

El “cuplón”, unidad funcional del acoplamiento contráctil

Eduardo Ríos^{1*}

Resumen

Este artículo examina la evolución del concepto de cuplón, unidad funcional del acoplamiento contráctil, originado hace más de quince años con los colegas Gonzalo Pizarro y Michael Stern. Este examen nos permitirá poner al día avances en el estudio del acoplamiento entre la excitación de origen nervioso y la contracción muscular. Como se verá, la investigación en el tema ha tenido recientemente un claro viraje hacia la búsqueda de formas de aplicación de los conceptos básicos en la prevención y el tratamiento de varias enfermedades. A su vez, el estudio de mutaciones hereditarias en las proteínas del cuplón permitió nuevos avances en la comprensión de las interrogantes más básicas (cuáles son sus funciones y sus interacciones supramoleculares) en una feliz y bastante inesperada potenciación mutua entre enfoques muy diferentes de la realidad. Este artículo sigue un desarrollo iterativo, describiendo primero los aspectos básicos del tema, pasando luego a los estudios aplicados, y a través de ellos volviendo a cuestiones fundamentales, ahora en pleno proceso de esclarecimiento.

Palabras Claves

Músculo, corazón, membranas celulares, canales iónicos, hipertermia maligna, señales de calcio.

Title

The “couplon”; functional unit of excitation-contraction coupling.

Abstract

The article traces the evolution of the “couplon” concept as functional unit of excitation-contraction coupling, a concept originated with colleagues Gonzalo Pizarro and Michael Stern more than 15 years ago. In the article I update advances in the study of the coupling between excitation, which is originated in the nervous system, and contraction of muscle. As I shall show, research on the topic recently experienced a marked turn towards a quest for ways to apply the basic understanding of function, acquired earlier, to the prevention and treatment of various diseases. Reciprocally, the study of inherited mutations in the couplon proteins led to new advances in our understanding of basic questions (about functions and interactions of these molecules) in a virtuous and quite surprising mutual potentiation between two very different approaches. Consequently, the article develops through iterations, first describing the basic aspects of function, proceeding later to the applied or translational disease studies, and then using the latter to get back to fundamental questions, now in final stages of clarification.

Key words

Muscle, heart, cell membranes, ionica channels, malignant hyperthermia, calcium signaling

¹ Section of Cellular Signaling, Department of Molecular Biophysics and Physiology, Rush University, Chicago, IL, USA

* Contacto: Eduardo Ríos. E-mail: Eduardo_Rios@rush.edu

Tabla de contenido

El “cuplón”; unidad funcional del acoplamiento contráctil

Introducción

El cuplón

Evolución del concepto de cuplón

Avances en morfología

Nuevas observaciones funcionales

La bioquímica se complica

Enfermedades del cuplón

Mutaciones

La “terminación” y sus defectos

La calsequestrina y sus varias funciones

Controles desde el interior del retículo sarcoplasmático

Alambres de calcio, y depósitos inteligentes

Redefiniendo el cuplón

Nota de agradecimiento

Referencias

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS

Acrónimo	Definición
RS	Retículo sarcoplasmático
TT, túbulo T	Túbulo transverso
AEC	Acoplamiento excitación-contracción, acoplamiento contráctil
RyR, RyR1-3	Receptor de rianodina, 3 isoformas
DHPR	Receptor de dihidropiridinas
Cav1.1, Cav1.2	Subunidades principales de los DHPR
LCIC	Liberación de calcio inducida por calcio
STORM	Microscopía de reconstrucción óptica aleatoria
LCID	Liberación de calcio inducida por despolarización
Casq, Casq1, Casq2	Calsequestrina, en dos isoformas
CPVT	Taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica
HM	Hipertermia maligna
DI-DIV	Segmentos “calientes” de los RyR
EM, crio-EM	Microfotografía electrónica y su variante en moléculas congeladas
CCD	Enfermedad de cuerpos centrales
Y522S, YS	Mutación de RyR1 asociada a HM
BAPTA	Amortiguador o tampón de calcio
D4cpv	Biosensor de calcio de tipo “camaleón”
CAM	Calmodulina
FRET	Transferencia de energía resonante, o de Förster
SERCA	Bomba de calcio del RS (y retículo endoplasmático)
IDC	Inactivación dependiente de calcio
[Ca ²⁺] _{xx}	Concentración de calcio iónico en compartimiento XX

INTRODUCCIÓN

Para que los músculos estriados (esquelético y cardíaco) se contraigan, es necesario que se una el elemento calcio a estructuras proteicas del aparato contráctil, y eso requiere un aumento rápido en la concentración de calcio iónico libre en el citosol de las células musculares. Tanto en el corazón como en los músculos esqueléticos ese calcio es provisto por un organelo de almacenamiento (el retículo sarcoplasmático, RS, que es una división especializada del retículo endoplasmático) cuyas zonas dedicadas al depósito y entrega rápida de calcio, las cisternas terminales, se disponen periódicamente a lo largo de las células, en el interior de las mismas. En el músculo esquelético, ilustrado en la figura 1, las cisternas se encuentran

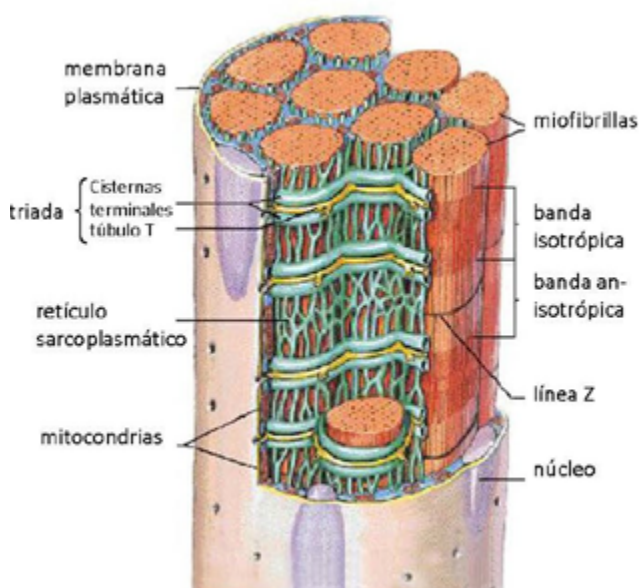


Figura 1. Estructura de la célula muscular esquelética o miofibrila de mamífero. En el músculo humano el diámetro es cercano a 30 μm . El material contráctil se dispone en miofibrillas cilíndricas (de aproximadamente 1 μm de diámetro; no se respeta en el diagrama la relación entre diámetro de fibra y miofibrilla). El retículo sarcoplasmático rodea las miofibrillas, como un manguito dedicado al acoplamiento contráctil. Los túbulos T son invaginaciones de la membrana plasmática, y forman triadas con dos cisternas terminales del retículo sarcoplasmático. Las triadas incluyen dos “junturas” donde se encuentran muy cercanas las membranas de túbulo y cisternas. Es allí que se encuentran los actores centrales del proceso de liberación de calcio. Las proteínas SERCA, atpasas que se encargan de la captación de calcio, se distribuyen densamente por toda la membrana del retículo sarcoplasmático, exceptuando solamente su parte juntural.

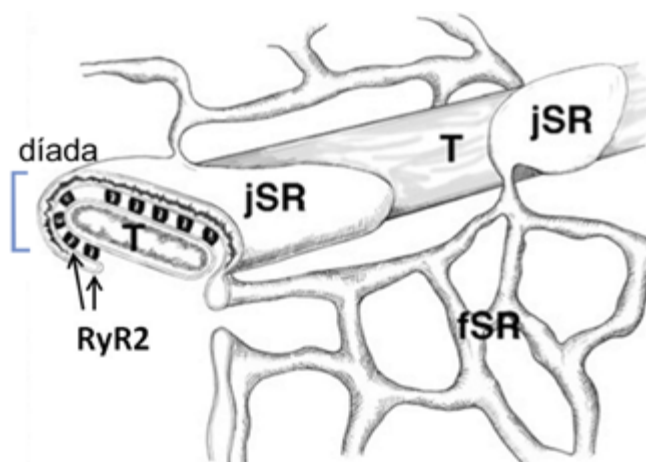


Figura 2. Estructuras junturales en la célula del músculo ventricular cardíaco. La diferencia principal con las junturas de músculo esquelético es el menor tamaño de las cisternas terminales (jSR). Estas cisternas tienen formas irregulares, que envuelven parcialmente el túbulo T y nunca llegan a formar triadas. Otra diferencia radica en la comunicación entre cisternas terminales y el resto del RS, que son mucho más limitadas en el miocito cardíaco, resultando en una limitación a la difusión de calcio que hace más rápida la depleción o agotamiento del contenido de calcio cuando en estas células se libera el ion desde el RS hacia el citosol. Diagrama modificado de Brochet DX *et al.* [48]. ©2005 National Academy of Sciences, U.S.A.

en pares, a ambos lados de invaginaciones de la membrana plasmática llamadas túbulos transversos (TT), formando con ellos las denominadas “uniones triada”, donde las membranas intracelular (del retículo sarcoplasmático) y celular o plasmática (de los túbulos transversos) se encuentran juntas, paralelas, pero sin fusionarse. En los cardiomiocitos (Figura 2) se encuentra una aposición similar, pero las cisternas terminales no se aparean, debido a que son mucho más pequeñas. Por esa razón la estructura correspondiente puede ser una diada, formada por una cisterna y la membrana tubular, o una “cupla periférica”, que así se denomina la unidad estructural y funcional formada por una cisterna y una región especializada de membrana plasmática no tubular [1].

Es en esta cercana aposición de una membrana eléctricamente excitable (la plasmática) y otra eléctricamente inerte (la del retículo sarcoplasmático) que la señal eléctrica (el potencial de acción que viaja por los túbulos transversos) comanda la apertura y posterior cierre de los canales de calcio del RS. Ese es el escenario donde transcurre

la función que desde Sandow [2] se denomina acoplamiento excitación-contracción, AEC, o acoplamiento contráctil.

En el año 1988, en base a estudios estructurales y funcionales en ranas, peces y roedores, se había llegado a una idea bastante clara de la importancia y disposición espacial de dos proteínas clave en este proceso, presentes en la porción “de juntura”¹ respectivamente de la membrana del retículo sarcoplasmático y del túbulo transverso: el canal de liberación de calcio [3], también llamado receptor de rianodina (RyR por su nombre en inglés *ryanodine receptor*), y el canal de calcio tipo-L o receptor de dihidropiridina (DHPR² por *dihydropyridine receptor*) [4, 5]. Otros nombres del DHPR son Cav1.1 en músculo esquelético (donde también se le conoce como “sensor de voltaje”, en referencia a su función principal) y Cav1.2 en músculo cardíaco³.

La disposición de estas moléculas en las junturas de músculo esquelético está indicada en la figura 3. Allí los receptores de rianodina, presentes en la membrana del retículo sarcoplasmático, forman una doble fila y los DHPR (en la membrana del túbulo transverso) se enfrentan a ellos en forma estequiométrica. Los DHPR (polímeros de 5 subunidades distintas) forman tétradas (de cuatro heteropentámeros). Como se ve en el diagrama 3A, los DHPR se disponen prolijamente, uno por cada dos receptores de rianodina, apareados a uno y saltando el siguiente. Los receptores de rianodina son grandes polímeros de 4 protómeros idénticos, cada uno de ellos constituido por más de 5000 residuos aminoácidos. Las observaciones realizadas con microscopía electrónica indican que cada protómero está en aposición directa con uno de los DHPR que forman la tétrada. La razón entre el número de DHPR y el de RyR es de 2 a 1 en los mamíferos (ya que se cuentan separadamente 4 DHPR por tétrada, y la aposición saltea uno de cada dos RyR), y aproximadamente 1 a 1 en otras especies. La diferencia se explicará más adelante.

En el músculo cardíaco los receptores de rianodina forman grupos mayores, de más de dos filas. La razón DHPR/RyR es menor y no estequiométrica. Los Cav1.2, es decir los DHPR del músculo cardíaco, forman canales sensibles al voltaje, que se abren cuando llega el potencial de acción, permitiendo la entrada de calcio desde el

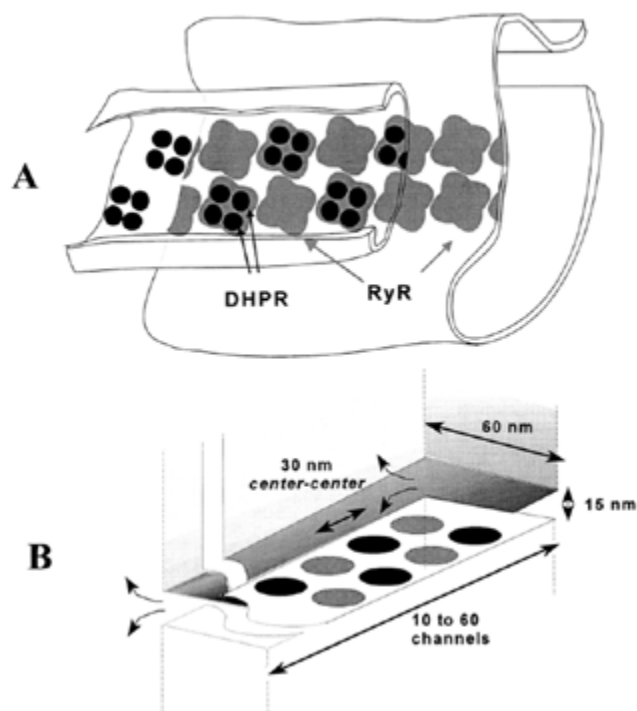


Figura 3. El modelo original del cuplón. En **A** se representan pictorialmente los componentes de la juntura de músculo esquelético conocidos en 1997, las tétrada de DHPR, residentes en la membrana del TT y los homotetrámeros de RyR1, canales de la membrana RS. En **B** se muestra la geometría usada en los cálculos numéricos. Los círculos representan orígenes o “fuentes” del flujo de calcio, una por canal. El calcio se vierte por los canales abiertos a una hendidura juntural estrecha, pero en amplia comunicación con el espacio citosólico. Si bien la tríada incluye dos junturas como la representada, una a cada lado del TT, los cálculos iniciales mostraron que el calcio proveniente de una no podía activar los canales de la otra, con lo que la interacción se ignoró en la computación final. Esos mismos cálculos llevaron a definir el cuplón como los sensores de voltaje y canales RyR de un lado de la tríada. Reproducido de Stern MD, *et al.* [16].

© 1997 Rockefeller University Press. *Journal of General Physiology*. 110:415-440

¹ Aunque la palabra no existe en el Diccionario de la Real Academia, llamaremos “juntural” a la porción de juntura o de unión, tanto del retículo sarcoplasmático como del túbulo transverso.

² Elegimos conservar el acrónimo DHPR, en vez de traducirlo, por simetría con el término RyR, que se ha impuesto universalmente para el receptor de rianodina.

³ La notación Cav1 (.1 o .2) se aplica a la subunidad principal, también llamada alfa-1, de estos canales, o a sus correspondientes genes. DHPR nombra al canal o sensor de voltaje completo, con todas sus subunidades. Acá usamos ocasionalmente Cav1 (.1 o .2) también para referirnos al canal completo cuando queremos distinguir entre las dos variedades.

exterior. Este influjo, comparativamente pequeño, tiene como función causar la apertura de los receptores de rianodina en la juntura, en virtud de la susceptibilidad, intrínseca a todos los receptores de rianodina (presentes en todos los músculos, y abundantes también en el sistema nervioso), de ser estimulados a abrirse cuando el calcio se une a su faz citosólica. El flujo de calcio hacia el citosol es entonces debido a “liberación de calcio inducida por calcio” (LCIC; en inglés, CICR [6, 7]).

EL CUPLÓN

Por simple inspección del diagrama 3A puede concluirse que el mecanismo de control de los canales receptores de rianodina no puede ser primariamente mediado por calcio. Un mecanismo “químico”, sináptico, como lo es el de liberación de calcio inducida por calcio, no necesita la aposición estequiométrica entre el emisor y el receptor de la señal.

La señal, presente en músculo esquelético, debía ser, a todas vistas, mecánica, un empujón, del sensor (Cav1.1) a receptor (RyR). Ese mecanismo, que había sido propuesto muchos años antes como el movimiento de un simple tapón [8], fue categorizado como alostérico en 1993 [9], cuando demostramos una analogía muy estrecha con los fenómenos alostéricos clásicos, y una aplicabilidad directa de los formalismos cuantitativos desarrollados por Monod, Wyman y Changeux para describir dichos fenómenos en la hemoglobina [10]. El término “alostérico” (otro sitio) se justifica en que el sensor abre el canal “tocándolo” en un sitio de contacto alejado de la compuerta propiamente dicha. El enorme receptor de rianodina terminaría revelándose como una molécula maestra en distintas formas de alostería o alosterismo.

Ya en 1988, con Gonzalo Pizarro [11], propusimos que el receptor de rianodina inmediatamente adjunto al Cav1.1 se abre primero, en respuesta directa a los movimientos de aquél, y luego el calcio que fluye por éste al citosol activa al o los receptores de rianodina cercanos, que no tienen Cav1.1 asociado. Este mecanismo híbrido tiene la virtud de justificar tanto la estequiometría exacta (una tétrada de DHPR cada dos RyR) como la activación de canales no directamente controlados por un sensor de voltaje.

El problema presentado por la existencia de canales no directamente ligados a un sensor de voltaje se volvió más urgente con la descripción, primero en músculo cardíaco [12] y más tarde en músculo esquelético de rana [13], de las chispas de calcio, identificadas luego como los componentes elementales -los ladrillos- que construyen la señal celular. Algunos aspectos de estos eventos se ilustran en la figura 4. El panel 4A muestra chispas en una imagen de fluorescencia de un indicador de calcio (fluo-4) en el citosol de una fibra esquelética de rana. Dichas chispas pueden generarse espontáneamente, inducirse con fármacos o aparecer como componentes discretos en respuesta a una despolarización. El panel B muestra un promedio de múltiples chispas, localizadas automáticamente en imágenes obtenidas en varias células⁴.

La activación de chispas subsecuente a un potencial de acción en músculo cardíaco (donde los RyR no están físicamente asociados a sensores de voltaje) no puede ser otro que LCIC. La similitud entre las chispas cardíacas y de músculo esquelético hizo más verosímil el mecanismo imaginado con Pizarro [11], que invocaba LCIC secundaria a LCID. Este modelo quedó como simple propuesta hasta 1996, cuando demostramos con Natalia Shirokova que aspectos curiosos del curso temporal del flujo de liberación de calcio, y especialmente su dependencia con el voltaje impuesto a la membrana plasmática, se explicaban muy bien con el modelo híbrido [14]. Pero el “test” más convincente, hecho por simulación MonteCarlo [15] de chispas y de la respuesta celular global, fue publicado con Pizarro y Michael Stern en 1997 [16].

El modelo, que es una versión cuantitativa de la idea inicial, se ilustra en el diagrama 3B. Los RyR forman una doble fila, donde alternan los que tienen sensor de voltaje (identificados como “V”) y los tipo “C”, que al no tenerlo se suponen sólo controlados por el nivel local de calcio. Con

⁴ La imagen 4A se obtuvo por “escaneo de línea”, donde la ordenada representa espacio, la abscisa tiempo, y la intensidad de fluorescencia está codificada en el color. En el diagrama del panel B la intensidad se representa en el eje vertical, en valor normalizado a la intensidad de reposo. Para indicadores como fluo-4 esa magnitud sin dimensión es aproximadamente igual a la razón: concentración de indicador unido a Ca/indicador unido a Ca en reposo. Esa razón a su vez es una aproximación gruesa al cociente entre la concentración local de calcio libre y el valor de reposo.

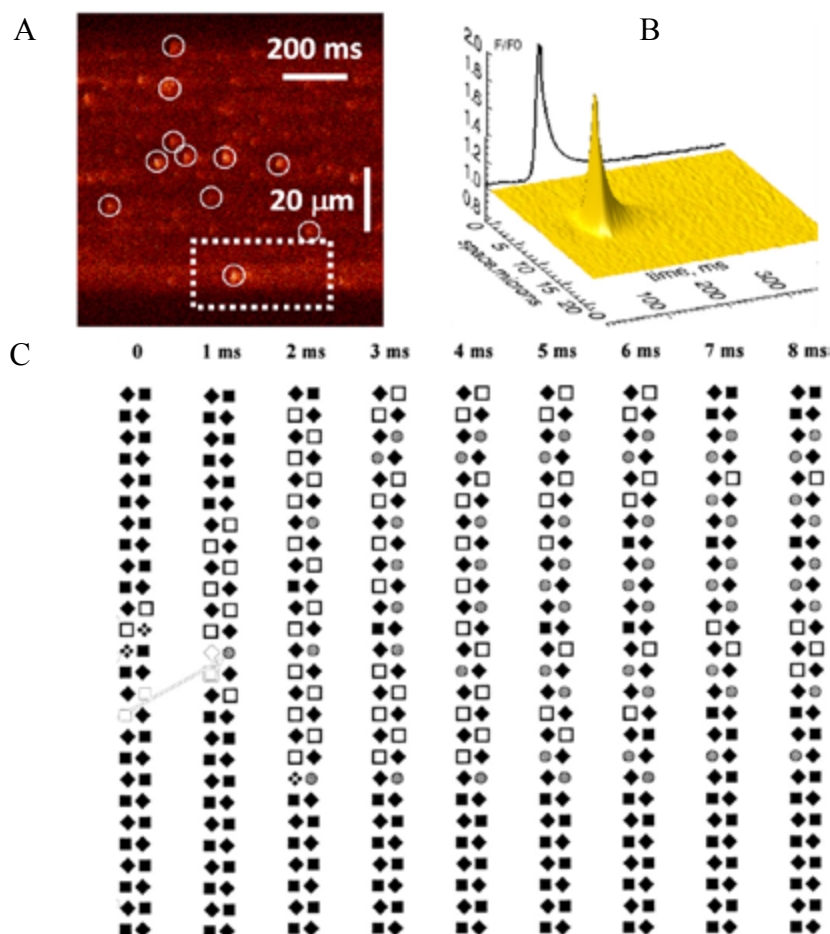


Figura 4. Chispas de calcio y su simulación.

A, múltiples chispas en una imagen por escaneo de línea (ver nota al pie # 13) de la fluorescencia del indicador fluo-4 en una fibra de músculo esquelético de rana. Un detector automático identificó 4100 eventos en 200 imágenes tomadas de 6 células. Los eventos identificados en la imagen del panel A se marcaron con círculos.

B, regiones rectangulares conteniendo cada evento identificado (como la región marcada en la parte inferior del panel A) se promediaron para obtener la chispa representada en B. En esta gráfica tridimensional la intensidad de fluorescencia de la chispa promedio se representa en el eje vertical. La curva en trazo negro es la proyección de la chispa promedio en el plano (intensidad-tiempo) y permite apreciar las características temporales del fenómeno, incluyendo un tiempo de subida (tiempo al pico) de ~7 ms y un descenso más o menos exponencial. Imágenes modificadas de Launikonis *et al.* [58].

C, simulación de una chispa de músculo esquelético. Una realización de MonteCarlo del modelo esquematizado en la figura 3. La representación incluye 9 instantáneas, que muestran el estado de cada uno de los canales que constituyen el cuplón. Se supuso que los canales alternan entre dos tipos, “V”, controlados por sensores de voltaje (DHPR) residentes en la membrana TT, y “C” cuyo estado (cerrado, abierto o inactivado) depende de la concentración de calcio que enfrentan (del lado citosólico), y del tiempo. A tiempo 0 se supuso que dos canales V estaban activados y habían abierto dos canales C vecinos. El flujo de calcio suministrado por estos 4 canales abiertos fue suficiente para activar más canales adyacentes y se produjo un evento que se propagó por el cuplón en ambas direcciones, llegando a activar un máximo de 15 canales (a tiempo 2 ms). Luego el evento se apagó espontáneamente, porque los canales abiertos y otros aún cerrados se inactivaron. Tanto el curso temporal como la magnitud (espacial y temporal) de estos eventos simulados, son similares a los de las chispas observadas experimentalmente. Reproducido de Stern MD *et al.* [16]. © 1997 Rockefeller University Press. Journal of General Physiology. 110:415-440

algunas hipótesis adicionales simples, referidas a la forma en que un canal “V” es controlado por el voltaje de la membrana plasmática a través de su sensor Cav1.1 asociado, y a la forma en que un canal “C” es controlado por el nivel de calcio local, el modelo pudo reproducir todas las observaciones realizadas hasta la fecha, al menos en forma cualitativa o aproximada.

Como lo muestra una instancia (o resultado individual) de una simulación MonteCarlo, representada en la figura 4C y explicada mejor en la leyenda, canales de la doble hilera de un lado de la tríada se activan unos a otros, secuencialmente, a punto de partida de uno o dos canales V activados por sus correspondientes sensores. Esa activación colectiva reproduce bien las propiedades espaciales y temporales de una chispa de calcio, tanto en el cuplón de músculo esquelético [16] como el cardíaco [17, 18].

Las chispas de calcio constituyen así la respuesta elemental (indivisible, al estar los canales conectados por el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio) de un grupo de canales y sus sensores Cav1.1. Ese grupo queda entonces identificado como unidad funcional. La tríada se compone de dos junturas, una a cada lado del túbulo transversal. Como fue fácil demostrar que la activación de los canales de una juntura no se propaga a la que está del otro lado de la tríada, se infirió que la unidad funcional incluye

sólo los canales y sensores de una juntura, de un lado del túbulo T. A esa unidad le llamamos cuplón (*couplon* en el original [16]). En 1999 extendimos la definición al músculo cardíaco [17]. Como allí la estructura (y un sinnúmero de evidencias experimentales) excluían la activación directa, alostérica, por los Cav1.2, nuestra modelación sólo supuso la existencia de canales (RyR) tipo C, es decir, activados por calcio. Esa simulación, simplificada por la ausencia de conexiones directas receptores de rianodina-Cav1.2, se destinó en buena parte a explorar la posibilidad de una interacción alostérica, mecánica, de los receptores de rianodina entre sí, ya que la condición necesaria para ese tipo de interacción, el contacto entre moléculas, está implícito en el arreglo casi cristalino de los cuplones esquelético y cardíaco. Si bien varios trabajos posteriores continuaron explorando la posibilidad de efectos alostéricos entre canales RyR (el más convincente presentado este año en forma preliminar por Julio Copello [19]), aún no se ha llegado a una demostración fehaciente de su existencia.

EVOLUCIÓN DEL CONCEPTO DE CUPLÓN

Avances en morfología.

La idea del cuplón como unidad funcional, ligada por mecanismos alostéricos (contacto) y químicos (difusión de calcio), fue rápidamente elaborada y usada como soporte conceptual por varios grupos de investigadores. El primer estudio importante consistió en una cuidadosa recopilación de la información estructural, obtenida con microscopio electrónico, para calcular el número de canales de receptores de rianodina en cuplones esqueléticos y cardíacos en distintas especies [20].

La morfología del cuplón esquelético es relativamente fácil de definir. Siempre se observan dobles filas de canales, y la longitud de la región juntural de la membrana del retículo sarcoplasmático, donde dichos canales están presentes, está acotada entre 0.5 y 1 micra⁵. En la doble fila del cuplón esquelético los receptores de rianodina se disponen a distancias regulares de unos 30 nm (nanómetros o milimicras) entre centros, con lo que el número de canales en un cuplón de una micra deber ser 66. Hay cuplones mucho más cortos, y el promedio es de unos 40 canales por cuplón [20].

En músculo cardíaco los canales se disponen en filas múltiples, de allí que las estimaciones iniciales alcanzaran números muy grandes. A diferencia de la microscopía electrónica, las técnicas ópticas permiten trabajar con células frescas. Pero los límites de resolución de la microscopía óptica convencional en la práctica restringen la resolución a media micra, precisamente la medida típica de un cuplón; de allí la importancia de los llamados métodos ópticos de súper-resolución, que se han incorporado recientemente.

Tal vez, el más interesante de estos métodos sea “STORM” (microscopía de reconstrucción óptica aleatoria [21]), donde la preparación se tiñe por inmunofluorescencia (anticuerpos anti-receptores de rianodina más anticuerpos fluorescentes secundarios) y la fluorescencia se atenúa hasta detectar luz de moléculas individuales⁶. Miles de observaciones repetidas permiten reconstruir imágenes moleculares, de resolución sólo limitada por el ruido. Christian Soeller y colaboradores obtuvieron las primeras imágenes de receptores de rianodina usando esta técnica [22]; los resultados modifican la idea estructural del cuplón cardíaco. Como se ilustra en un diagrama de Edwin Moore y colegas ([23] Figura 5), se pasó de un “panqueque” continuo de muchos canales a una “pizza”, con canales dispuestos en grupos más pequeños, irregulares, múltiples, que incluyen canales solitarios⁷.

Este cambio en la imagen estructural del cuplón cardíaco sirvió para explicar varias observaciones experimentales, incluyendo que las chispas de calcio cardíacas sean menores en amplitud que las

⁵ La cota se debe a que las miofibrillas individuales tienen aproximadamente una micra de diámetro, los túbulos T rodean transversalmente a las miofibrillas, ramificándose como polígonos, y las regiones junturales, que están en los lados de dichos polígonos, no pueden tener longitud mayor que un diámetro de miofibrilla.

⁶ Lo que limita la resolución de la microscopía óptica es la interferencia entre fotones originados en moléculas cercanas. La idea central de STORM y otras formas de “microscopía por moléculas individuales” es atenuar la emisión de fluorescencia, por distintos métodos, de modo que los anticuerpos fluorescentes actúen en forma suficientemente infrecuente y aislada como para poder identificar bien el sitio donde se originó la luz. La contracara de estos métodos es la necesidad de recoger fotones por largo tiempo, en observaciones repetidas, para poder armar una imagen.

⁷ “*rogue channels*”, que podría traducirse como “canales matreros”, aunque Google prefiera “truhanes”.

esqueléticas, aunque los gradientes de concentración que impulsan el pasaje de calcio hacia el citosol sean similares y a pesar de que los tiempos de canal abierto sean mayores en el corazón.

Otro avance, que alteró especialmente nuestra idea del cuplón de músculo esquelético, fue la demostración, mediante microscopía electrónica, de la presencia de canales de receptores de rianodina fuera de la membrana juntural. Para empezar, se sabía que en los mamíferos la razón entre números de receptores de rianodina y de receptores de DHP es menor que en otras especies. Y que éstas poseen dos isoformas de receptores de rianodina, la isoforma 1, o “esquelética”, y la 3 (o “del cerebro”, dada su abundancia en ciertas zonas del sistema nervioso) en cantidades aproximadamente iguales (lo que explicaba la diferencia en la razón receptores de rianodina/receptores de DHP). Grupos de canales de receptores de rianodina fueron observados en 2002 ([24], Figura 6) en posición para-juntural, es decir, inmediatamente a los lados de la juntura. Debido a

que estos canales para-junturales se encontraron en anfibios y peces y no en la mayoría de los músculos de mamíferos, se infiere que los receptores de rianodina junturales son de isoforma 1 -RyR1- en los mamíferos. Cuando pudieron observarse los grupos para-junturales en corte tangencial, se encontró que su disposición es regular, pero los receptores de rianodina individuales ocupan vértices de triángulos, a diferencia de la disposición de los receptores de rianodina en la juntura, donde el polígono elemental es de 4 vértices. Por ello se supone que los grupos para-junturales son exclusivamente de isoforma 3 -RyR3-. Es decir, que la estructura casi cristalina de canales en doble fila prohíbe la mezcla de isoformas, tanto en la juntura como en los grupos para-junturales.

En suma, sólo el cuplón de los mamíferos se ajusta al modelo inicial diagramado en figura 3. En las otras especies la estructura también incluye un componente para-juntural. Pero nuevas observaciones pronto obligaron a seguir revisando el concepto de cuplón. En las secciones siguientes las repasamos, dividiéndolas algo arbitrariamente en observaciones funcionales y bioquímicas.

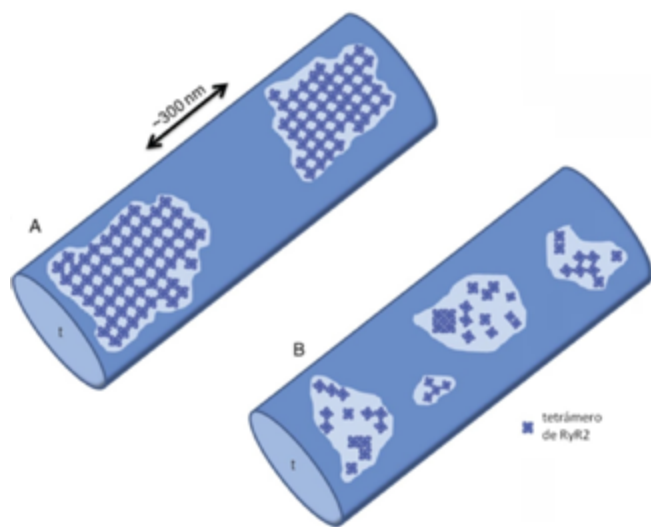


Figura 5. Evolución del concepto de cuplón cardíaco. Se representa en **A** la forma y dimensiones atribuidas inicialmente al cuplón cardíaco. Se suponía entonces que los tetrámeros de RyR2 cubrían toda el área juntural.

En **B** está la versión basada en estudios recientes de súper-resolución. Cada diada puede estar ocupada parcialmente por RyR. Éstos forman grupos de tamaño y orientación variables. Si bien los tetrámeros en contacto tienden a formar arreglos regulares, el “grupo cristalino” de estos arreglos puede variar. No se excluye la presencia de tetrámeros aislados. Diagrama modificado de Baddeley D, *et al.* [23]. © Oxford University Press

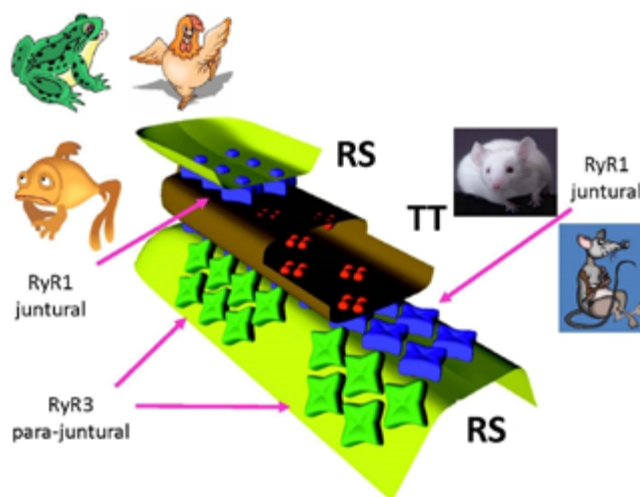


Figura 6. Dos isoformas del receptor de rianodina en el músculo esquelético. El diagrama muestra una triada. Cada juntura incluye tétradas de receptores de DHP (en rojo) y homotetrámeros de RyR1 (azul). Se representan también homotetrámeros de RyR3 (en verde) en posición para-juntural. Con algunas excepciones, los músculos de aves, peces y anfibios poseen ambas isoformas del RyR, mientras los de los mamíferos sólo tienen RyR1, en posición juntural. Modificado de Felder E, *et al.* [79].

Nuevas observaciones funcionales

En la última década, las observaciones funcionales en músculo cardíaco se orientaron a entender cómo y por qué termina la liberación de calcio (por ejemplo, por qué terminan las chispas), ya que se vio cómo una terminación excesivamente dilatada resultaba en arritmias, a veces letales. Este tema se considerará luego de presentar más información bioquímica y sobre enfermedades asociadas.

En músculo esquelético ya en 1998 se mostró que las chispas, componentes elementales y fundamentales de la señal de calcio en el músculo de rana, no ocurren normalmente en mamíferos, donde la liberación de calcio es bastante continua, y aparentemente controlada siempre por los sensores de voltaje [25,26]. La ausencia de chispas acompañada de ausencia de RyR de isoforma 3 y ubicación para-juntural, llevó a pensar que las chispas requieren canales RyR3, cosa que se demostró en 2007, con experimentos de expresión heteróloga de dicha isoforma en músculo de ratón. Dicha expresión resultó en un músculo quimérico, que respondía a la despolarización con chispas, a diferencia del músculo nativo del ratón, donde no hay ni RyR3 ni chispas [27].

Obviamente, la posición para-juntural de estos canales RyR3 sugiere que su mecanismo de activación, al igual que el de los cuplones de corazón en todas las especies, es exclusivamente por liberación de calcio inducida por calcio. Así se llegó a la unificación de tres categorías: el canal RyR3, la posición para-juntural y la activación por liberación de calcio inducida por calcio. Recíprocamente se unifica la activación del canal RyR1 con la posición juntural (en contacto con el Cav1.1) y la activación directa por despolarización (liberación de calcio inducida por despolarización, LCID). Estas conclusiones se resumen en la figura 7. Los mamíferos, y presumiblemente el ser humano, sólo tienen activación por despolarización, LCID (en la mayoría de sus músculos; en otros, como el diafragma y los maseteros, hay pequeñas cantidades de RyR3, que seguramente son activados por calcio).

Es bueno entonces reconocer que el modelo inicialmente propuesto con Pizarro [11] estaba acertado en su idea básica, de un mecanismo dual de activación, que incluía liberación de calcio inducida por despolarización y la inducida por calcio; pero ese mismo modelo estaba errado en

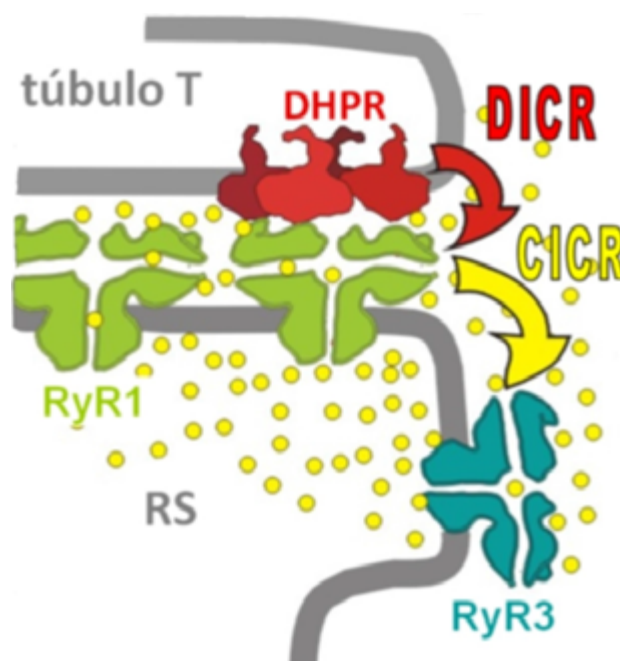


Figura 7. Los mecanismos de activación de la liberación de calcio en el músculo esquelético. Los receptores de DHP del túbulo T traducen la despolarización a una señal que induce la apertura de los RyR subyacentes en el retículo sarcoplásmico. Este mecanismo se denomina liberación de calcio inducida por despolarización (LCID o DICR). El calcio así liberado activa secundariamente los canales RyR3 vecinos, en posición para-juntural (LCIC o CICR). El calcio liberado así puede retroalimentar, potenciando el fenómeno. Se ignora por qué mecanismo se activan -si es que lo hacen- los RyR1 que no están enfrentados a sensores de voltaje. El esquema, tomado de Pouvreau *et al.* [27], ignora a propósito los mecanismos de inactivación, que se sabe existen, y los de control desde el interior del RS, por ahora hipotéticos.

aspectos importantes, como que la estructura de cuplón supuesta -sólo con componentes junturales- es precisamente la que no presenta liberación de calcio inducida por calcio. Puesto a filosofar, uno puede ver en el destino de este modelo un resumen de lo bueno y lo malo de todos los modelos. Ayudan a pensar, y a entender, pero pueden estar muy equivocados y nunca son suficientes.

Una pregunta lógica, consiguiente a estos avances, es por qué los mamíferos perdieron canales de isoforma 3, y con ellos el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio. La respuesta, sugerida por nuestra colega Elizabeth Stephenson, es simple: los mamíferos tienen dos tríadas por sarcómero, mientras que los anfibios, peces, y aves, tienen sólo una. Tener dos tríadas acorta en casi una micra la distancia promedio entre los sitios de liberación y

los sitios de ligadura en los filamentos contráctiles, donde el calcio liberado ejerce su función.

Esas distancias deben ser cubiertas por difusión, un mecanismo cuyos tiempos de llegada dependen (en forma inversamente proporcional) del cuadrado de las distancias. El acorte de distancias resulta entonces en un ahorro aún mayor de tiempo. Ese ahorro permite eliminar, aparentemente por completo, toda una clase de canales, y el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio que tiene desventajas importantes frente al de liberación de calcio inducida por despolarización (es más lento, y de difícil regulación gradual). Los flujos de calcio pueden también ser menores y más breves, con el consiguiente ahorro de energía. Además, el calcio es un mensajero peligroso⁸, multiuso, que también participa en activar proteólisis e incluso muerte celular, lo que realza el valor evolutivo de este cambio alcanzado en los mamíferos⁹.

La bioquímica se complica

En músculo cardíaco, además de los dos componentes fundamentales, hay ya 17 proteínas identificadas [23], que se unen, temporaria o permanentemente al Cav1.2 o al receptor de rianodina (que allí es de isoforma 2, RyR2). En músculo esquelético los números son similares [29]. La pregunta obligada es ¿qué hacen todas estas proteínas?

Entre ellas las más estudiadas son tres proteínas del retículo sarcoplasmático, calsecuestrina, triadina y juntina¹⁰, que se sabe interactúan alostéricamente con el RyR y el DHPR. Sus roles se examinaron en un simposio en el año 2009 (con anales publicados en el Journal of Physiology, empezando en [30]). La figura 8 presenta la relación existente entre estas tres proteínas y el canal de receptores de rianodina en forma topológicamente correcta [31].

La calsecuestrina (que existe en dos isoformas muy similares, Casq1 en músculo esquelético, Casq2 en cardíaco) es importante por ser el principal tampón de calcio en el retículo sarcoplasmático. Es una proteína hidrosoluble, luminal, localizada enteramente dentro del retículo sarcoplasmático, específicamente en las cisternas terminales, donde forma un gran polímero, lineal y ramificado, visible por microscopía electrónica (ver figura 9). Mutaciones en la Casq2 producen una enfermedad caracterizada por arritmias a menudo letales, la

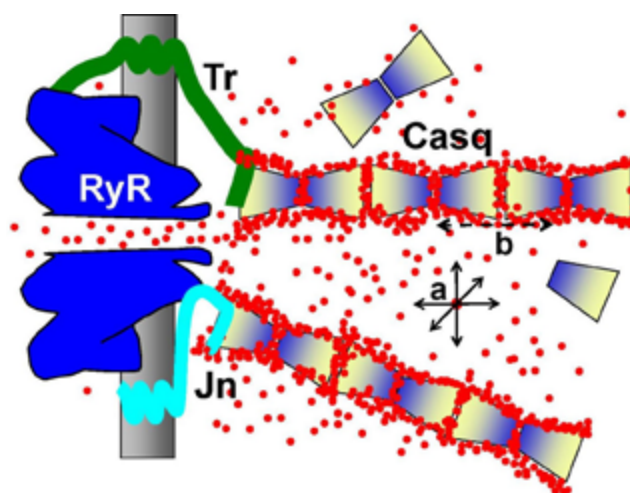


Figura 8. Otros componentes del cuplón. Tanto en el músculo esquelético como en el cardíaco, los receptores de rianodina se unen físicamente a dos proteínas transmembranales del RS, la juntina, Jn, por un segmento luminal del receptor de rianodina, y la triadina, Tr, que se liga a la porción citosólica del canal. Jn y Tr a su vez “anclan” a la membrana polímeros de calsecuestrina 1 (Casq). El diagrama representa correctamente la formación del polímero de Casq por alternancia de uniones “por detrás” (“back-to-back”) y “por delante” (“head-to-head”) [68]. Se representa también el rol ligante o enlazante del Ca^{2+} , que encuentra nuevos sitios de enlace en las interfases entre monómeros, así como en la periferia de los polímeros (y entre polímeros agrupados longitudinalmente, no representados). Se ha propuesto que los iones allí presentes (por ejemplo en b) pueden difundir y lo hacen longitudinalmente, lo que facilita su movimiento neto hacia el canal en comparación con los iones libres (a) que deben realizar un “paseo” en tres dimensiones, mucho menos eficiente. Así, los polímeros de calsecuestrina se imaginan como “alambres de calcio” [73].

taquicardia ventricular catecolaminérgica polimórfica (el acrónimo en inglés es CPVT [32]). Triadina y juntina explican la localización específica de la calsecuestrina, ya que son integrales a la membrana juntural, y tienen sitios identificados de enlace tanto con la calsecuestrina como con el receptor de rianodina.

⁸ Ernesto Carafoli lo dijo memorablemente, cuando comparó la activación contráctil con el acto de un alambrista, siempre orillando la catástrofe [28].

⁹ Usé “valor evolutivo” en el simple sentido de que los mamíferos llegaron más tarde, y éste es uno de los cambios organizativos importantes, que pueden haberles permitido ocupar nuevos nichos. De ningún modo debe inferirse en la frase una comparación de valor entre distintas especies.

¹⁰ *Junctin* en la descripción original.

En el músculo esquelético existe pues una continuidad alostérica, que empieza en el Cav1.1, continúa con el RyR1, la triadina y la juntina ligadas a éste en paralelo, y luego Casq1, anclada a la tríada por sus interacciones con las dos últimas. En el músculo cardíaco la cadena alostérica es menor, ya que Cav1.2 no está físicamente ligado al RyR2, y los polímeros de calsecuestrina están menos desarrollados, simplemente porque la cantidad de Casq2 y el volumen de las cisternas terminales es mucho menor.

ENFERMEDADES DEL CUPLÓN

En los últimos diez años el interés de los investigadores se movió decididamente desde los estudios de mecanismos básicos hacia su aplicación al estudio de mecanismos alterados en enfermedades, tanto cardíacas como de músculo esquelético. Las razones de este cambio fueron múltiples. Por un lado la comprensión de fenómenos básicos parecía suficientemente avanzada como para permitir la comparación con dichos fenómenos en situaciones de enfermedad, con el propósito de elaborar tratamientos o medidas preventivas racionales sobre la base del conocimiento de mecanismos. La segunda razón es recíproca de la primera: muchas de las enfermedades se deben a mutaciones en la estructura primaria de las moléculas principales, y entonces estas enfermedades proporcionan moléculas “a la medida” para estudiar relaciones entre estructura molecular y función¹¹.

Dos consideraciones básicas condicionan los estudios de mecanismo en enfermedades debidas a mutaciones. Una es que la utilidad del concepto de cuplón se extiende a la patogénesis, ya que algunas enfermedades, notablemente la hipertermia maligna (definida más adelante), y la CPVT (definida antes), se generan por mutaciones en RyR1 pero también en Cav1.1 y Casq1 (en el caso de la hipertermia maligna), o de Cav1.2, Casq2 y triadina (en el caso de la CPVT). Es decir, se llega a fenotipos de enfermedad similares, por mutaciones en cualquiera de las moléculas que componen el cuplón. En ese sentido, se puede hablar de “enfermedades del cuplón”.

Otra consideración relevante para el estudio racional de estas enfermedades es la existencia de un paralelo notable entre el RyR1, esquelético, y el RyR2, cardíaco, tanto en estructura primaria

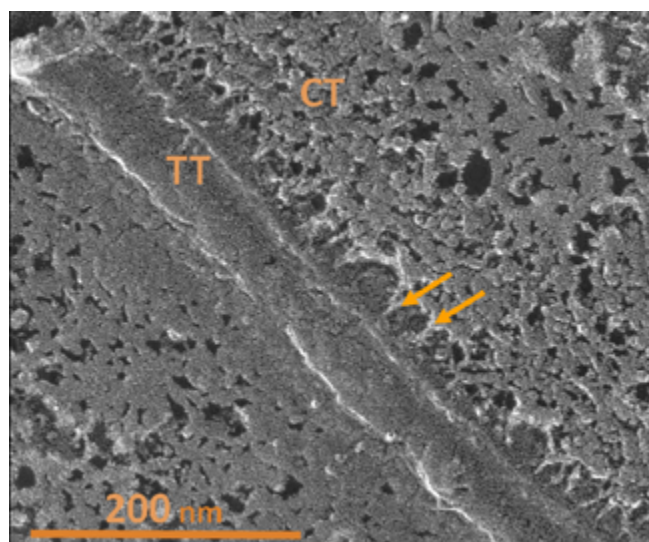


Figura 9. La calsecuestrina en las cisternas terminales. En este ejemplo, en músculo esquelético de pejesapo, así como en todas las especies estudiadas por microscopía electrónica, la calsecuestrina ocupa las cisternas terminales, CT, donde aparece en forma de red espesa, constituida por polímeros longitudinales que luego participan de agrupaciones múltiples. Las flechas marcan cómo estos polímeros adquieren forma de pilar antes de unirse a la membrana juntural del túbulo transverso (TT). Como se muestra en la figura 7, el anclaje a la membrana se establece por medio de la triadina, que a su vez se une al RyR por su porción citosólica, y la juntina, que se liga a la faz luminal o intra-RS del RyR. Imagen cedida por Clara Franzini-Armstrong.

-secuencia de aminoácidos- como en las enfermedades que se originan a partir de estas moléculas.

Por ejemplo, hay muchos puntos en común entre la hipertermia maligna del músculo esquelético (HM) y la CPVT, del cardíaco. En la mayoría de los casos la hipertermia maligna no es una enfermedad sino una “susceptibilidad”, caracterizada por la entrada en estados hipermetabólicos agudos, con hipercontractura muscular e hipertermia, en presencia de anestésicos de inhalación (halotano) y/o fármacos despolarizantes (succinilcolina) que se usan en cirugía. Estas reacciones se caracterizan

¹¹ Hubo otra razón: en el año 2003 Elias Zerhouni, director de los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU, impuso un “Mapa de Ruta para la Investigación Médica”, que establecía prioridad rigurosa para el apoyo financiero de los proyectos con fuerte contenido de aplicación al estudio o tratamiento de enfermedades. La respuesta, obligada, de los investigadores, fue inmediata y duradera.

a nivel celular por un aumento incontrolable del calcio citosólico debido a la apertura de canales del RS. La CPVT en tanto se caracteriza por taquicardias desencadenadas por eventos de despolarización generados en los cardiomiocitos ventriculares y asincrónicos con el latido regular. Al igual que en la hipertermia maligna, estos eventos comienzan por liberación espontánea de calcio intracelular (es decir, no generada por el potencial de acción transmitido desde el nódulo aurículo-ventricular). El consiguiente aumento de calcio citosólico, inicialmente localizado, pone en juego una molécula transportadora de la membrana plasmática, el intercambiador sodio-calcio. El intercambio de iones a través de esta molécula requiere la entrada neta de una carga eléctrica elemental por cada ion Ca^{2+} extraído de la célula, lo que determina una despolarización que puede transmitirse como potencial de acción ectópico, con la extrasístole consiguiente. Ambos trastornos, la hipertermia maligna y la CPVT, pueden ser letales. En último análisis, ambos se deben a mutaciones, primariamente del RyR correspondiente, pero también de los Cav1 (los estudios de ambos tipos de mutaciones se resumen en un artículo reciente [33]).

Completando la evidencia de que el cuplón es una unidad funcional susceptible de ser alterada en cualquiera de sus componentes, se ha encontrado que ratones desprovistos de Casq1 desarrollan un síndrome análogo a la hipertermia maligna [34,35], y más recientemente se identificó el primer caso de CPVT debida a una mutación en triadina, proteína del cuplón que hasta ahora no había sido asociada a patología alguna [36].

Mutaciones

Más evidencia de la analogía entre los cuplones de ambos tipos de células se encuentra en la ubicación de las mutaciones. La mayor cantidad de ellas se ubica en el receptor de rianodina. En RyR1 se han identificado más de 300 mutaciones asociadas a enfermedades similares. En RyR2 el número es menor, unas 160, tal vez porque muchas mutaciones allí sean incompatibles con la vida intrauterina. Dichas mutaciones se localizan en toda la longitud de estas proteínas (unos 5000 aminoácidos), pero sobre todo en tres segmentos “calientes”, que están en posiciones correspondientes en ambas isoformas. Su ubicación puede verse en las figuras 10 y 11, donde se grafica el número acumulado de

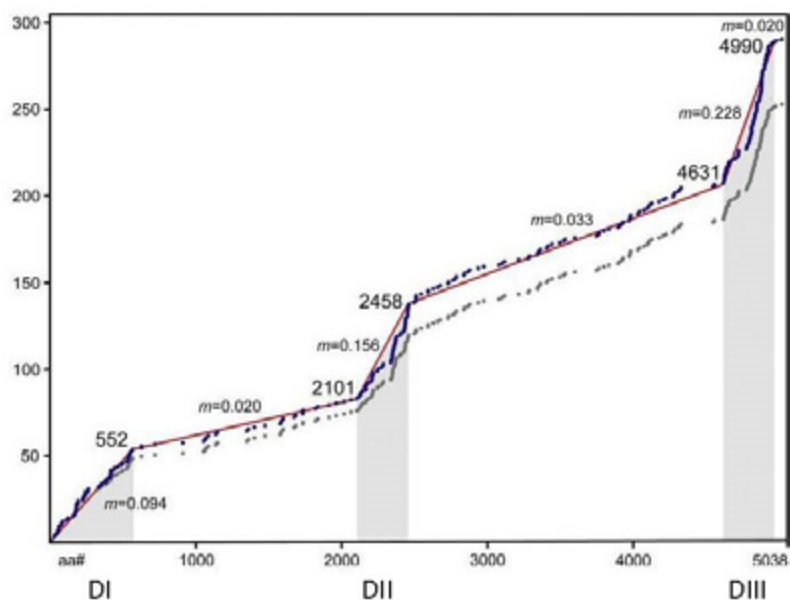


Figura 10. Mutaciones en el canal de liberación del músculo esquelético. Se grafica el total acumulado de mutaciones (asociadas a MH y otras enfermedades) contra el número ordinal de los residuos aminoácidos afectados en la proteína humana RyR1. Los valores de abscisa consisten en 294 posiciones en la secuencia primaria donde al menos una mutación ha sido documentada. La función en negro se incrementa en 1 en cada una de estas posiciones. En cambio los valores de ordenada de la función en azul se incrementan por la redundancia en cada sitio (el número de sustituciones redundantes, por distintos aminoácidos, del mismo residuo). Las dos funciones graficadas tienen la misma forma general pero la pendiente (o frecuencia local) es mayor en la función que registra

la redundancia. La función en azul se aproximó por segmentos lineales, en rojo, en distintas porciones de la secuencia primaria. El valor m anotado en cada una de ellas es la pendiente o frecuencia promedio del segmento, cociente entre número de mutaciones y número de aminoácidos en cada intervalo. DI a DIII identifican los tres “segmentos calientes”, donde la frecuencia es alta. La frecuencia así calculada se compone entonces de un término, representado por la función en negro, que evalúa el número de residuos en el entorno cuya modificación resulta en daño (cuantificando así la importancia de la zona, o segmento) y un término específico del aminoácido (la multiplicidad o redundancia local) que cuantifica la importancia individual del aminoácido, tanto mayor cuanto más sean las sustituciones que resultan en daño. Este término se cuantifica por los saltos locales de la función en azul, que al acumularse resultan en la diferencia creciente entre las dos representaciones. Modificado de MacLennan DH, *et al.* [33]. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.11.009

mutaciones vs. el número del residuo aminoacídico en la secuencia primaria, a partir del terminal N. Así el primer segmento caliente, llamado DI, va desde el residuo 44 al 466 en RyR1 y hasta el 552 en la isoforma cardíaca, y la buena correspondencia se mantiene en la ubicación de los otros segmentos. En lo que constituye la única diferencia mayor, el RyR2 tiene un cuarto “segmento caliente”, residuos 3778 a 4201, que por razones de precedencia se denomina DIII y corresponde a una zona relativamente “fría” en el RyR esquelético. Eso hace que el segmento caliente final del RyR2, homólogo al DIII del RyR1, sea designado DIV.

¿Por qué es interesante esa topología de mutaciones? Primero, porque permite predecir que una mutación presente en una isoforma será dañina si aparece en el sitio homólogo de la otra. En segundo lugar, porque confirma la analogía noxológica entre la hipertermia maligna en músculo esquelético y la CPVT en músculo cardíaco, permitiendo de nuevo extrapolar observaciones fisiopatológicas, clínicas y terapéuticas. Esta aplicación se extiende por supuesto a las otras moléculas del cuplón, y la retomaremos más adelante en relación a la calsecuestrina. Finalmente, las mutaciones

asociadas a estas enfermedades de animales y de seres humanos constituyen una “biblioteca” de alteraciones útiles para el esclarecimiento de relaciones entre estructura y función.

Dicha biblioteca fue aprovechada en forma notable por el grupo de Filip Van Petegem [37], quien ante la imposibilidad de cristalizar toda la molécula se conformó con hacerlo para los primeros 559 residuos del receptor de rianodina1, que comprenden el primer segmento caliente. Ese estudio no sólo aportó la primera estructura con resolución atómica (representada en el panel superior de la figura 12) de una parte de este canal, sino que corrigió ideas erróneas, derivadas de imágenes extraídas -en el curso de 20 años- por el laborioso método de promediación de crio-microfotografías electrónicas de moléculas individuales [38]. Aunque de inferior resolución, dichas imágenes (llamadas de “crio-EM”) reconstruyen la forma tridimensional del canal. Así permiten localizar groseramente regiones de la molécula vecinas al poro que atraviesa la membrana, y otras que están más alejadas, en el gran “pie” citosólico que comprende la mayor parte de la masa molecular.

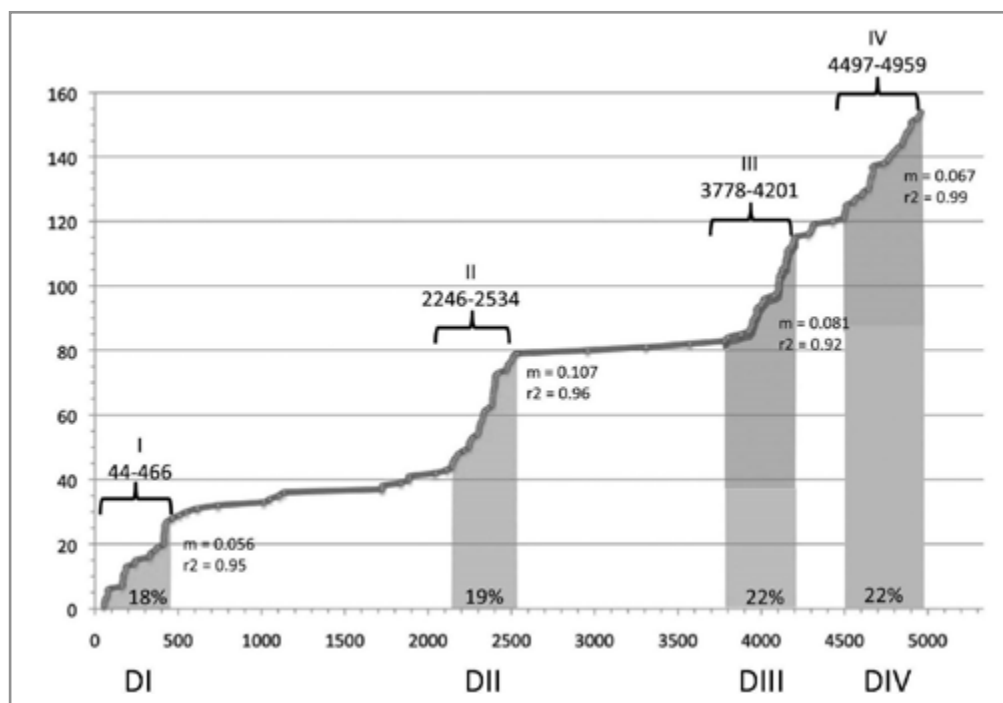


Figura 11. Análogamente con la gráfica en azul de la figura anterior, se grafican el total acumulado de mutaciones contra el número de residuo en la proteína humana RyR2. 152 mutaciones habían sido documentadas hasta el año 2011. Los “segmentos calientes” acá son cuatro, DI a DIV. Entre ellos, DI, DII y DIV se corresponden bien con DI, DII y DIII del RyR1 del músculo esquelético. DIII en cambio no tiene correspondencia visible. Tomado de Priori SG, *et al.* [80]. ©2011, Wolters Kluwer Health

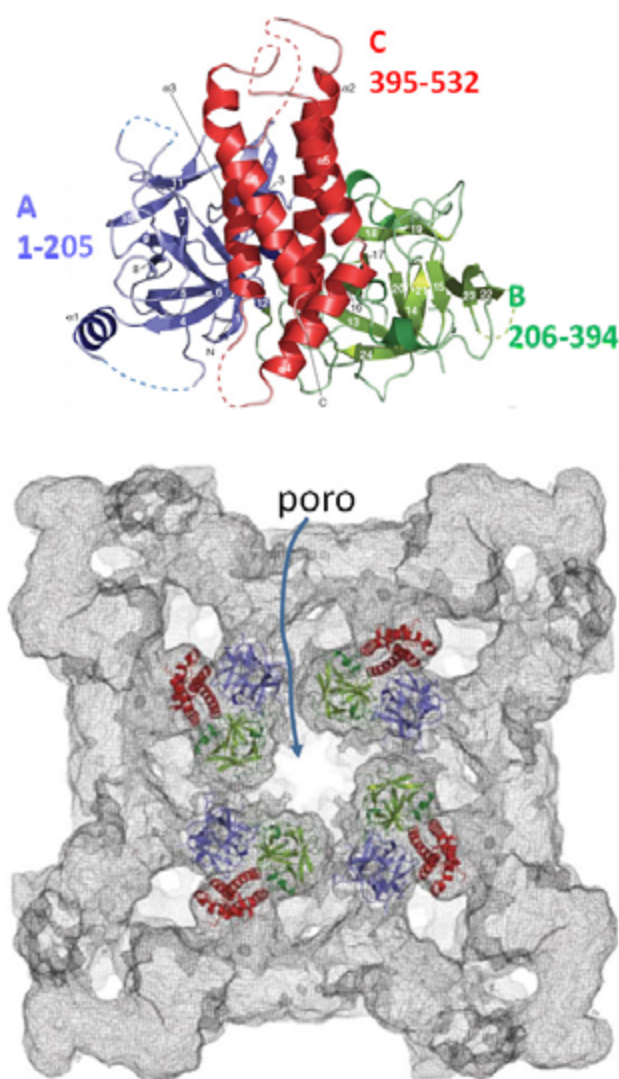


Figura 12. Estructura atómica de un segmento del canal de liberación. Panel superior: representación “de cinta” de la estructura evaluada con una resolución de 2.5 Å del segmento DI (residuos 1 a 559) del RyR1 de conejo. Esta porción consiste de tres dominios, A a C. Panel inferior: proyección vista desde el lado citosólico de la estructura cristalizada sobre la reconstrucción del RyR1 por crió-EM. Esta reconstrucción [81], representada en malla gris, tiene una resolución de 10 Å. La localización, que se confirmó por múltiples criterios, ubica el segmento DI cerca del vestíbulo citosólico del poro. Modificado de Tung CC, *et al.* [37] con permiso de sus autores. DOI: 10.1038/nature09471

Como se muestra en la figura 12, comparando el cristal con la reconstrucción crió-EM pudo ubicarse el segmento de residuos aminoacídicos 1-559 en una zona muy próxima al vestíbulo citosólico del canal, corrigiendo así el consenso previo, que ubicaba a este segmento en las regiones citosólicas más alejadas del poro. Este es un ejemplo claro de la repercusión que los estudios clínicos han tenido sobre los conocimientos básicos. Y la

interfecundación entre los dos campos continúa: como veremos enseguida, esta reubicación del segmento DI también ayudó a interpretar observaciones funcionales recientes sobre un modelo de la condición hipertermia maligna.

Otro aporte de estas mutaciones es que han permitido identificar con precisión los segmentos de la cadena primaria que constituyen la pared (el revestimiento interior) del poro. Allí las mutaciones se caracterizan por causar un bloqueo de canal abierto, es decir, impiden el pasaje de iones, y se asocian a un síndrome de pérdida de función (pérdida de liberación de calcio), opuesto a la ganancia de función que caracteriza a la hipertermia maligna y la CPVT. Este síndrome (llamado enfermedad de los cuerpos centrales, CCD por “*central core disease*” [39]) incluye debilidad muscular y alteraciones histomorfológicas características, cuerpos o “*cores*” con pérdida de estructura y función mitocondrial y contráctil en regiones axiales de cada fibra muscular.

La “terminación” y sus defectos

El estudio más completo de estas enfermedades se ha realizado sobre cepas de ratones que expresan mutaciones de interés. Un trabajo reciente ilustra cómo esta estrategia experimental, a la luz de los avances moleculares, puede contribuir a esclarecer la patogénesis. Con Carlo Manno y Lourdes Figueroa [40] estudiamos el “ratón Y522T”¹², que expresa constitutivamente una mutación causante de un síndrome de hipertermia maligna “florido”, es decir, con elementos de HM y también de la enfermedad de los cuerpos centrales (CCD). Cuantificando el flujo de liberación de calcio en fibras esqueléticas aisladas pudimos demostrar valores casi normales en respuesta a la despolarización, asociados a (y a pesar de) una disminución de la concentración de calcio en el retículo sarcoplasmático en reposo. Es decir, el fenotipo se caracteriza por una mayor permeabilidad de la membrana del retículo sarcoplasmático (definida como cociente entre flujo y diferencia de concentración de calcio libre). Dicho exceso de permeabilidad podría en principio deberse a una propensión excesiva del canal a ser activado, o a un déficit en el cierre del canal

¹² En el ratón, el residuo mutado es Y524: el nombre “Y522T” refleja la ubicación del residuo homólogo en el receptores de rianodina1 humano.

cuando los procesos de activación han concluido. La evidencia en ese caso fue a favor de la segunda posibilidad. En conclusión, el Y522T tiene déficit de terminación de la liberación de calcio.

La hipertermia maligna, al menos en su variedad recreada en este ratón, se incorpora así a los desórdenes de la terminación de la liberación de calcio. La terminación es literalmente la conclusión del flujo de calcio, ya sea por cierre de canales o agotamiento de la fuente. No es obvio que ella requiera una función especial en músculo esquelético. Allí el mecanismo de activación es exclusivamente dependiente de la despolarización transmitida por el receptor de DHP -le llamamos liberación de calcio inducida por despolarización. Por ser breve la despolarización (el potencial de acción), la repolarización, con el consiguiente retorno de los sensores de voltaje a su configuración de reposo, cierra rápidamente los canales RyR (el mecanismo llamado “desactivación”). Sin embargo, desde tiempo atrás se sabe que existe un mecanismo coadyuvante, llamado inactivación dependiente de calcio, IDC, por el cual el mismo calcio que atraviesa un canal se une a sitios en la faz citosólica del mismo canal (o canales próximos) y causa su cierre [41]. Una prueba clásica de la presencia de este mecanismo se hace agregando al medio citosólico el tampón de calcio BAPTA. Éste atrapa rápidamente el calcio a su salida por los canales e impide su función inhibitoria, con lo que el flujo de liberación se prolonga y se potencia. La amplitud y curso temporal del flujo de liberación en los ratones Y522T se alteran de un modo muy similar en ratones normales en presencia de BAPTA [40]. Este resultado sugiere entonces que la mutación afecta la terminación del flujo, al alterar el sitio donde debe unirse calcio para producir IDC.

Aunque la ubicación en la secuencia primaria del sitio de enlace de calcio no se conoce, todos los estudios cuantitativos apuntan a posiciones cercanas a la “boca” citosólica del poro. Esto podría haber sido un problema para el mecanismo propuesto, ya que el residuo Y522 se encuentra muy cerca del terminal N, el que por muchos años se creía ubicado en las regiones de receptores de rianodina más alejadas, distantes unos 15 nm del poro (ver figura 12). Sin embargo, y como se muestra en el panel inferior de la figura, la topología

revelada con la cristalización del segmento DI [37] ubica al residuo Y522 en una posición cercana al poro, expuesta a las altas concentraciones de calcio presentes en el entorno inmediato de un canal abierto.

Queda así establecida la posibilidad de que la hipertermia maligna, al menos en algunos casos, resulte de un defecto primario en la terminación del flujo de calcio. Pero ejemplos abundantes de “enfermedades de la terminación” se encuentran en el músculo cardíaco, debidos a mutaciones en el componente más proximal o interno del cuplón, la calsecuestrina. Dichas mutaciones atrajeron atención hacia esta proteína y motivaron estudios que prometen clarificar otros aspectos, algunos inesperados, de las funciones del cuplón.

LA CALSECUESTRINA Y SUS VARIAS FUNCIONES

La calsecuestrina se ha hecho notar tanto por lo que hace como lo que no hace. Fue descrita en 1971 como la proteína ácida -y con afinidad por calcio- más abundante del retículo sarcoplasmático [42]. Esta proteína se considera desde entonces el principal reservorio de calcio en el retículo sarcoplasmático, aunque parece no ser el único. Su descubridor, David MacLennan, publicó enseguida, en una revista poco leída, una demostración de la existencia de otras fracciones proteicas ácidas en los extractos de RS, con la propiedad de ligar calcio [43]. Con C Manno y otros, recientemente evaluamos que de cada cuatro iones Ca^{2+} liberados por el retículo sarcoplasmático en el músculo esquelético, 3 provienen de la calsecuestrina [44], mientras que en músculo cardíaco la contribución parece algo menor (la evidencia, no tan clara, se discute en el texto de Bers [45]). Es sorprendente entonces que ratones artificialmente desprovistos de ambas isoformas de esta proteína (llamados “Casq1/2-nulos”) tengan una vida relativamente normal, seguramente basada en ese 25% de capacidad de calcio que les queda. Por supuesto que esos ratones tienen problemas. Y problemas análogos se manifiestan claramente en los seres humanos, donde se han descrito ya 12 mutaciones (de Casq2) que producen formas graves de CPVT [32]. Los estudios celulares (muchos discutidos en [46]) sugieren que en todas ellas lo que falla es la terminación (de la liberación de calcio).

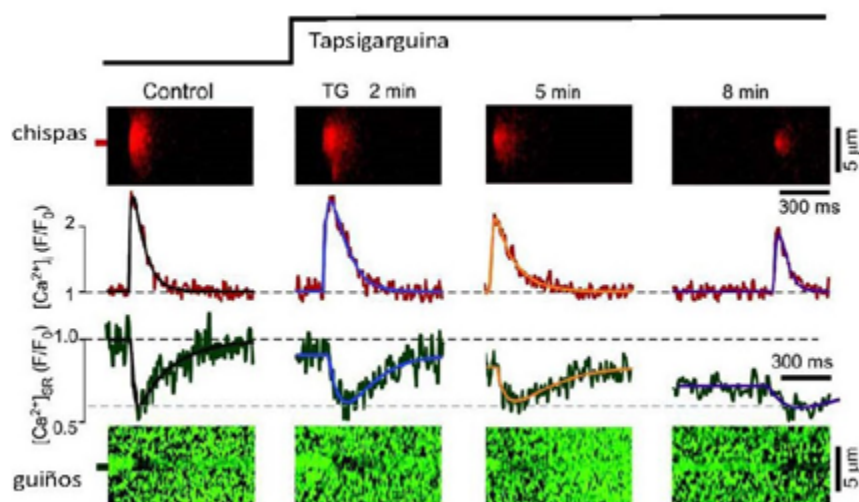


Figura 13. Registro simultáneo de chispas y guiños. Un cardiomiocito ventricular de conejo fue cargado por incubación con los indicadores fluorescentes de calcio rhod-2 y fluo-5N. El rhod-2 tiene alta afinidad, y sus señales reflejan la evolución de $[Ca^{2+}]$ en el citosol. El fluo-5N tiene afinidad menor (constante de disociación efectiva de $\sim 400 \mu M$) y su fluorescencia corresponde a la $[Ca^{2+}]_{RS}$. Las imágenes fueron obtenidas por escaneo de línea, de modo que el tiempo en cada una se representa en la dimensión horizontal, progresando de izquierda a derecha, y el espacio se corresponde con la posición vertical. Las imágenes de rhod-2 y fluo-5N se obtuvieron simultáneamente, a longitudes de onda adecuadas para cada indicador. A cada chispa citosólica corresponde un “guiño” en el RS. Comparando los perfiles temporales de ambas señales se ve que el mínimo o nadir de los guiños ocurre más tarde que el pico de la chispa correspondiente, lo que indica que el flujo de liberación continúa después del pico de la chispa. El trazo superior marca la aplicación de tapsigarguina, inhibidor irreversible de la bomba de calcio, aplicación que determina un vaciado progresivo del RS. Dicho vaciado se acompaña de reducción progresiva de chispas y guiños. Éstos, sin embargo, alcanzan siempre su nadir al mismo nivel, aproximadamente 50% de la concentración inicial previa a la aplicación de inhibidor. Este resultado sugiere la existencia de un “umbral” de $[Ca^{2+}]_{RS}$, por debajo del cual los canales se cierran. Ambos indicadores son “intensométricos”, de alta sensibilidad y difícil calibración, por lo cual los perfiles se representaron en unidades de fluorescencia relativa, normalizada al valor inicial. Tomado de Zima AV, *et al.* [47] con permiso de sus autores. ©2008, Wolters Kluwer Health.

¿Cómo se estudia la terminación? La figura 13, tomada de un estudio de Lothar Blatter en nuestra Sección [47], ilustra un avance mayor, la posibilidad de evaluar la concentración de calcio libre dentro del retículo, $[Ca^{2+}]_{RS}$, a medida que cambia durante la función celular. En la figura se observan simultáneamente chispas de calcio, y las marcas de depleción que dejan dentro del retículo sarcoplasmático, llamadas guiños (“blinks”, [48])¹³. El experimento ilustra las consecuencias de inhibir farmacológicamente (con tapsigarguina) el bombeo de calcio hacia el retículo sarcoplasmático: el organelo empieza a vaciarse, las chispas se achican, y los guiños, que empiezan

desde niveles progresivamente menores, también se van achicando, con la peculiaridad de que el nadir, el mínimo de concentración alcanzado, parece ser siempre el mismo.

Esta y otras observaciones llevan a pensar que la terminación (el cierre del canal de RyR2 que resulta en terminación de la chispa) se debe a un proceso mediado por un sensor intra-RS, que produce una señal de cierre cuando la $[Ca^{2+}]_{RS}$ se torna menor que cierto nivel umbral. Evidencias acumuladas desde 2002 señalan a la calsecuestrina como probable sensor [49,50]. Y se interpreta la CPVT causada por mutaciones de Casq2 como el resultado de la falla de estas moléculas mutadas en detectar la reducción de la $[Ca^{2+}]_{RS}$ por debajo del hipotético umbral de cierre de canales [50].

Sin embargo, existe una interpretación alternativa, que cambia aspectos sustanciales de nuestra imagen de la función del cuplón cardíaco. La interpretación tiene dos componentes: la terminación se debe sí a la caída de $[Ca^{2+}]_{RS}$, pero no está mediada por un sensor intra-RS; en cambio, la disminución del gradiente de concentración entre el retículo sarcoplasmático y el citosol determina la reducción de la corriente individual por canal, y eso hace que no pueda mantenerse la concentración elevada de calcio del lado citosólico, condición necesaria para que los canales continúen abiertos por efecto LCIC (liberación de calcio inducida por calcio).

Esa idea tiene una historia interesante. Mike Stern ya había contemplado, en un trabajo germinal de 1992, el mecanismo de “atracción”,

¹³ La traducción literal es “parpadeo”. Prefiero “guiño” porque no tiene la implicación binocular, innecesaria, del término original.

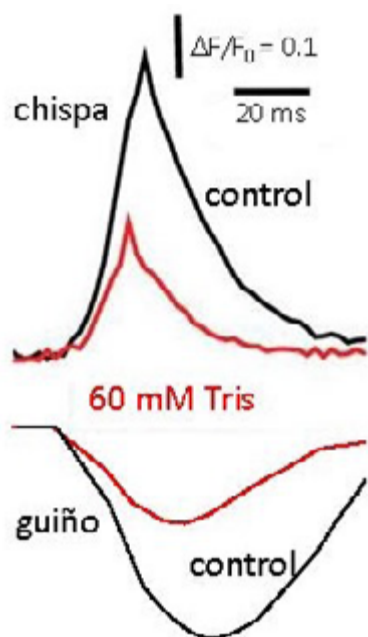


Figura 14. En músculo cardíaco la terminación ocurre por “falta de LCIC”. Efecto del Tris sobre el perfil de las chispas. Cuando está presente a alta concentración en el citosol este ion reduce la corriente unitaria de calcio por el canal de liberación. Las chispas (se muestra un promedio de 10 de ellas) se reducen en amplitud, lo que es consistente con reducción del flujo total, debida a su vez a la reducción de los flujos unitarios por canal. También terminan antes, indicando un cierre prematuro de los canales. Los registros de chispa son tomados de la referencia [53]. Mediante cálculos simples del flujo necesario para producir estas chispas, y suponiendo que la capacidad amortiguadora del RS no cambió por la presencia de Tris, tracé en la parte inferior el curso que debían tener los correspondientes guiños (que no fueron medidos experimentalmente). Obviamente, el guiño en presencia de Tris debe reducirse en amplitud, y por ende alcanzar su nadir a una $[Ca^{2+}]_{RS}$ mayor. El experimento demuestra la no existencia de un umbral absoluto de $[Ca^{2+}]_{RS}$ o de un sensor intra-RS necesario para ordenar el cierre de los canales. Como arguyen Fill y Gillespie [53,54], el cierre resulta de la reducción de la corriente unitaria y flujo total de calcio, que en cierto punto falla en mantener el fenómeno auto-alimentado de LCIC o CICR.

el cierre aleatorio de canales que se auto-refuerza al disminuir la concentración de calcio que los canales abiertos aportan al lado citosólico [51]. Pero tanto en ese trabajo como en nuestros cálculos numéricos de 1999 [17] se suponía que la depleción durante una chispa es despreciable, y por tanto no cambia el gradiente de concentración. La primera evidencia de que la depleción es importante, luego confirmada por la demostración de “guiños”, surgió de cálculos numéricos de Eric Sobie, que muestran que en el pequeño volumen de la cisterna terminal del músculo cardíaco, la concentración $[Ca^{2+}]_{RS}$ baja en un 90% durante una chispa [52]. Por consiguiente, la corriente “unitaria” del canal individual baja proporcionalmente y los canales se cierran porque no puede mantenerse el mecanismo LCIC. Esta conclusión fue elegantemente confirmada más tarde por Michael Fill y Dirk Gillespie en nuestra Sección [53]. En la figura 14, que recrea libremente uno de sus experimentos, se observa el efecto del Tris, un bloqueador parcial de los receptores de rianodina. Se reduce la duración y amplitud de las chispas (consistente con reducción del tiempo abierto de los canales) sin cambiar para nada la $[Ca^{2+}]_{RS}$ de reposo. El trabajo demuestra que no se requiere un sensor intra-RS, y que la apariencia de un umbral en $[Ca^{2+}]_{RS}$ se debe a que por debajo de cierto gradiente y corriente unitaria de calcio, los canales se cierran por falla en la activación. Fill y Gillespie llaman a esto “atrición perniciosa” [54]; Mark Cannell y colaboradores llegaron por

otros caminos a la misma conclusión, y trataron de imponer su propia nomenclatura, con el término “caída de la inducción” [55], refiriéndose a que lo que falla es el mecanismo de liberación de calcio inducida por calcio.

Compiten entonces dos teorías para explicar la terminación del flujo en chispas y en señales globales, una que invoca un sensor intra-RS y otra que sólo requiere depleción y la consiguiente falla de LCIC. Ambas se compatibilizan con las fallas de terminación asociadas a mutaciones de calsecuestrina. La primera, aduciendo que la calsecuestrina es el sensor de calcio intra-RS, la segunda usa una propiedad bien conocida del retículo sarcoplasmático cardíaco, por la que éste entra en liberación espontánea cuando la $[Ca^{2+}]_{RS}$ aumenta mucho. La calsecuestrina mutante en algunos casos no se expresa en cantidades suficientes y en otros pierde capacidad de unir calcio. En ambas situaciones, al perderse capacidad amortiguadora, la bomba SERCA produce una rápida recuperación de la $[Ca^{2+}]_{RS}$ a medida que el calcio es liberado, y se generan situaciones locales de sobrecarga intra-RS, las que resultan en liberación local espontánea. A su vez estos eventos, por los procesos discutidos antes, resultan en despolarizaciones ectópicas, extrasístoles y arritmias.

En la actualidad no existen argumentos para descartar uno de los dos mecanismos propuestos. Todavía hay una tercera posibilidad [56], y es que los canales se cierran por inactivación dependiente

de calcio, la IDC demostrada antes para el caso esquelético. En suma, el cuplón cardíaco parece asegurar la terminación por tres mecanismos. En un enfoque teleológico eso no sorprende, ya que las consecuencias de las fallas en la terminación, aún las esporádicas, suelen ser letales.

Controles desde el interior del retículo sarcoplasmático

Espoleados por las evidencias encontradas en músculo cardíaco, hemos trabajado mucho en el laboratorio para aclarar los mecanismos de control que operan desde el interior del retículo sarcoplasmático en el músculo esquelético. Para ello unos diez años atrás decidimos con Gustavo Brum que era necesario generar un método para medir la concentración de calcio libre en el retículo sarcoplasmático, y hacerlo dinámicamente, es decir, en tanto la célula funciona, liberando o recaptando calcio en el RS. Así generamos primero una técnica [57] basada en indicadores fluorescentes sintéticos (específicamente el mag-indo 1); éstos son moléculas pequeñas que se introducen en forma de ésteres permeables y luego son des-esterificadas por enzimas celulares. Esta técnica, similar a la usada en el experimento de la figura 10¹⁴, sirvió en músculo de rana para demostrar entre otras cosas que las chispas de calcio no generan mayor depleción en el RS del músculo esquelético, lo que constituye una diferencia importante con el cardíaco y descarta la depleción propiamente dicha como mecanismo de terminación en las miofibras esqueléticas [58].

La entrada de estos indicadores sintéticos, sin embargo, es inespecífica, pareja en todos los organelos, y por ello los sintéticos no son tan adecuados para estudios de este tipo en mamíferos, donde existe tal superposición espacial entre RS y mitocondrias que se hace casi imposible distinguir las señales que vienen de uno u otro organelo¹⁵. Como alternativa decidimos usar un biosensor proteico, que la propia célula sintetiza a partir de un plásmido introducido por electroporación. El D4cpv [61] es una ingeniosa proteína quimérica con dos dominios fluorescentes o fluoróforos que emiten luz de distinto color, ligados por un segmento tomado de la calmodulina (CAM). La luz emitida cambia en forma inversa para cada fluoróforo frente a cambios en la concentración

de calcio (esto ocurre debido a cambios en la conformación del segmento de CAM, que a su vez modifican la transferencia de energía de Förster -FRET- entre ambos fluoróforos)¹⁶. Ligando en el mismo plásmido el ADN código del D4cpv con el de la calsecuestrina 1 pudimos generar un biosensor, D4cpv-calsecuestrina, que se expresa casi exclusivamente en el retículo sarcoplasmático, y así produce una señal dependiente de la $[Ca^{2+}]_{RS}$ [63]. Con ese instrumento de medida pudimos finalmente asegurar que existe un mecanismo de terminación asociado a la concentración de calcio intra-RS, que cierra los canales receptores de rianodina cuando dicha concentración baja más allá de cierto nivel (unos 150 μM -aproximadamente un tercio del valor de reposo) [64]. Ese mecanismo parece ser mediado por la calsecuestrina, ya que en ratones “knock-out” desprovistos de ella el vaciamiento del retículo llega a ser casi total [64, 65].

¹⁴ La diferencia principal es el uso en figura 10 de un indicador “intensométrico”, cuya señal es un simple cambio de intensidad de fluorescencia, mientras que el mag-indo es “raciométrico”, su espectro de emisión cambia con la unión a Ca^{2+} , lo que determina cambios en la razón de intensidades a longitudes de onda diferentes. A diferencia de la intensidad, la razón de intensidades no depende de la concentración de indicador, volumen del organelo o intensidad de la luz excitante, y por ende tampoco del movimiento contráctil que acompaña los transitorios de calcio. Los indicadores intensométricos, por otro lado, siguen siendo populares porque tienen enormes ventajas en relación señal-ruido (debido a la magnitud de la variación en fluorescencia cuando ligan Ca^{2+}).

¹⁵ Señales de pigmentos sintéticos en el RS han sido aisladas mediante la adición de grandes cantidades de BAPTA al interior celular, lo que evita la interferencia por mitocondrias [59,60]. La adición, sin embargo, altera grandemente la fisiología y agrega otros problemas.

¹⁶ El acrónimo FRET designa el fenómeno que es posible cuando un fluoróforo excitado (es decir, en el estado alcanzado por absorción de un fotón de energía adecuada) transfiere energía en forma no radiante (también llamada resonante) a otro fluoróforo. Éste, llamado “aceptor”, debe encontrarse muy próximo al fluoróforo “donante” para posibilitar la transferencia. (La aproximación por cambio de conformación de la calmodulina en presencia de calcio produce el acercamiento y convierte al fenómeno en sensor de calcio). Además, el aceptor debe transitar entre estados de energía inferiores a los del donante, produciendo una luz de mayor longitud de onda que la emitida normalmente por éste. El cambio de color en presencia de calcio justifica el memorable nombre, CAMEleon, que dio genéricamente a estos biosensores su inventor Roger Tsien [62].

La incorporación de métodos confiables para la medida de $[Ca^{2+}]_{RS}$ (ver también [59, 66, 67]), unida a las evaluaciones de los cambios de contenido total de calcio en el RS, han permitido recientemente la evaluación de dos propiedades importantes, la permeabilidad de la membrana liberadora de calcio (definida como cociente entre flujo y gradiente generador-diferencia de concentración de calcio iónico entre el RS y el citosol) y el poder amortiguador del RS considerado como tampón de calcio (cociente entre contenido total de calcio y concentración de calcio libre). La cuantificación de la permeabilidad permite evaluar más directamente el grado o probabilidad de apertura de los canales RyR en varias condiciones, y así cuantificar los defectos que subyacen a las enfermedades descritas más arriba. La determinación cuantitativa del poder amortiguador [44] ha permitido avances similares, como la demostración de su disminución en el ratón R522Y, modelo de hipertermia maligna [40].

Alambres de calcio, y depósitos inteligentes.

La calsecuestrina ha resultado mucho más interesante que un simple amortiguador o molécula de depósito. Ya vimos que aparentemente opera como sensor, causando el cierre de los canales de liberación cuando la $[Ca^{2+}]_{RS}$ cruza un cierto umbral. Estructuralmente forma una red espesa, compuesta por polímeros longitudinales ramificados, que como se ve en la figura 9 terminan muy cerca de la boca intra-RS de los canales. En lo funcional se demostró, ya desde su descubrimiento, que la proteína experimenta cambios sustanciales, básicamente polimerización, al ligar calcio. Y recíprocamente, que la polimerización facilita la unión de calcio, siendo aparentemente necesaria para la función de depósito de gran capacidad [68, 69]. Esas observaciones, realizadas diez años atrás, se confirmaron y explicaron recientemente con la identificación de iones calcio ocupando sitios de baja afinidad en cristales de Casq1, situados en los dos tipos de interfases que presenta el polímero cristalizado [70]. La estructura del polímero cristalizado, resuelta a nivel atómico, con sus iones Ca^{2+} , se representa en la figura 15. Naturalmente que esos sitios de interfase no existen en la forma monomérica, lo que explica bien la ganancia de capacidad y poder tampón que acompaña a la polimerización.

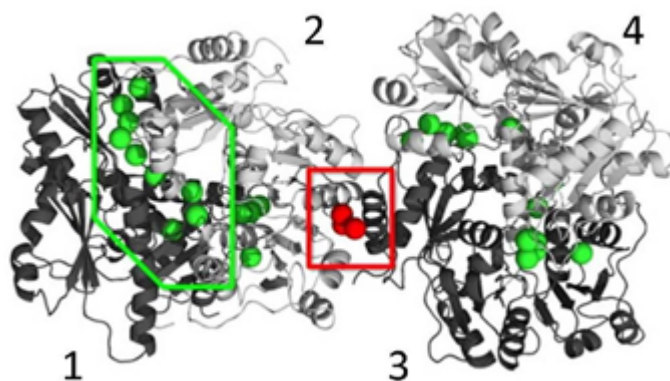


Figura 15. Sitios de calcio en interfases del polímero de calsecuestrina. Estructura atómica de la calsecuestrina cristalizada en forma polimérica, determinada con resolución de 2.5 Å. Se muestra un tetrámero, con protómeros numerados 1 a 4 e iones calcio identificados en las interfaces entre protómeros. Los iones en rojo, en la llamada interfase “por detrás”, se ligan con mayor afinidad, y por ende el enlace “por detrás” es el primero en formarse en el proceso de polimerización que ocurre cuando monómeros de calsecuestrina se exponen a una concentración elevada de calcio. Es decir, la polimerización empieza con la formación de dímeros por detrás. Luego, a concentraciones más altas, se satisface la afinidad de los sitios ubicados en la interfase “por delante”, lo que resulta en tetramerización y formación de multímeros más largos. Mayores concentraciones de calcio favorecen configuraciones poliméricas más complejas, por aposición lado a lado y ramificación de los polímeros lineales [70]. Así se explica el marcado aumento de la capacidad de enlace de la calsecuestrina [68] con la concentración de calcio.

Examinando la figura 9 se ve que la polimerización puede tomar formas más complejas, de orden superior que la demostrada en el cristal de figura 15. Así se ha propuesto que en presencia de calcio los filamentos poliméricos pueden pegarse lateralmente, como tallarines, ya que la superficie del polímero lineal tiene carga predominantemente negativa, y provee sitios donde el Ca^{2+} se siente “cómodo”, especialmente si está flanqueado por dos o más polímeros lineales¹⁷.

Estas evidencias generaron dos ideas, que acertadas o no, motivan y potencian la investigación

¹⁷ Estas propiedades son parte importante de las razones que dan al calcio un rol preponderante como regulador dinámico de proteínas. Ya en 1966 se vio que entre las 309 estructuras proteicas con calcio, depositadas en la base de datos estructurales de Cambridge, todas menos 5 coordinan cada ion con 6 a 8 ligandos, que siempre son grupos $-CO$, $-COO$, $-OH$, u oxígenos del agua [71]. Esa avidez por múltiples sitios hace al ion “ligante”, (continúa página siguiente)

actual. Una de ellas es que los iones Ca^{2+} en su mayoría no se unen a la calsecuestrina en sitios de enlace definidos, donde estarían inmóviles, sino que se “adsorben” con baja afinidad formando bandas catiónicas, tanto entre monómeros como en la periferia del polímero o entre polímeros alineados. Allí pueden moverse longitudinalmente sin desprenderse. Esta idea informa el diagrama de la figura 8.

La idea es seductora porque lleva a su plena expresión un mecanismo formulado por Max Delbrück, quien a mitad de carrera decidió cambiar la física por la biofísica [72]. El mecanismo o principio, llamado “aceleración de la difusión por reducción dimensional” (*diffusional enhancement by reduction of dimensionality*), es simplemente que la difusión se vuelve más eficiente cuando se reducen las dimensiones, es decir, el número de direcciones en que la partícula que difunde puede moverse-hacer su “paseo al azar”. Así por ejemplo un mensajero o mediador celular encuentra mucho más fácil y rápidamente a su receptor de membrana si previamente puede disolverse en dicha membrana, donde la dimensión se reduce a dos. En el caso de la calsecuestrina, los polímeros son lineales, en consecuencia, y como se ilustra en la figura 8, la difusión se reduce a un paseo en una dimensión, lo que debería favorecer aún más el tránsito hacia el canal. De hecho, cálculos simples indican que los tiempos de difusión se reducen en las razones 33, 5 y 1, al pasar de dimensión 3 a 2 y 1. Este conducto lineal que la calsecuestrina hipotéticamente proporciona ha sido llamado “alambre de calcio” [73].

La otra idea es una consecuencia inevitable de las evidencias obtenidas en solución [68-70]: la calsecuestrina debería despolimerizarse cuando el retículo sarcoplasmático libera mucho calcio. Ya hemos visto que la proteína obra como sensor, de algún modo causando cierre de canales cuando el calcio baja. La despolimerización, que ocurre a valores reducidos de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$, podría ser el mecanismo por el cual la señal se pasa al canal, ya que como vimos calsecuestrina y receptores de rianodina se vinculan alostéricamente por medio de triadina y juntina. Es concebible que, ligada como monómero, la calsecuestrina afecte al receptor de rianodina de un modo distinto al del

polímero. Esta peculiar dependencia de su función de fuente con la concentración de calcio también haría a la calsecuestrina una fuente “inteligente”, que proporciona poder amortiguador máximo en el rango de concentraciones donde es más útil, es decir, cerca de las concentraciones de calcio de reposo, cuando el músculo debe responder al máximo para “luchar o huir”.

Redefiniendo el cuplón

Por haber sido definido en forma bastante laxa, en tiempos en que no se conocía bien la constitución molecular del sistema de liberación de calcio, el concepto de cuplón ha sido usado y extendido en forma diversa, como una mancha de Rorschach, según la imaginación y preferencias del usuario. Los descubrimientos recientes sobre la multiplicidad y complejidad de los agrupamientos de receptores en músculo cardíaco han llevado por ejemplo a hablar de sub-cuplones y súper-cuplones [22, 23].

Nuestra primera definición sugirió incluir aquellas proteínas ligadas físicamente, que además tuvieran funciones dinámicas, no simplemente de soporte. Así, en el músculo esquelético debería incluirse el receptor de DHP de la membrana plasmática, el receptor de rianodina, y las proteínas que forman la cadena alostérica, incluyendo triadina, juntina, y los polímeros de calsecuestrina. Otras proteínas de unión permanente (la FKBP en sus variantes 12 y 12.6 [74]) o transitoria con los RyR (sorcina [75], homer [76] y calmodulina, que interactúa tanto con los RyR [77] como los DHPR [78]) también deberían incluirse.

Sin embargo, la definición no puede excluir proteínas que no están directamente ligadas al receptor de rianodina, como el DHPR del músculo cardíaco (Cav1.2), y en músculo esquelético los RyR3, que como vimos están en posición para-juntural, no ligados a los RyR1. Parece lógico entonces flexibilizar la definición y admitir todas las proteínas que de algún modo participen dinámicamente en los eventos de liberación de calcio, un grupo que crece día a día.

17 (continuación) en el sentido constructivo de la palabra, propiedad manifiesta en la polimerización de la calsecuestrina.

Nota de agradecimiento

Agradezco a los editores de AnFaMed, que me permitieron describir cosas que me importan, a los colaboradores directos, Gustavo Brum, Gonzalo Pizarro y Gonzalo Ferreira, que tanto contribuyeron a esta pequeña empresa, por supuesto a los maestros (Venus González-Panizza, Pablo Carlevaro, Ulises Gelós, Elio García-Austt, Antonio Frumento), a los compañeros de siempre (Elia Nunes, Jorge Castro, Carmen Candreva, Carlos García-Moreira, Carlos Romero, Fernando Nieto, Enrique Barrios, por nombrar sólo unos cuantos) y a Lourdes C Figueroa, Carlo Manno y Patricia Linn, cuyas sugerencias mejoraron mucho el artículo en coherencia y legibilidad. También por supuesto están los colaboradores de otros países, demasiados para nombrar, y el ciudadano norteamericano, gran pagador de impuestos, que bancó todo. Pero el esfuerzo se lo dedico a la querida Generación 64 de estudiantes de medicina, cuya reunión cincuentenaria, ocurrida hace poco, sólo pude acompañar desde lejos.

Referencias

- Sommer JR, High T, Ingram P, Kopf D, Nassar R, Taylor I. EJSR/JSR: three-dimensional geometry of an ionic charge with fuse. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Sep 16;853:361-4
- Sandow A. Excitation-contraction coupling in muscular response. *Yale J Biol Med.* 1952 Dec;25(3):176-201
- Lai FA, Erickson HP, Rousseau E, Liu QY, Meissner G. Purification and reconstitution of the calcium release channel from skeletal muscle. *Nature.* 1988 Jan 28;331(6154):315-9
- Ríos E, Brum G. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature.* 1987 Feb 19-25;325(6106):717-20.
- Tanabe T, Beam KG, Powell JA, Numa S. Restoration of excitation-contraction coupling and slow calcium current in dysgenic muscle by dihydropyridine receptor complementary DNA. *Nature.* 1988 Nov 10;336(6195):134-9
- Endo M, Tanaka M, Ogawa Y. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature.* 1970 Oct 3;228(5266):34-6.
- Endo M. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Physiol Rev.* 2009;89:1153-1176.
- Schneider MF, Chandler WK. Voltage dependent charge movement of skeletal muscle: a possible step in excitation-contraction coupling. *Nature.* 1973 Mar 23;242(5395):244-6
- Ríos E, Karhanek M, Ma J, González A. An allosteric model of the molecular interactions of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 1993 Sep;102(3):449-81.
- Monod J, Wyman J, Changeux JP. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol.* 1965 May;12:88-118
- Ríos E, Pizarro G. Voltage sensors and calcium channels of excitation-contraction coupling. *Physiology.* 1988; 3:223-27.
- Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science.* 1993 Oct 29;262(5134):740-4.
- Tsugorka A, Ríos E, Blatter LA. Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science.* 1995 Sep 22;269(5231):1723-6
- Shirokova N, García J, Pizarro G, Ríos E. Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum compared in amphibian and mammalian skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 1996 Jan;107(1):1-18.
- Gillespie DT. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *J Phys Chem.* 1977; 81 (25):2340-61
- Stern MD, Pizarro G, Ríos E. Local control model of excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 1997 Oct;110(4):415-40.
- Stern MD, Song LS, Cheng H, Sham JS, Yang HT, Boheler KR, et al. Local control models of cardiac excitation-contraction coupling. A possible role for allosteric interactions between ryanodine receptors. *J Gen Physiol.* 1999 Mar;113(3):469-89.
- Stern MD, Ríos E, Maltsev VA. Life and death of a cardiac calcium spark. *J Gen Physiol.* 2013 Sep;142(3):257-74. doi: 10.1085
- Diaz-Sylvester PL, Neumann JT, Fleischer S, Copello JA. Coupled gating of ryanodine receptors: evidence for a role of physical RyR-RyR interactions. *Biophys J.* 2014; 106(2 Supl 1):109a-10a.

20. Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V. Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys J*. 1999 Sep;77(3):1528-39.
21. Rust MJ, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*. 2006 Oct;3(10):793-5.
22. Baddeley D, Jayasinghe ID, Lam L, Rossberger S, Cannell MB, Soeller C. Optical single-channel resolution imaging of the ryanodine receptor distribution in rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 29;106(52):22275-80. doi: 10.1073
23. Scriven DR, Asghari P, Moore ED. Microarchitecture of the dyad. *Cardiovasc Res*. 2013 May 1;98(2):169-76.
24. Felder E, Protasi F, Hirsch R, Franzini-Armstrong C, Allen PD. Morphology and molecular composition of sarcoplasmic reticulum surface junctions in the absence of DHPR and RyR in mouse skeletal muscle. *Biophys J*. 2002 Jun;82(6):3144-9.
25. Shirokova N, García J, Ríos E. Local calcium release in mammalian skeletal muscle. *J Physiol*. 1998 Oct 15;512 (Pt 2):377-84.
26. Kirsch WG, Uttenweiler D, Fink RH. Spark-and ember-like elementary Ca²⁺ release events in skinned fibres of adult mammalian skeletal muscle. *J Physiol*. 2001 Dec 1;537(Pt 2):379-89.
27. Pouvreau S, Royer L, Yi J, Brum G, Meissner G, Ríos E, et al. Ca(2+) sparks operated by membrane depolarization require isoform 3 ryanodine receptor channels in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 20;104(12):5235-40.
28. Carafoli E. Calcium -a universal carrier of biological signals. Delivered on 3 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels. *FEBS J*. 2005 Mar;272(5):1073-89.
29. Treves S, Vukcevic M, Maj M, Thurnheer R, Mosca B, Zorzato F. Minor sarcoplasmic reticulum membrane components that modulate excitation-contraction coupling in striated muscles. *J Physiol*. 2009 Jul 1;587(Pt 13):3071-9.
30. Ríos E, Györke S. Calsequestrin, triadin and more: the molecules that modulate calcium release in cardiac and skeletal muscle. *J Physiol*. 2009 Jul 1;587(Pt 13):3069-70.
31. Boncompagni S, Thomas M, López JR, Allen PD, Yuan Q, Kranias EG, et al. Triadin/Junctin double null mouse reveals a differential role for Triadin and Junctin in anchoring CASQ to the jSR and regulating Ca(2+) homeostasis. *PLoS One*. 2012;7(7):e39962.
32. Faggioni M, Knollmann BC. Calsequestrin 2 and arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Mar 15;302(6):H1250-60.
33. MacLennan DH, Zvaritch E. Mechanistic models for muscle diseases and disorders originating in the sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*. 2011 May;1813(5):948-64.
34. Tomasi M, Canato M, Paolini C, Dainese M, Reggiani C, Volpe P, et al. Calsequestrin (CASQ1) rescues function and structure of calcium release units in skeletal muscles of CASQ1-null mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012 Feb 1;302(3):C575-86.
35. Dainese M, Quarta M, Lyfenko AD, Paolini C, Canato M, Reggiani C, et al. Anesthetic- and heat-induced sudden death in calsequestrin-1-knockout mice. *FASEB J*. 2009 Jun;23(6):1710-20.
36. Roux-Buisson N, Cacheux M, Fourest-Lieuvain A, Fauconnier J, Brocard J, Denjoy I, et al. Absence of triadin, a protein of the calcium release complex, is responsible for cardiac arrhythmia with sudden death in human. *Hum Mol Genet*. 2012 Jun 15;21(12):2759-67.
37. Tung CC, Lobo PA, Kimlicka L, Van Petegem F. The amino-terminal disease hotspot of ryanodine receptors forms a cytoplasmic vestibule. *Nature*. 2010 Nov 25;468(7323):585-8.
38. Samsó M, Wagenknecht T, Allen PD. Internal structure and visualization of transmembrane domains of the RyR1 calcium release channel by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol*. 2005 Jun;12(6):539-44.
39. Durham WJ, Wehrens XH, Sood S, Hamilton SL. Diseases associated with altered ryanodine receptor activity. *Subcell Biochem*. 2007;45:273-321.
40. Manno C, Figueroa L, Royer L, Pouvreau S, Lee CS, Volpe P, et al. Altered Ca²⁺ concentration, permeability and buffering in the myofibre Ca²⁺ store of a mouse model of malignant hyperthermia. *J Physiol*. 2013 Sep 15;591(Pt 18):4439-57.
41. Pizarro G, Ríos E. How source content determines intracellular Ca²⁺ release kinetics.

- Simultaneous measurement of $[Ca^{2+}]$ transients and $[H^+]$ displacement in skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 2004 Sep;124(3):239-58.
42. MacLennan DH, Wong PT. Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971 Jun;68(6):1231-5.
 43. MacLennan DH, Yip CC, Iles GH, Seeman P. 1972. Isolation of sarcoplasmic reticulum proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1973; 37: 469-77.
 44. Manno C, Sztretye M, Figueroa L, Allen PD, Ríos E. Dynamic measurement of the calcium buffering properties of the sarcoplasmic reticulum in mouse skeletal muscle. *J Physiol.* 2013 Jan 15;591(Pt 2):423-42.
 45. Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Dordrecht: Kluwer Academic; 2001.
 46. MacLennan DH, Chen SR. Store overload-induced Ca^{2+} release as a triggering mechanism for CPVT and MH episodes caused by mutations in RYR and CASQ genes. *J Physiol.* 2009 Jul 1;587(Pt 13):3113-5.
 47. Zima AV, Picht E, Bers DM, Blatter LA. Termination of cardiac Ca^{2+} sparks: role of intra-SR $[Ca^{2+}]$, release flux, and intra-SR Ca^{2+} diffusion. *Circ Res.* 2008 Oct 10;103(8):e105-15.
 48. Brochet DX, Yang D, Di Maio A, Lederer WJ, Franzini-Armstrong C, Cheng H. Ca^{2+} blinks: rapid nanoscopic store calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Feb 22;102(8):3099-104.
 49. Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Valdivia HH, Escobar AL, Györke S. Luminal Ca^{2+} controls termination and refractory behavior of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2002 Sep 6;91(5):414-20.
 50. Györke S, Stevens SC, Terentyev D. Cardiac calsequestrin: quest inside the SR. *J Physiol.* 2009 Jul 1;587(Pt 13):3091-4.
 51. Stern MD. Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle. *Biophys J.* 1992 Aug;63(2):497-517.
 52. Sobie EA, Dilly KW, dos Santos Cruz J, Lederer WJ, Jafri MS. Termination of cardiac Ca^{2+} sparks: an investigative mathematical model of calcium-induced calcium release. *Biophys J.* 2002 Jul;83(1):59-78.
 53. Guo T, Gillespie D, Fill M. Ryanodine receptor current amplitude controls Ca^{2+} sparks in cardiac muscle. *Circ Res.* 2012 Jun 22;111(1):28-36.
 54. Gillespie D, Fill M. Pernicious attrition and inter-RyR2 CICR current control in cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 May;58:53-8.
 55. Laver DR, Kong CH, Imtiaz MS, Cannell MB. Termination of calcium-induced calcium release by induction decay: an emergent property of stochastic channel gating and molecular scale architecture. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Jan;54:98-100.
 56. Zhao M, Li P, Li X, Zhang L, Winkfein RJ, Chen SR. Molecular identification of the ryanodine receptor pore-forming segment. *J Biol Chem.* 1999 Sep 10;274(37):25971-4.
 57. Launikonis BS, Zhou J, Royer L, Shannon TR, Brum G, Ríos E. Confocal imaging of $[Ca^{2+}]$ in cellular organelles by SEER, shifted excitation and emission ratioing of fluorescence. *J Physiol.* 2005 Sep 1;567(Pt 2):523-43.
 58. Launikonis BS, Zhou J, Royer L, Shannon TR, Brum G, Ríos E. Depletion “skraps” and dynamic buffering inside the cellular calcium store. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 21;103(8):2982-7.
 59. Ziman AP, Ward CW, Rodney GG, Lederer WJ, Bloch RJ. Quantitative measurement of Ca^{2+} in the sarcoplasmic reticulum lumen of mammalian skeletal muscle. *Biophys J.* 2010 Oct 20;99(8):2705-14.
 60. Robin G, Allard B. Major contribution of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} depletion during long-lasting activation of skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 2013 May;141(5):557-65.
 61. Palmer AE, Giacomello M, Kortemme T, Hires SA, Lev-Ram V, Baker D, et al. Ca^{2+} indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem Biol.* 2006 May;13(5):521-30.
 62. Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, et al. Fluorescent indicators for Ca^{2+} based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature.* 1997 Aug 28;388(6645):882-7.
 63. Sztretye M, Yi J, Figueroa L, Zhou J, Royer L, Ríos E, et al. D4cpv-calsequestrin: a sensitive ratiometric biosensor accurately targeted to the calcium store of skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 2011 Aug;138(2):211-29.

64. Sztretye M, Yi J, Figueroa L, Zhou J, Royer L, Allen P, et al. Measurement of RyR permeability reveals a role of calsequestrin in termination of SR Ca^{2+} release in skeletal muscle. *J Gen Physiol.* 2011 Aug;138(2):231-47.
65. Canato M, Scorzeto M, Giacomello M, Protasi F, Reggiani C, Stienen GJ, et al. Massive alterations of sarcoplasmic reticulum free calcium in skeletal muscle fibers lacking calsequestrin revealed by a genetically encoded probe. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Dec 21;107(51):22326-31.
66. Rudolf R, Magalhães PJ, Pozzan T. Direct in vivo monitoring of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} and cytosolic cAMP dynamics in mouse skeletal muscle. *J Cell Biol.* 2006 Apr 24;173(2):187-93.
67. Tang S, Wong HC, Wang ZM, Huang Y, Zou J, Zhuo Y, et al. Design and application of a class of sensors to monitor Ca^{2+} dynamics in high Ca^{2+} concentration cellular compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Sep 27;108(39):16265-70.
68. Park H, Wu S, Dunker AK, Kang C. Polymerization of calsequestrin. Implications for Ca^{2+} regulation. *J Biol Chem.* 2003 May 2;278(18):16176-82.
69. Park H, Park IY, Kim E, Youn B, Fields K, Dunker AK, et al. Comparing skeletal and cardiac calsequestrin structures and their calcium binding: a proposed mechanism for coupled calcium binding and protein polymerization. *J Biol Chem.* 2004 Apr 23;279(17):18026-33.
70. Sanchez EJ, Lewis KM, Danna BR, Kang C. High-capacity Ca^{2+} binding of human skeletal calsequestrin. *J Biol Chem.* 2012 Mar 30;287(14):11592-601.
71. Katz AK, Glusker JP, Beebe SA, Bock CW. Calcium Ion coordination: a comparison with that of Beryllium, Magnesium, and Zinc. *J Am Chem Soc.* 1996;118(24): 5752–5763.
72. Adam G, Delbruck M. Reduction of dimensionality in biological diffusion processes. In: Rich A, Davidson N, editores. *Structural chemistry and molecular biology.* San Francisco: W. H. Freeman; 1968. p. 198–215.
73. MacLennan DH, Reithmeier RA. Ion tamers. *Nat Struct Biol.* 1998 Jun;5(6):409-11. Comentario sobre: Wang S, Trumble WR, Liao H, Wesson CR, Dunker AK, Kang CH. Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nat Struct Biol.* 1998 Jun;5(6):476-83
74. Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Deng SX, Vest JA, Cervantes D, et al. Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing protein calstabin2. *Science.* 2004 Apr 9;304(5668):292-6.
75. Valdivia HH, Farrell EF, Antaramian A, Benkusky N, Zhu X, Rueda A, et al. Sorcin and ryanodine receptors in heart failure. *J Muscle Res Cell Motil.* 2004;25(8):605-7.
76. Pouliquin P, Dulhunty AF. Homer and the ryanodine receptor. *Eur Biophys J.* 2009 Dec;39(1):91-102.
77. Prosser BL, Hernández-Ochoa EO, Schneider MF. S100A1 and calmodulin regulation of ryanodine receptor in striated muscle. *Cell Calcium.* 2011 Oct;50(4):323-31.
78. Halling DB, Aracena-Parks P, Hamilton SL. Regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels by calmodulin. *Sci STKE.* 2006 Jan 17;2006(318):er1.
79. Felder E, Franzini-Armstrong C. Type 3 ryanodine receptors of skeletal muscle are segregated in a parajunctional position. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Feb 5;99(3):1695-700.
80. Priori SG, Chen SR. Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} handling and arrhythmogenesis. *Circ Res.* 2011 Apr 1;108(7):871-83.
81. Samsó M, Feng W, Pessah IN, Allen PD. Coordinated movement of cytoplasmic and transmembrane domains of RyR1 upon gating. *PLoS Biol.* 2009 Apr 14;7(4):e85.