajes de cambio del DPC en relación al estado basal del RyR, nos indica que el valor para el DPC en el estado abierto se incrementa un 39 %, mientras que en el estado cerrado disminuye un 33 %. Estas medidas son fácilmente interpretadas como un cambio de estado conformacional favorecido del RyR, y puede distinguirse con claridad al comparar las tres imágenes.

Las mediciones de la profundidad del canal central (PPC), se pueden explicar mejor como la longitud o punto máximo hasta donde la punta puede llegar a penetrar en la apertura del canal, esta apertura correspondería al vestíbulo del canal.

### BASAL



### ACTIVADO



### CERRADO

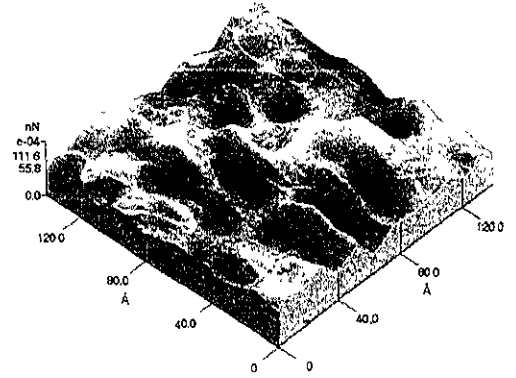
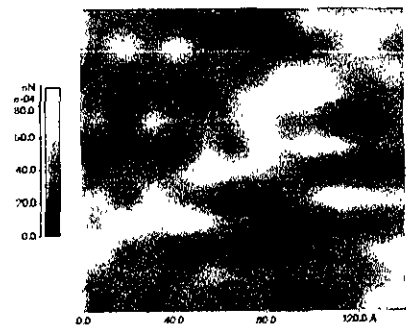
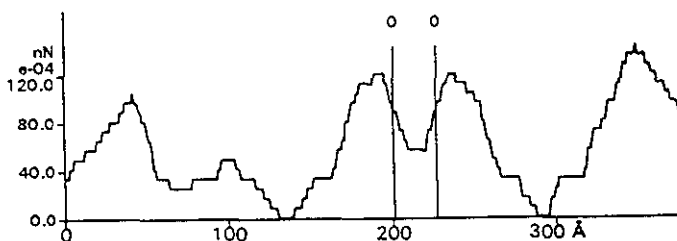


Fig.17. Imágenes en plano y en tres dimensiones del dominio citoplásmico del RyR en sus tres estados conformacionales: basal, activado (100 nM de ryanodina) y cerrado (100 μM de ryanodina)

La decisión de evaluar si estamos en el vestíbulo o en el filtro de selectividad es por lo siguiente:

- 1) En la ilustración de la medida de profundidad se puede uno dar cuenta que la región evaluada se localiza de la parte de la membrana hacia la parte superior del canal, la cual corresponde al vestíbulo del canal del RyR.
- 2) Es evidente que si la punta llegara a la parte más estrecha del poro iónico que corresponde al filtro de selectividad, se podría causar una perforación o cambio en la estructura del RyR por tratar de bajar la punta de barrido.



Pero estos valores por sí mismos no nos dicen si el RyR sufre un cambio estructural y por ende, se evaluaron los diámetros de la silueta del dominio citoplásmico definidos como (D1) y (D2).

Como se puede ver en la Tabla 1, los diámetros del estado abierto comparado con el estado basal, cambian considerablemente y se puede tomar como un movimiento de la masa de cada una de las subunidades que conforman al dominio citoplásmico, para permitir el flujo de los iones calcio a través del canal, que se traduce como la liberación de calcio desde las pozas intracelulares del RS.

En contra parte, los diámetros del estado cerrado comparado con el estado basal, cambian drásticamente y nos indica que la masa de cada subunidad que conforma al dominio citoplásmico se está replegando. Este repliegue de la proteína debe de ser soportado por la acción directa de la membrana y además debe involucrar a la región transmembranal. Este cambio conformacional evita el flujo de los iones calcio desde las pozas intracelulares.

Lo anteriormente descrito asocia la concentración de la ryanodina con posibles cambios estructurales en su receptor. Pero para complementar estos estudios se midieron también las variaciones en la altura del dominio citoplásmico.

Al comparar la altura de los dominios citoplásmicos del estado activado y cerrado con respecto al basal, se observan cambios significativos que fundamentan el cambio que sufre el RyR. Cuando el RyR se encuentra favorecido en su estado activado, la altura del pie se incrementa un 6.2 % mientras, la altura del pie en el estado cerrado disminuye en un 14 %. Esto sugiere que la ryanodina esta induciendo un cambio conformacional en el pie del RyR.

Tabla-1. Se resumen los valores obtenidos de las mediciones de los cambios estructurales del dominio citoplásmico del RyR por la técnica de MFA.

ZONA	BASAL (Å)	ACTIVADO (Å)	CERRADO (Å)
D1	178 ± 22	134 ± 27	68 ± 16
D2	161 ± 30	126 ± 19	79 ± 20
DPC	18 ± 4	25 ± 4	12 ± 2
P	23 ± 3	27 ± 7	14 ± 3
h	128 ± 19	136 ± 9	110 ± 15

(n = 50)

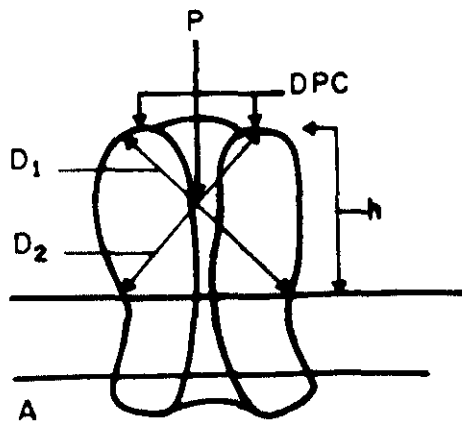


Fig.18. Esquema que ilustra las regiones que se evaluaron del dominio citoplásmico del RyR por MFA en sus tres estados conformacionales.

La MFA mostró ser una técnica muy poderosa para el estudio estructural del RyR en membranas nativas.

Los factores más importantes de esta nueva herramienta experimental son los siguientes: pueden procesarse imágenes tridimensionales a temperatura ambiente, a presión atmosférica, bajo condiciones fisiológicas *in situ*, en ambientes acuosos y la posibilidad de observar o registrar procesos bioquímicos y fisiológicos en tiempo real, (Shao, *et al*, 1995). Además la técnica no necesita un recubrimiento con materiales conductores para poder explorar a la muestra biológica, ni de un sistema especial de vacío.

Por otro lado, el MFA no puede evaluar si la muestra es un material cristalino siendo una desventaja con respecto a la microscopía TEM, donde por difracción uno puede evaluar al tipo de material explorado. Otra desventaja pero que se comparte con las técnicas de alta resolución es que depende de la preparación de la muestra.

La dificultad técnica más sobresaliente fue la adherencia de la fracción de membrana aislada de RS al depositarla sobre los diferentes sustratos.

Los métodos más comunes para depositar o ensamblar membranas sobre superficies sólidas es la transferencia directa de los lípidos y/o en vesículas aisladas. En ambos casos la continuidad de la membrana depositada depende críticamente de la superficie lisa del sustrato y además de su carga atractiva, repulsiva o neutra. Esto último dicta el papel de la adherencia para lograr la resolución necesaria para visualizar una estructura biológica.

Por otro lado, el depositar membranas sobre diferentes tipos de sustratos tiene un interés práctico y científico por varias razones. Permite la biofuncionalización en sólidos inorgánicos y polímeros. Ello provee un ambiente natural para la inmovilización de proteínas (tales como receptores y anticuerpos) bajo condiciones no desnaturalizantes y en una bien definida orientación. Esto permite la preparación de bicapas ultra-delgadas, de una alta resistencia eléctrica sobre sustratos conductores y, la incorporación de receptores para detectar la unión de ligandos y o anticuerpos así como los cambios estructurales asociados a las proteínas.

Tomando en cuenta lo anterior, el monocristal de silicio tiene una superficie muy lisa, ordenada, neutra y cuya rugosidad determinada por MFA es de 4 Å. Esto nos permitió obtener la arquitectura superficial de las vesículas de membrana aislada de RS al depositarla en el sustrato de silicio por MFA. Las imágenes de la Fig.16 comparadas con otros estudios de bicapas artificiales por MFA, contribuyen a la resolución espacial.

La desventaja prominente del estudio es que se realizó en condiciones de deshidratación, lo cual podría afectar la integridad de la membrana de RS.

De lo anterior se puede resumir que esto nos llevó a realizar un trabajo original en la investigación estructural del RyR, ya que no existen trabajos similares en cuanto a estudiarlo embebido tanto en membranas nativas de RS como en bicapas por técnicas de alta resolución.

Los estudios estructurales por técnicas de alta resolución (Crio-microscopía electrónica) han realizado un esfuerzo por dilucidar en tres dimensiones (3D) al RyR. Las contribuciones del microscopio electrónico y de los métodos de procesamiento de imagen a la estructura 3D del receptor mencionan que el RyR tiene dos partes principales: un dominio citoplásmico que es casi el 80 % de la masa del receptor con una forma similar a un prisma cuadrado (28x28x12 nm) y una parte más pequeña del 20 % de la masa que corresponde a la región transmembranal y que sobresale de la anterior unos 7 nm. Además localizan una pequeña proteína conocida como FKBP12, un dominio estructuralmente importante para diferenciar entre el estado abierto y cerrado, llamado abrazadera (C) y, también mencionan una manija (H) la cual conecta el dominio C con la parte central del lado citoplásmico del tetrámero (Fig. 7).

Una desventaja del anterior estudio es la utilización de la reconstrucción y de la aproximación por computadora de alrededor de unas 3500 a 5700 imágenes obtenidas en diferentes ángulos para poder obtener una imagen del RyR en cualquiera de sus estados conformacionales. La necesidad de embeber al RyR purificado en hielo y depositar una capa delgada de carbón que sirve como recubrimiento para que el haz de electrones pueda tener acceso al RyR puede alterar la estructura del receptor

La comparación entre los valores determinados por MFA del dominio citoplásmico del RyR en su estado basal (ver Tabla 1), respecto a diámetro del canal central, diámetros de la silueta y altura del dominio citoplásmico, concuerdan con estudios de microscopía electrónica donde los valores reportados para la altura es de 120 nm, la silueta de 200 nm y la apertura del canal de 2 nm (Franzini-Armstrong *et al.*, 1970, Saito *et al.*, 1984).

Por otro lado, la técnica de MFA tiene una ventaja sobre los anteriores estudios 3D del RyR al permitir detectar, medir y registrar los cambios estructurales en el dominio citoplásmico del RyR embebido en su membrana nativa de RS, que no ha sido posible de ser detectada por técnicas de microscopía TEM y SEM.

Para interpretar las medidas del pie del RyR como un movimiento de la masa de cada subunidad cuando el RyR sufre un cambio conformacional, nos apoyamos en los valores obtenidos por MFA del estado basal y en lo reportado por Saito en 1984. Este movimiento que sufre en posición vertical la silueta -valores D1 y D2- puede explicarse como un repliegue de la masa que hace evidente la flexibilidad que tiene el RyR en su dominio citoplásmico.

Ahora bien, algo que es perceptible y relevante en las alturas de los dominios citoplásmicos del RyR en sus estados conformacionales, es que aunque existen diferencias significativas al compararlos, parecen mantenerse constantes dentro de un intervalo. Ambos parámetros evaluados nos llevan a retomar el papel funcional que juega el receptor en el proceso de acople excitación-contracción en músculo.

Como se mencionó en la introducción en el proceso de acople excitación-contracción, las membranas de los túbulos t sufren una despolarización que activa a los DHPR propiciándole un cambio conformacional que se propaga al RyR por un acople directo entre estas dos proteínas.

Se propone en los DHPR el desplazamiento de una subunidad  $\alpha$  que interactúa con el pie del RyR. Podría pensarse que el incremento de un 6.2 % en la altura del dominio citoplásmico, es para garantizar que el acople directo entre el DHPR y el RyR se lleve a cabo con mayor eficacia, garantizando así la activación que resulta en la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde las pozas intracelulares hacia el citoplasma. El incremento podría ser necesario y fundamentado al existir un espacio de 160 Å (16 nm) reportado por estudios de microscopía electrónica de ambos sistemas membranales

Por otro lado, la disminución en un 14 % de la altura del dominio citoplásmico así como del repliegue que sufre en su silueta disminuiría la eficiencia del acople de la subunidad  $\alpha$  del DHPR con el RyR, inhibiendo la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citoplasma y con ello la contracción muscular.

Es evidente que este dominio equivalente al 80 % de la masa del RyR, es de vital importancia en tal proceso.

Los cambios en la estructura del pie del RyR inducidos por ryanodina sugieren una gran flexibilidad de esta estructura lo cual se puede asociar a la propiedad que tienen los canales iónicos en su cinética rápida para que su cambio conformacional de un estado funcional a otro sea lo bastante modesto para poder ser reversible y no perder su estructura. Lo anterior podría representar el estado energético más favorable para el RyR en su forma activada o inhibida por ryanodina.

Al comparar el estudio del RyR por MFA con uno de los trabajos pioneros que aborda la estructura pentamérica del receptor de acetilcolina nicotínico (AChR) expresado en ovocitos de *Xenopus* (Fig. 12), se aprecian notables ventajas en cuanto a la resolución espacial obtenida al resolver la parte que sobresale de la membrana. Pero cabe mencionar que el RyR es uno de los receptores intracelulares más grandes hasta ahora reportados.



Las conclusiones a las que se ha llegado en este estudio son:

- El procedimiento seguido para aislar fracciones de membrana del retículo sarcoplásmico es adecuado para obtener fracciones *enriquecidas* en RyR.
- La adherencia se optimizó utilizando como substrato el monocristal de silicio
- El monocristal presenta un patrón superficial adecuado para aplicar la técnica de MFA en su modalidad de contacto.
- La arquitectura estructural de la fracción de membrana de músculo esquelético se caracterizó por MFA, permitiendo visualizar su textura y densidad macromolecular.
- Se identificó la parte más importante del RyR “el dominio citoplásmico” en membranas nativas de RS
- Se determinó el estado conformacional del dominio citoplásmico del RyR en condiciones basales, de activación y de inhibición.
- La MFA permitió caracterizar, medir y evaluar los cambios estructurales asociados a la modulación en el dominio citoplásmico por la ryanodina.
- La MFA permite caracterizar, distinguir y visualizar la estructura cuaternaria de receptores de membrana sin necesidad de cristalización.
- La técnica es una alternativa poderosa para realizar estudios estructurales en el área biológica. Y que podría hacer posible en un futuro la caracterización de arreglos intermoleculares e interacciones, tales como ligando-receptor y/o el complejo anticuerpo-receptor.

Este trabajo ha abierto la posibilidad a nuevos experimentos los cuales permitirán profundizar en el conocimiento de la estructura tridimensional del RyR. Algunas de las metas a seguir en un futuro de este proyecto:

#### **A Corto Plazo.**

- Caracterizar cambios asociados a diferentes moduladores del RyR en la misma fracción de RSP depositada en substratos de silicio.
- Determinar los cambios inducidos por la cafeína como un agente activador del canal y rojo de rutenio como un antagonista del canal.

#### **A Mediano Plazo.**

- Implementar y establecer los parámetros de la técnica de MFA en su modalidad de contacto, bajo condiciones acuosas.
- Evaluar las propiedades mecánicas (elasticidad y viscosidad) de bicapas lipídicas por MFA.
- Realizar fusiones de vesículas aisladas de RSP con bicapas para caracterizar al RyR bajo condiciones *in situ*.

#### **A largo Plazo.**

- Expresar el cDNA que codifica para el RyR en células de insecto.
- Producir mutantes insensibles a activadores o inhibidores del RyR como control para comprobar los cambios asociados a diferentes moduladores en el dominio citoplásmico.
- Purificar las mutantes y el RyR silvestre de las membranas de células de insecto e incorporarlas a bicapas lipídicas para garantizar que la estructura identificada por MFA corresponde al RyR.

- 1) Ashley C. C., I. P. Mulligan, and T. J. Lea.  $Ca^{2+}$  and activation mechanisms in skeletal muscle. *Q. Rev. Biophys.* 24:1-73, (1991).
- 2) Bath M., J. Zhao, W. Zang, C. Balke, H Takeshima, W. Wier and J. Ma. Caffeine-induced release of intracellular  $Ca^{2+}$  from chinese hamster ovary cells expressing skeletal muscle ryanodine receptor (effects on full-length and carboxyl-terminal portion of  $Ca^{2+}$  release channel). *J. Gen. Physiol.* 110:749-762, (1997).
- 3) Bertazzon, A., Conti-Tronconi, B., & Raftery, M., Scanning tunneling microscopy of acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89:9632-9636, (1992).
- 4) Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Scanning Force Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 56:930-933, (1986)
- 5) Block B. A., T. Imagawa, K. P. Campbell, and C. Franzini-Armstrong. Structural evidence for direct interaction between the molecular components of the transverse tubule/sarcoplasmic reticulum junction in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 107:2587-2600, (1988).
- 6) Bustamante C., Erie D. & Keller D. Biochemical and structural applications of scanning force microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 4:750-760, (1994)
- 7) Bustamante C. & Keller D. Scanning force microscopy under aqueous solutions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:709-716, (1997)
- 8) Cannell B. M. and Soeller C Sparks of interest in cardiac excitation-contraction coupling. *TiPS-January*, vol 19, (1998).
- 9) Clapham D. Calcium signaling. *Cell*, 80:259-268, (1995).
- 10) Coronado R., Morrissette J., Sukhareva M. and Vaughan M. Structure and function of ryanodine receptor. *Am. J. Physiol.* 266 (Cell Physiol.35): C1485-C1504, (1994).
- 11) Chu A., et al. Ryanodine as probe for the functional state of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium release channel. *Mol. Pharmac.* 37:735-741, (1990).
- 12) Ekert R. y Randall D. *Fisiología Animal. Mecanismos y Adaptaciones.* 3ª edición Interamericana/McGraw-Hill. (1992)
- 13) Engel A. Biological applications of scanning probe microscopes. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 20:79-108, (1991).
- 14) Fleischer S and M. Inu Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 18:333-364, (1989).

- 15) Franzini-Armstrong C. and C. Nuzi. Junctional feet and particles in the triads of a fast-twitch muscle fiber. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 4:233-252, (1983).
- 16) Franzini-Armstrong C. and A. O. Jorgensen. Structure and development of e-c coupling units in skeletal muscle. *Annu. Rev. Physiol.* 56:509-534, (1994).
- 17) Franzini-Armstrong C. and F. Protasi. The ryanodine receptor of striated muscles, a complex capable of multiple interactions. *Physiol. Rev.* 77:699-729, (1997).
- 18) Hakamata Y., J. Nakai, H. Takeshima and K. Imoto. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett.* 312:229-235, (1992).
- 19) Lal R. and S. A. John. Biological applications of atomic force microscopy. *Am. J. Physiol.* 266 (Cell Physiol. 35): C1-C21, (1994)
- 20) Lowry O. H. et al., Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, (1951).
- 21) Marty I. et al., . Transmembrane orientation of the N-terminal and C-terminal ends of the ryanodine receptor in the sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. *Biochem. J.* 298:743-749, (1994).
- 22) Mikrut M. and MacDonald C. Analysis of red blood cell cytoskeleton using the explorer lifesciences AFM. *Appl. TopoMetrix.* 94-1:1-2, (1993).
- 23) Murray C., Kagan R. and Bawendi G. Self-Organization of CdSe Nanocrystallites into Three-Dimensional Quantum Dot Superlattices. *Science.* 270:1335-1338, (1995).
- 24) Orlova E. V., Serysheva I. I., van Heel M., Hamilton S. L. and Chiu W. Two structural configurations of the skeletal muscle calcium release channel. *Nature Struct. Biol.* 3:547-552, (1996).
- 25) Pessah , I.N., & I. Zimany. Characterization of multiple ( $^3\text{H}$ )ryanodine binding sites on the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from skeletal and cardiac muscle: evidence for a sequential mechanism in ryanodine action. *Mol. Pharmacol.* 39:679-689, (1991).
- 26) Protasi F., X. H. Sun and C. Franzini-Armstrong. Formation and maturation of calcium release apparatus in developing and adult avian myocardium. *Dev Biol.* 173:265-278, (1996).
- 27) Protasi F., Franzini-Armstrong C., and Allen D. P. Role of ryanodine receptors in the assembly of calcium release units in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 140 (4):831-842, (1998).

- 28) Quinn K. E., Castellani L., Ondrias K. And Ehrlich B. E. Characterization of the ryanodine receptor/channel of invertebrate muscle. *Am. J. Physiol.* 43(2):R 494-R 502, (1998).
- 29) Rios E. and G. Pizarro. Voltage sensor of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* 71:849-908, (1991).
- 30) Saito A., M. Inui, M. Radermacher, J. Frank and S. Fleischer. Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 107:211-219, (1988).
- 31) Serysheva I., E. Orlova, W. Chiu, M. B. Sherman, S. L Hamilton and M. van Heel. Electron cryomicroscopy and angular reconstitution used to visualize the skeletal muscle calcium release channel. *Nature Struct. Biol.* 2:18-24, (1995).
- 32) Shao Z., J. Yang and A. P Somlyo. Biological atomic force microscopy: From microns to nanometers and beyond. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:241-265, (1995).
- 33) Sorrentino V. and P. Volpe. Ryanodine receptors: how many, where and why?. *Trends pharmacol. Sci.* 14:98-103, (1993).
- 34) Sutko J. L. and J. A. Airey. Ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels: does diversity in form equal diversity in function?. *Physiol. Rev.* 76:1027-1071, (1996).
- 35) Sun X.H., F. Protasi, M. Takahashi, H. Takeshima, D. G. Ferguson and C. Franzini-Armstrong. Molecular architecture of membranes involved in excitation-contraction coupling of cardiac muscle. *J. Cell Biol.* 129:659-671, (1995).
- 36) Takeshima et al. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature.* 339:439-445, (1989).
- 37) Wagenknecht T. and Radermacher M. Ryanodine receptor: structure and macromolecular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:258-265, (1997).
- 38) Wagenknecht T and Radermacher M. Three-dimensional architecture of skeletal muscle ryanodine receptor. *FEBS Letters.* 369:43-46, (1996).