CENTRO DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES

Facultad de Ciencias Médicas - UNLP

Tesis Doctoral

“Nuevos moduladores involucrados en la fosforilación de proteínas que regulan la contractilidad miocárdica:

Proteínas Epac”

Noelia Lezcano

Directora: Cecilia Mundiña-Weilenmann

Co-directora: Leticia Vittone

A Ignacio, parte esencial

de este trabajo de tesis y de mi vida

...y a nuestros hijos, Cata y Bauti.

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a Cecilia, mi directora, sin la cual nada de esto hubiera sido posible. Gracias por la confianza depositada, por haberme elegido aquel primer día en el que me presenté en el laboratorio del subsuelo y por seguirme apoyando en todo este tiempo. Hemos recorrido un largo camino juntas para llegar a este punto, en el cual podemos entregarles a ustedes estas palabras, que resumen varios años de trabajo y esfuerzo, de alegrías y tristezas, de batallas ganadas y unas cuantas perdidas. Pero finalmente el día llegó, y me llena de orgullo decir: *“He aquí mi Trabajo de Tesis”*.

Por supuesto quiero darle también mi agradecimiento más sincero a Leticia, mi codirectora, quien nos ayudó muchísimo en la organización y escritura. Gracias por compartir tus conocimientos conmigo y por tus consejos, llenos de sabiduría y experiencia.

Le agradezco a Alicia Mattiazzi, directora del Centro de Investigaciones Cardiovasculares mientras realicé mis experimentos, por haberme dado la oportunidad de ser parte de su maravilloso grupo de investigadores y becarios. Por fomentar el trabajo arduo y la capacitación constante, pero además el buen compañerismo y las buenas relaciones, ofreciendonos su casa para celebrar la culminación de cada nuevo año, haciendonos sentir parte de su familia.

Gracias especiales a Romina, un hermoso regalo de amistad que me ha dado este trabajo. Con ella compartimos varias tardes de pipiteos y “corridas”, salpicadas de mates y charlas. Gracias Ro por estar siempre ahí, por ser una amiga en la que pude contar en todo momento y en la cual encontré la calma que necesitaba en mis días de furia (esos en los que a los experimentos no se les antojaba salir como pretendíamos).

No puedo dejar de agradecerle también al resto de mis compañeros del laboratorio, cada uno de ellos ofreciendome sus conocimientos, aportando su grano de arena para que yo pueda ir construyendo mi propia “historia científica”. Gracias Mati, por tu enorme ayuda experimental. Gracias Charly, Margarita, Omín, Moni, Omar, Luis, Ale Y, Ale O, Vero, Julieta, Bernardo, Patricio, Martín, Irene, Mariela, Alfredo y especialmente a Jesi y Mari, por ser además mis hermosas amigas.

Y desde lo más profundo de mi corazón quiero agradecerle a Nacho, quien fue mi compañero de experimentos durante mis tres primeros años de beca, para luego convertirse en mi compañero de vida. Gracias amor por tantos consejos, por tanta ayuda en mis primeros pasos en el laboratorio, por tus aportes fundamentales a este Trabajo de Tesis y por tantas risas compartidas. Gracias por ser mi motor cuando me quedaba sin cuerda, por ser mi inspiración constante y por apuntalarme en los momentos en los que pretendía bajar los brazos... te voy a estar eternamente agradecida.

ÍNDICE

Glosario de abreviaturas.....	6
Introducción.....	11
I- Contracción miocárdica.....	11
II- El RS como regulador del ciclado de Ca^{+2}	16
III – Proteínas del RS involucradas en el ciclado del Ca^{+2}	19
Receptor de Rianodina.....	19
Proteínas citosólicas asociadas a RyR2.....	22
Proteínas intraluminales asociadas a RyR2.....	24
Bomba de Ca^{+2} ATP-dependiente y fosfolamban.....	27
IV- Fosforilación proteica como mecanismo regulador de la función contráctil.....	30
Proteínas Serina/Treonina quinasas.....	31
Proteínas Serina/Treonina fosfatasas.....	35
V- Efecto de la fosforilación sobre las proteínas del RS involucradas en el manejo del Ca^{+2} asociado a la función contráctil	38
VI- Estimulación β -adrenérgica: su señalización.....	41
Vía clásica: activación de PKA.....	42
Vía independiente de PKA: activación de Epac.....	45
Hipótesis Experimental.....	54
Objetivos.....	55
Materiales y Métodos.....	56
Resultados.....	69
Discusión y Conclusiones.....	89
Bibliografía.....	104

Glosario de Abreviaturas

$[Ca^{+2}]_c$: concentración de calcio citosólico

$[Ca^{+2}]_o$: concentración de calcio extracelular

$+dP/dt_{m\acute{a}x}$: máxima velocidad de desarrollo de presión ventricular izquierda

$^{\circ}C$: grado centígrado

8-CPT: 8-(4-chloro-phenylthio)-2'-O-metiladenosina-3',5'-AMPc

AC: adenilato ciclasa

AEC: acoplamiento éxcito-contráctil

AET: acoplamiento excitación-transcripción

AKAP: proteína de anclaje de quinasas

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

apoCaM: calmodulina libre de calcio

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosín trifosfato

ATPasa: actividad enzimática con capacidad de hidrolizar ATP

BBS: solución buffer bicarbonato

Ca^{+2} : ion calcio

CaCaM: calmodulina asociada a calcio

CaM: calmodulina

CaMKII: proteína quinasa dependiente de calcio y calmodulina

CC: Calfostina C

Cn: calcineurina

CNB: dominio de unión al AMP cíclico

CQS: calsecuestrina

C-terminal: extremo carboxilo terminal

Ctrl: control

DAD: postdespolarizaciones tardías

DAG: diacilglicerol

DEP: dominio de asociación a membrana presente en proteínas Epac

EAD: postdespolarizaciones tempranas

EDTA: ácido etilendiamintetraacético

EGTANa₂: ácido etilenglicol tetraacético de sodio

Epac: proteína intercambiadora activada por AMPc

FF: miofilamento fino

FG: miofilamento grueso

FKBP12.6: calstabilina

Fura-2AM: fura-2 acetometil ester

GDP: guanosín bifosfato

GRK: quinasa del receptor acoplado a proteína G

Gs: proteína G estimuladora

GTP: guanosín trifosfato

HRC: proteína de unión al calcio rica en histidina

Hz: Hertz

I_{Ca}: corriente de calcio

I_{Na}: corriente de sodio

Inh-1: inhibidor-1

Inh-2: inhibidor-2

IP₃: inositol-1,4,5-trifosfato

I_{ti}: corriente de Ca⁺² transitoria

K_d: constante de disociación

kDa: kilo Dalton

KO: knock out

LTCC: canal de calcio tipo L

mAKAP: proteína de anclaje de quinasas específica de músculo

MAPKs: quinasas activadas por mitógenos

MBPc: proteína C de unión a la miosina

mCU: uniporter de calcio mitocondrial

Met: aminoácido metionina

Min: minutos

mPTP: poro de transición mitocondrial

Na⁺/K⁺ATPasa: bomba de sodio y potasio ATPasa

NCX: intercambiador sodio/calcio

N-terminal: extremo amino terminal

PA: potencial de acción

PDE: fosfodiesterasa

PDF: presión diastólica final

PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bifosfato

PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

PKs: proteínas quinasas

PLC: proteína lipasa C

PLN: fosfolamban

PLN-DM: cepa doble mutante de PLN (ambos sitios de fosforilación mutados a alanina)

PMCA: bomba de calcio sarcolemal

P_o: probabilidad de apertura

PP1: proteína fosfatasa tipo 1

PP2: proteína fosfatasa tipo 2

PPs: proteínas fosfatasas

PSM: presión sistólica máxima

PVDF: polivinilideno difluoruro

PVI: presión desarrollada por el ventrículo izquierdo

RS: retículo sarcoplasmático

RyR: receptor de rianodina o canal de calcio del retículo sarcoplasmático

S2814A: cepa mutante de RyR2 (el sitio Ser2814 fue reemplazado por alanina)

SDS: dodecilsulfato de sodio

Seg: segundos

Ser: aminoácido serina

SERCA: bomba de calcio del retículo sarcoplasmático

SLN: sarcolipina

SN: sobrenadante

ST: solución Tyrode

Subunidad C: subunidad catalítica de la proteína quinasa A

Subunidad R: subunidad regulatoria de la proteína quinasa A

t_{1/2}: tiempo a la mitad de la relajación

TBS: solución salina amortiguadora de tris

TBS-T: TBS suplementado con Tween (detergente)

TG: transgénico

Thr: aminoácido treonina

TnI: troponina I

Túbulos T: túbulos transversos

WT: cepa salvaje

β -AR: receptor beta-adrenérgico

τ : constante de tiempo

CENTRO DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES

Facultad de Ciencias Médicas - UNLP

INTRODUCCIÓN

I - Contracción miocárdica

En 1883, Sydney Ringer estableció que el calcio (Ca^{+2}) era un ión indispensable para que ocurriera la contracción cardíaca. Desde este primer hallazgo hasta la actualidad, nuestro conocimiento acerca de los mecanismos que regulan el Ca^{+2} intracelular y su incidencia sobre la función cardíaca, ha ido en ascenso.

En la célula cardíaca, el Ca^{+2} es almacenado dentro de una red de vesículas intracelulares denominada retículo sarcoplasmático (RS) (Hassenbalch y Makinose, 1961). El RS es un sistema de membranas con características fisicoquímicas semejantes a las de la membrana plasmática (sarcolema) y está en íntima cercanía (aunque sin continuidad) a invaginaciones del sarcolema llamadas túbulos transversos (túbulos T). Pueden distinguirse dos porciones en el RS: las cisternas terminales, que consisten en un ensanchamiento cercano a los túbulos T y los túbulos longitudinales que se extienden de cisterna a cisterna. La asociación entre el túbulo T y la cisterna terminal del RS forma una estructura típica denominada díada.

El Ca^{+2} almacenado en el RS tiene la posibilidad de ser rápidamente liberado al citosol, lo que determina un incremento en la concentración citoplasmática del ión, que varía de $0,1 \mu\text{M}$ en reposo hasta $1 \mu\text{M}$ durante la contracción. Una vez en el citosol, el Ca^{+2} interactúa con los miofilamentos. Los miofilamentos están organizados en miofibrillas, estructuras proteicas que ocupan prácticamente la totalidad del volumen citoplasmático. Las miofibrillas están divididas en una serie de unidades repetidas longitudinalmente llamadas sarcómeros, que constituyen la unidad funcional contráctil del músculo cardíaco. Cada sarcómero tiene una longitud media de $2 \mu\text{m}$, y está delimitado por regiones conocidas como discos Z. Extendiéndose en ambas direcciones desde los discos Z, hay numerosos miofilamentos finos (FF) que se intercalan entre miofilamentos gruesos (FG). Los FF están formados por monómeros de actina que se

ordenan en dos cadenas enrolladas helicoidalmente y dos proteínas regulatorias: la troponina, con sus isoformas C, I y T y la tropomiosina. Los FG están compuestos principalmente por la miosina y otras proteínas que regulan su actividad como la proteína C de unión a la miosina (MBPc). La unión del Ca^{+2} a la troponina C propicia el deslizamiento de los FF sobre los FG hacia el centro del sarcómero. El acortamiento simultáneo de los sarcómeros produce la contracción del músculo cardíaco o sístole (Bers, 2001).

Pero para que la contracción cardíaca se lleve a cabo es necesario un proceso previo de excitación eléctrica. La despolarización espontánea del sarcolemma a nivel de las células del nódulo sinoauricular genera un potencial de acción (PA) que se propaga por el sistema de conducción a todo el corazón. Este PA fluye de un miocito a otro a través de canales especializados de baja resistencia llamados uniones gap (Weidmann, 1966).

El PA del miocardio ventricular está determinado por el movimiento a través del sarcolemma de Na^+ , K^+ , Ca^{+2} y Cl^- principalmente. La despolarización inicial se produce por la apertura de los canales rápidos de Na^+ y el consecuente ingreso del ión al interior celular (I_{Na}), lo que modifica el potencial de membrana desde -80 mV (potencial de reposo) hasta aproximadamente +50 mV. Esta despolarización induce la apertura de canales de Ca^{+2} operados por voltaje (LTCC) y la consecuente generación de una corriente de Ca^{+2} (I_{Ca}) hacia el interior celular. Esta etapa es clave en la contracción cardíaca, ya que determina el acople entre el estímulo eléctrico y la respuesta contráctil (proceso que se detallará a continuación). Finalmente, las corrientes repolarizantes representadas por el movimiento de Cl^- y K^+ a través de sus canales respectivos, llevan el potencial de membrana a los valores de reposo.

Como se acaba de mencionar, la contracción se inicia cuando el Ca^{+2} ingresa a la célula a través de los LTCC. En la Figura 1 se muestra un esquema simplificado donde puede observarse que los LTCC se encuentran en los túbulos T, en estrecha proximidad al RS. Es por ello que la apertura de estos canales causa un incremento localizado de Ca^{+2} en la hendidura

entre el sarcolema y el RS que activa la apertura de canales de Ca^{+2} de la membrana del RS o receptores de rianodina (RyR2) cuya consecuencia final es la liberación del Ca^{+2} contenido en el RS. Este proceso fue definido por Fabiato y Fabiato (1977) como “*liberación de calcio inducida por calcio*”. La apertura del RyR2 amplifica entonces la señal de Ca^{+2} inicial, proveyendo el Ca^{+2} necesario para activar la maquinaria contráctil.

El Ca^{+2} citosólico que aumentó durante la contracción es removido principalmente a través de su recaptura hacia el RS por la bomba de Ca^{+2} del RS (SERCA2a) y en menor medida por el intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ (NCX) y la bomba de Ca^{+2} sarcolemal (PMCA), que lo extruyen hacia el espacio extracelular (Bers, 2001). La mitocondria también contribuye a la remoción del Ca^{+2} citosólico a través del recientemente identificado canal de Ca^{+2} mitocondrial (mCU) (De Stefani y col., 2011). Estudios realizados por Bassani y colaboradores (1992) mostraron que la PMCA y la mitocondria son 50 veces más lentos en la remoción del Ca^{+2} citosólico que el NCX; a su vez SERCA2a es 3-4 veces más rápida que éste último. Entonces, la disminución del Ca^{+2} citosólico depende fundamentalmente de la actividad de la SERCA2a y esto conduce a la relajación del músculo cardíaco o diástole.

Figura 1. Acoplamiento excito-contráctil cardíaco.

De lo antedicho se puede deducir que la traducción del estímulo eléctrico a función contráctil, fenómeno conocido como *acoplamiento excito-contráctil* (AEC), está mediada por el Ca^{+2} intracelular, que aumenta y disminuye cíclicamente (transitorio de Ca^{+2}). Este ciclado de Ca^{+2} determina el ciclo mecánico contracción/relajación o sístole/diástole en cada latido, sustentando así la función del corazón como bomba impulsora de sangre. Es crítico entonces que exista una precisa regulación del ciclado de Ca^{+2} a fin de mantener un adecuado mecanismo de contracción y relajación cardíacas latido a latido.

II - El RS como regulador del ciclado del Ca^{+2}

El ciclado del Ca^{+2} en el interior del miocito, y en consecuencia la función contráctil, dependen en forma crítica del RS. Como dijimos más arriba, este sistema de membranas es el principal responsable del aumento y disminución del Ca^{+2} citosólico ($[\text{Ca}^{+2}]_c$) y cumple su función a través del accionar coordinado de tres proteínas fundamentales: 1) RyR2, responsable de la salida de Ca^{+2} del RS: liberación inducida por I_{Ca} en sístole o como veremos más adelante, pérdida espontánea en diástole; 2) SERCA2a, responsable del secuestro de Ca^{+2} y 3) Fosfolamban (PLN), proteína reguladora de la actividad de SERCA2a.

La función cardíaca normal requiere un balance adecuado entre el Ca^{+2} liberado a través del RyR2 tanto en sístole como en diástole, y el Ca^{+2} secuestrado a través de SERCA2a/PLN, con un delicado control en cada latido. La modificación de este balance generará beneficios y/o riesgos potenciales (Figura 2). Así el aumento del secuestro de Ca^{+2} o la disminución de su pérdida, aumentan el contenido de Ca^{+2} del RS, lo que mejora la contractilidad y la relajación y puede reducir señales adversas dependientes del aumento de la $[\text{Ca}^{+2}]_c$ diastólica. Por otro lado, una disminución del secuestro o un aumento de la pérdida conducen a una disminución del contenido de Ca^{+2} del RS con aumento de la $[\text{Ca}^{+2}]_c$ diastólica. Este trastorno se traduce en un deterioro de la contractilidad y la relajación, y es inductor de señales perjudiciales que provocan arritmias y/o muerte celular.

Figura 2. Esquema de las alteraciones en el ciclado del Ca^{+2} por el RS y sus principales consecuencias funcionales.

Uno de los mecanismos generadores de arritmias a nivel celular es la despolarización espontánea del potencial de membrana, conocida con el nombre genérico de postdespolarización. Las postdespolarizaciones se dividen en dos tipos: postdespolarizaciones tempranas (EADs, *early afterdepolarizations*) que son despolarizaciones de la membrana celular que ocurren antes de la finalización del PA normal y postdespolarizaciones tardías (DADs, *delay afterdepolarizations*) que ocurren luego de la finalización del PA normal. Las DADs son causadas por pérdida espontánea de Ca^{+2} desde el RS (Miura y col., 1993). Este Ca^{+2} liberado entre latidos activa una corriente despolarizante transitoria (I_{ti}). El principal responsable de esta corriente en el corazón de mamíferos es el NCX que, trabajando en su modo directo, extruye 1 Ca^{+2} e introduce 3 Na^{+} , promoviendo una corriente transitoria de Na^{+} , que eventualmente origina latidos prematuros (Pogwizd y col., 2001). La pérdida espontánea de Ca^{+2} del RS podría ocurrir por dos mecanismos fundamentales: sobrecarga de Ca^{+2} del RS y/o disfunción del RyR2, con aumento de su sensibilidad al Ca^{+2} luminal. Esto último puede

deberse a mutaciones o alteraciones postraduccionales del canal, por ejemplo, procesos de fosforilación y/o cambios redox (Priori y col., 2001; Maier y col., 2003; Cutler y col., 2012). Un trabajo reciente de nuestro laboratorio demostró que la fosforilación de RyR2 en su sitio Ser2814/5 específico para la proteína quinasa dependiente de Ca^{+2} y CaM (CaMKII), es responsable de la aparición del 60% de latidos prematuros presentes en la reperusión temprana luego de una isquemia (Said y col., 2011). Estos resultados sugieren que la regulación de la liberación espontánea de Ca^{+2} por el RyR2 es un factor crítico en el origen de las arritmias.

La pérdida espontánea de Ca^{+2} desde el RS puede también llevar a muerte celular por alterar la función mitocondrial. El aumento sostenido del Ca^{+2} diastólico provoca un incremento de la captura de Ca^{+2} por la mitocondria a través del mCU que sobrecarga de Ca^{+2} a esta organela, promoviendo la apertura del poro de transición mitocondrial (mPTP), la liberación del citocromo c y la activación de señales apoptóticas (Szabadkai y Rizzuto, 2004; Chen y col., 2005).

III – Proteínas del RS involucradas en el ciclado del Ca^{+2}

Receptor de Rianodina

Los receptores de rianodina deben su nombre a la capacidad de unirse con alta afinidad al alcaloide rianodina aislado de una planta oriunda de América del Sur y América Central (*Ryania speciosa*).

Se han identificado tres isoformas del receptor: RyR1 predomina en músculo esquelético (Takeshima y col., 1989), RyR3 fue inicialmente identificada en cerebro (Hakamata y col., 1992) mientras que RyR2 es la isoforma mayormente hallada en músculo cardíaco (Otsu y col., 1990).

Figura 3. Monómero de RyR2 y sus proteínas reguladoras.

El RyR2 es un homotetrámero compuesto por monómeros de alrededor de 565 kDa. Como se muestra en la Figura 3, cada monómero contiene de 6 a 8 segmentos transmembrana localizados en el extremo carboxilo terminal (C-terminal). Esta porción representa aproximadamente el 10% de la proteína y es la que forma el poro del canal; el 90% restante está representado por un dominio citosólico que sirve de anclaje para un conjunto de subunidades regulatorias y enzimas que modulan la función del canal (Zalk y col., 2007). A $[Ca^{+2}]_c$ diastólica ($\sim 0,1-0,2 \mu M$) el RyR2 se halla normalmente en su estado cerrado. A $[Ca^{+2}]_c$ sistólica ($\sim 1 \mu M$) el Ca^{+2} se une al RyR2 en un sitio de alta afinidad, lo cual favorece el estado abierto del canal, llegando a su máxima actividad a niveles de Ca^{+2} de alrededor de $10 \mu M$ (Copello y col., 1997). Aumentos en la $[Ca^{+2}]_c$ más allá de este valor llevan a una reducción del número de canales en estado abierto debido posiblemente a la unión del Ca^{+2} a un sitio inhibitorio de baja afinidad (Fill y Copello, 2002). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el RyR2 pasa de su estado abierto al cerrado está aún en discusión (Györke y Györke, 1998; Fill y Copello, 2002; Liu y col., 2010).

A nivel de las díadas se distinguen grupos de alrededor de 100 RyR2 (*clusters*) en estrecha proximidad con $\sim 10-25$ LTCC del sarcolema (Bers y Stiffel, 1993). El acoplamiento entre estas proteínas constituye la unidad funcional liberadora de Ca^{+2} (Franzini-Armstrong y col., 1999). Durante el AEC, cada una de las aproximadamente 10.000 unidades liberadoras de Ca^{+2} de un miocito ventricular es activada independientemente por la entrada de Ca^{+2} desde los LTCC, lo que produce un incremento rápido y homogéneo en la concentración citosólica del ión. Esta salida masiva de Ca^{+2} desde el RS hacia el citosol produce, como ya vimos, la elevación de la $[Ca^{+2}]_c$ necesaria para la activación de los miofilamentos y el desarrollo de la contracción.

Un hecho interesante es que, a pesar de que el RyR2 se encuentra mayoritariamente cerrado a niveles de $[Ca^{+2}]_c$ diastólico, el desarrollo de indicadores fluorescentes de alta afinidad permitió la identificación de liberaciones locales de Ca^{+2} , espontáneas e independientes de I_{Ca} , conocidas como *sparks* o chispas de Ca^{+2} (Cheng y col., 1993). Como se describió más arriba, estas pérdidas de Ca^{+2} dependen del contenido de Ca^{+2} del RS -regulación de la actividad del canal por el Ca^{+2} luminal- y de las propiedades intrínsecas de apertura del RyR2. En condiciones fisiopatológicas, cuando las concentraciones lumbinales de Ca^{+2} aumentan por encima del umbral de activación del RyR2 y/o la sensibilidad del RyR2 al Ca^{+2} luminal se incrementa, el mayor número de chispas de Ca^{+2} puede inducir la apertura de RyR2 vecinos, lo que desencadena ondas de Ca^{+2} que se propagan. Esta pérdida masiva de Ca^{+2} promueve la actividad arritmogénica gatillada por DADs (Jiang y col., 2004).

El RyR2 ofrece una amplia plataforma donde se asocian pequeñas moléculas y proteínas que modulan su función (Figura 3) (Bers, 2004). La actividad del canal es regulada además por Mg^{+2} y adenosin trifosfato (ATP) y por modificaciones covalentes tales como fosforilación y oxidación. Existe un amplio número de proteínas que modulan la actividad del canal, ya sea interactuando sobre el lado citosólico o sobre el lado luminal. Entre las que se asocian sobre el lado citosólico podemos mencionar a calmodulina (CaM), calstabilina (FKBP12.6), homer y sorcina. Entre las moduladoras intrarreticulares se encuentran calsecuestrina (CQS), triadina, juntina y proteínas de unión al Ca^{+2} ricas en histidina (HRC), que en su conjunto constituyen sensores de Ca^{+2} que ajustan con mayor precisión la respuesta del RyR2 al Ca^{+2} luminal. A continuación haremos una breve descripción de cada una de ellas.

Proteínas citosólicas asociadas a RyR2

La *calmodulina* es una proteína de 17 kDa expresada en forma ubicua y altamente conservada. Posee cuatro sitios de unión al Ca^{+2} (Strynadka y James, 1989) que se hayan desocupados a $[\text{Ca}^{+2}]_c$ diastólica (apoCaM) y se ocupan en forma cooperativa a medida que la $[\text{Ca}^{+2}]_c$ aumenta, formando el complejo CaCaM. La unión del Ca^{+2} provoca un cambio conformacional en la proteína que le permite asociarse a proteínas blanco y modificar su función. CaM se asocia a RyR2 en una estequiometría de cuatro moléculas por tetrámero y regula su función tanto como apoCaM actuando como agonista parcial, o como CaCaM, inhibiendo el RyR2 e impidiendo así la liberación de Ca^{+2} del RS (Tripathy y col., 1995). Se ha propuesto además que CaCaM podría asistir al cierre de RyR2 luego de la liberación de Ca^{+2} que determina cada latido (Xu y Meissner, 2004).

La proteína denominada *calstabina2* o *FKBP12.6* es una peptidil-prolil cis/trans-isomerasa, miembro de la familia de las inmunofilinas, de peso molecular aparente 12.6 kDa, también asociada a RyR2, con una estequiometría de cuatro moléculas por tetrámero. La unión de calstabina2 estabiliza la conformación cerrada del canal durante la diástole cardíaca, función que cumple sin relación aparente con su actividad enzimática (Timerman y col., 1996). Calstabina2 permite además el acople funcional entre varios RyR2 vecinos, de modo tal de conseguir una actividad liberadora de Ca^{+2} coordinada -apertura simultánea en sístole y cierre simultáneo en diástole- (Marx y col., 2001). Es importante destacar que la disociación de calstabina2 resulta en el desacople funcional de los RyR2.

Homer (también llamada ves1) son proteínas adaptadoras que se asocian a canales iónicos tanto en músculo esquelético como cardíaco (Sandona y col., 2000). Su función a nivel del RyR2 es aún contradictoria (Westhoff y col., 2003; Pouliquin y col., 2009).

Sorcina es una proteína de 22 kDa que al unirse al Ca^{+2} experimenta un cambio conformacional que permite su translocación desde el citosol hacia membranas, donde interactúa con sus proteínas blanco, entre las que se pueden mencionar a RyR2, NCX, LTCC y SERCA2a (Meyers y col., 1995; 1998; Matsumoto y col., 2005). Estudios realizados en experimentos de bicapa lipídica revelaron que cuando sorcina es aplicada del lado citosólico del RyR2, inhibe la probabilidad de apertura (P_o) del canal en forma reversible y dosis dependiente. La elevación en la $[\text{Ca}^{+2}]_c$ debido a la activación de RyR2 provoca la translocación de varias moléculas de sorcina hacia el microambiente del RyR2, por lo que sorcina estaría previniendo una excesiva liberación de Ca^{+2} en sístole. Esta dinámica Ca^{+2} -dependiente entre sorcina y RyR2 permite que, al disminuir la $[\text{Ca}^{+2}]_c$, sorcina se disocie de RyR2 dejándolo disponible para el siguiente disparo. Farrell y colaboradores (2003) demostraron que sorcina no sólo puede inhibir completamente a RyR2 sino que lo hace con tal velocidad que es capaz de modular la liberación de Ca^{+2} latido a latido.

Como se muestra en la Figura 3, otras proteínas que también se asocian al lado citosólico del canal son la *Proteína Quinasa dependiente de Adenosin monofosfato cíclico o AMPc* (PKA), *Proteína Quinasa dependiente de Ca^{+2} y CaM* (CaMKII), *Proteína Fosfatasa tipo 1* (PP1) y *Proteína Fosfatasa tipo 2A* (PP2A), las que, por regular la actividad del canal modificando su estado de fosforilación, serán mencionadas en secciones aparte.

Proteínas intraluminales asociadas a RyR2

Calsequestrina es la principal proteína de unión al Ca^{+2} presente en el interior del RS. Esta proteína de alrededor de 44 kDa, fue identificada por primera vez en músculo esquelético (CQS1) por MacLennan y Wong en 1971. La isoforma cardíaca (CQS2), fue purificada años más tarde por Campbell y colaboradores (1983). CQS2 se encuentra unida al lado interno de la membrana de la cisterna terminal del RS, en la zona de la díada y al unirse al Ca^{+2} experimenta un cambio conformacional. La mayoría del Ca^{+2} presente dentro del RS está unido a CQS2. El hecho de que el Ca^{+2} se encuentre unido a CQS2 permite que se acumule gran cantidad del mismo dentro de la organela, suficiente para asegurar la correcta activación de la maquinaria contráctil a pesar del minúsculo espacio que ocupa el retículo -3,5% del volumen celular total-. Al mismo tiempo, mantiene la $[\text{Ca}^{+2}]$ libre en el RS en niveles suficientemente bajos (1 μM), como para asegurar el correcto re-ingreso de Ca^{+2} a través de SERCA2a y el control de la actividad de RyR2 por el Ca^{+2} luminal (Bers, 2001). En el corazón, CQS2 parece tener entonces dos funciones diferentes: almacenar Ca^{+2} dentro del RS y modular en forma activa el proceso de liberación del ión. Esta última función podría cumplirse a través del control de la P_o del RyR2, mediante interacciones proteína-proteína (en las cuales también están involucradas juntina y triadina) y que le servirían al canal como sensor de la $[\text{Ca}^{+2}]$ luminal.

Juntina es una proteína transmembrana de 26 kDa que posee una pequeña región del extremo amino terminal (N-terminal) en citosol en tanto el resto de la molécula se despliega hacia la cara luminal del RS, formando un complejo cuaternario con triadina, CQS2 y RyR2. Posee una región de alrededor de 165 aminoácidos denominada “*motivo KEKE*”, en la que se cree se produce la interacción con las proteínas triadina y CQS2 (Jones y col., 1995). El modelo aceptado para la regulación del RyR2 por proteínas intraluminales, propone que juntina se halla en contacto directo con RyR2 además de actuar ella misma como proteína de anclaje para

CQS2 (Zhang y col., 1997; Györke y col., 2004). La relevancia fisiológica de juntina en la regulación de la liberación de Ca^{+2} mediante su acción sobre RyR2 aún está en discusión, aunque pareciera ser esencial para mantener una función cardíaca adecuada, ya que la ablación de juntina induce arritmias severas (Yuan y col., 2007).

Triadina fue identificada por primera vez como una proteína integral de membrana de 95 kDa, presente en vesículas de RS de músculo esquelético (Caswell y col., 1991). Estructuralmente está compuesta de un segmento citosólico N-terminal corto, un dominio transmembrana simple y una región C-terminal intraluminal, cargada negativamente, que representa la mayor parte de la proteína. Se identificaron tres isoformas específicas de músculo cardíaco (35, 40 y 75 kDa), dentro de las que, triadina-1 (40 kDa), es la más abundante (Kobayashi y Jones, 1999). Estudios *in vitro* indican que el sitio de interacción de triadina con juntina, CQS2 y RyR2 reside en el extremo C-terminal. Es posible que triadina funcione como otra proteína de anclaje de CQS2, lo que contribuiría en forma indirecta con el proceso de liberación de Ca^{+2} a través del RyR2 (Zhang y col., 1997; Kobayashi y col., 2000). En conclusión, tanto CQS2 como triadina y juntina parecen ser indispensables para la regulación intraluminal de la actividad del canal de Ca^{+2} del RS cardíaco.

Las *proteínas de unión al Ca^{+2} ricas en histidina* son proteínas de alrededor de 170 kDa compuestas en un 31% por residuos ácidos y en un 8% por residuos básicos. HRC no poseen un dominio típico de unión al Ca^{+2} por lo que es probable que la región ácida de la proteína sea la encargada de llevar a cabo esta función. Triadina fue la primer proteína asociada a HRC identificada (Sacchetto y col., 2001) y su asociación parece modular negativamente la liberación de Ca^{+2} a través del RyR2 (Kim y col., 2003). Se ha demostrado además que cambios locales y rápidos en la $[\text{Ca}^{+2}]$ dentro del RS pueden determinar diferentes estados de

multimerización de HRC, lo que afectaría su interacción con otras proteínas intraluminales (Suk y col., 1999).

Bomba de Ca^{+2} ATP-dependiente del Retículo Sarcoplasmático y Fosfolamban

La $[\text{Ca}^{+2}]$ en el interior del RS es mil veces mayor a la $[\text{Ca}^{+2}]_c$. Este gradiente se mantiene por acción de la bomba de Ca^{+2} ATP-dependiente: SERCA. Kielley y Meyerhoff (1948) fueron los primeros en describir una proteína con actividad enzimática capaz de hidrolizar ATP (ATPasa) activada por Mg^{+2} presente en la fracción microsomal de muestras musculares. Ebashi (1961; Ebashi y Lipmann, 1962) y Hasselbach y Makinose (1961) demostraron luego que se trataba de una Ca^{+2} -ATPasa asociada a membrana, responsable de disminuir los niveles de Ca^{+2} citosólicos.

Figura 4. SERCA2a y PLN.

SERCA es una proteína transmembrana de alrededor de 110 kDa perteneciente a una familia altamente conservada. En su estructura pueden identificarse una amplia región citosólica que contiene un dominio de fosforilación y un dominio de unión a ATP, y una región de anclaje a membrana compuesta por 10 hélices transmembrana (Figura 4). Se cree que 4 de estas 10 hélices son las encargadas de formar el poro por donde va a circular el Ca^{+2} hacia el interior del RS (MacLennan y col., 1997).

Existen tres variantes genéticas de SERCA: 1, 2 y 3, las cuales a su vez generan diferentes isoformas por *splicing* alternativo. En el músculo cardíaco se expresa la isoforma 2 en su variante 2a (SERCA2a). Los niveles de expresión de SERCA2a se encuentran sujetos tanto a diferencias regionales como a modificaciones durante el desarrollo o el envejecimiento. La expresión de SERCA2a es dos veces mayor en aurícula respecto a ventrículo, diferencia que podría justificar, al menos en parte, la mayor velocidad de relajación auricular (Minajeva y col., 1997; Luss y col., 1999). Por otro lado, la expresión de SERCA2a aumenta durante el desarrollo (Luss y col., 1999; Chen y col., 2000). Este incremento se acompaña de un acortamiento en el tiempo de relajación ventricular cuando se comparan corazones adultos con neonatales (Gombosova y col., 1998). Así mismo, en modelos experimentales de senescencia, se hallaron disminuciones en el contenido y actividad de SERCA2a, asociado a un alargamiento en el tiempo de relajación y a un decremento en la función contráctil miocárdica (Cain y col., 1998). Los resultados antes descriptos sugieren que los niveles de SERCA2a son críticos para mantener una correcta función contráctil.

SERCA2a se encarga de almacenar Ca^{+2} dentro del RS cardíaco, bombeando dos iones Ca^{+2} por molécula de ATP hidrolizada, a través de un ciclo cinético de pasos múltiples. La función de SERCA2a puede ser modulada por diversos factores, entre los que se pueden mencionar la nitrosilación (Viner y col., 1999), la fosforilación (Xu y col., 1999) y la interacción con otras proteínas como el sustrato del receptor de insulina, S100A1, HRC y HAX-1 entre otras (Algenstaedt y col., 1997; Vandecaetsbeek y col., 2009). Sin embargo, el principal factor de modulación de la actividad de la bomba es su interacción con la fosfoproteína PLN (Tada y col., 1975), la cual, en su estado desfosforilado, inhibe a la SERCA2a. La fosforilación de PLN por quinasas específicas (véase más adelante) libera a la bomba de su inhibición. Esta pequeña proteína se presenta como monómero de 5 kDa (forma activa) o como homopentámero de 25

kDa (reserva de monómeros) (Wegener y Jones, 1984). PLN posee un dominio citoplasmático y un segmento transmembrana (Simmerman y Jones, 1998) y se expresa predominantemente en músculo cardíaco, localizándose junto con SERCA2a a lo largo del RS longitudinal (Jorgensen y Jones, 1987). Esta distribución espacial es de crucial importancia ya que determina la contribución de esta proteína al ciclo del Ca^{+2} . Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar cómo PLN, en su forma desfosforilada, ejerce su efecto inhibitorio sobre SERCA2a. Estudios realizados por Cantilina y colaboradores (1993) sugieren que PLN disminuye la afinidad de SERCA2a por el Ca^{+2} a través de la modificación de la cinética de activación de la bomba. Trabajos posteriores donde se estudiaron las interacciones físicas entre SERCA2a y PLN mediante ensayos de *cross-linking*, demostraron que los sitios de unión a PLN y al Ca^{+2} en la secuencia de la bomba son mutuamente excluyentes (Chen y col., 2003). Basados en estos resultados, postularon que PLN se asocia a SERCA2a e impide la unión del Ca^{+2} a la bomba y en consecuencia, su capacidad de transporte.

Como ya dijimos, el principal estímulo regulador de PLN es su fosforilación, ya que la disocia funcionalmente de SERCA2a permitiendo que ésta aumente su actividad (Kirchberger y col., 1974). Se ha propuesto un nuevo mecanismo de control de PLN: su nitrosilación (Froehlich y col., 2008). Esta modificación postraduccional le produciría un cambio conformacional que también disminuiría su efecto inhibitorio sobre SERCA2a.

Otra proteína que regula la actividad de SERCA2a es *sarcolipina* (SLN) (Wawrzynow y col., 1992). SLN es una proteína organizada en tres dominios: citoplasmático, transmembrana y luminal, cuyo patrón de distribución en la célula cardíaca es similar a SERCA2a y PLN (Babu y col., 2005). La relevancia fisiológica de SLN en el corazón ha sido determinada recientemente con la ayuda de dos modelos de ratones transgénicos (TG) desarrollados independientemente por los laboratorios de MacLennan y Periasamy (Asahi y col., 2004; Babu

y col., 2006). Los resultados obtenidos en estos estudios sugieren que SLN ejerce su efecto inhibitorio sobre la bomba a través de la estabilización del complejo SERCA2a-PLN y de la inhibición de la fosforilación de PLN.

IV - Fosforilación proteica como mecanismo regulador de la función contráctil

La fosforilación de proteínas es un proceso de modificación covalente y reversible, esencial para la mayoría de las funciones celulares. Se estima que 1/3 de las proteínas de la célula son fosforiladas (Depaoli-Roach y col., 1994). La fosforilación de proteínas puede provocar efectos a corto o largo plazo, como por ejemplo la modulación de la actividad de canales iónicos o la de factores de transcripción, respectivamente. La fosforilación puede alterar la función de las proteínas de todas las maneras posibles: aumentando o disminuyendo su actividad, marcando una proteína para su destrucción, permitiéndole moverse de un compartimiento subcelular a otro, o permitiendo que interaccione o se disocie de otra proteína. Es atractivo especular que la simplicidad, flexibilidad y reversibilidad de esta modificación postraducciona, junto con la disponibilidad de ATP como dador del grupo fosfato necesario para la reacción, son los motivos por los que este mecanismo fue seleccionado para regular tantos procesos biológicos. El estado de fosforilación de una proteína refleja el balance entre proteínas quinasas (PKs) y proteínas fosfatasas (PPs).

El genoma humano codifica para alrededor de 500 PKs, dentro de las cuales 2/3 pertenecen a la familia de quinasas que fosforilan residuos de serina y treonina (quinasas Ser/Thr) y el tercio restante a quinasas que actúan sobre residuos tirosina. Sin embargo sólo existen genes para 150 miembros de la familia de PPs, con menos de 40 que actúan sobre residuos Ser/Thr (Herzig y Neumann, 2000).

La función de la mayoría de las proteínas involucradas en el manejo del Ca^{+2} asociado a la función contráctil, puede ser modificada por fosforilación. Esta fosforilación ocurre fundamentalmente en residuos Ser/Thr, por lo cual continuaremos con la descripción de las PKs y PPs que actúan específicamente sobre estos sitios.

Proteínas Ser/Thr quinasas

Proteína quinasa dependiente de Ca^{+2} y calmodulina

La proteína quinasa dependiente de Ca^{+2} y CaM se expresa en forma ubicua y se activa cuando la $[\text{Ca}^{+2}]_c$ aumenta. CaMKII posee un peso molecular de alrededor de 50 kDa y contiene un dominio catalítico N-terminal altamente conservado, un dominio regulatorio y un dominio de asociación C-terminal, responsable de la oligomerización de la proteína en estructuras dodecaméricas (Kolodziej y col., 2000) o tetradecaméricas (Hoelz y col., 2003) que facilitan la concentración de dominios catalíticos. El dominio regulatorio contiene un dominio de unión a CaM y un dominio autoinhibitorio, el cual limita la actividad catalítica de la enzima. Cuando la CaM y un dominio autoinhibitorio, el cual limita la actividad catalítica de la enzima. Cuando la $[\text{Ca}^{+2}]_c$ aumenta en sístole, la CaM se asocia a cuatro iones Ca^{+2} (Maier y col., 2006) y el complejo así formado de CaCaM se asocia al dominio regulatorio de CaMKII, liberándola de su autoinhibición y dejándola en su modo activo. A $[\text{Ca}^{+2}]_c$ entre 0,5-1 μM se obtiene la máxima activación de la quinasa (Maier y Bers, 2007). El dominio autoinhibitorio posee un sitio de autofosforilación en el residuo Thr286 (Schworer y col., 1986) y sitios de oxidación, identificados recientemente: metionina 281 y metionina 282 (Met281/Met282) (Erickson y col., 2008). La fosforilación del sitio Thr286 o la oxidación de Met281 y Met282 previene la reasociación de los dominios regulatorio y catalítico, aún luego de la disociación de CaM, manteniendo la activación de la quinasa en forma independiente al Ca^{+2} y CaM (Hudmon y Schulman, 2002; Erickson y col., 2008). Por otro lado, existen sitios susceptibles a

fosforilación (Thr306) u oxidación (Met308) capaces de inhibir a CaMKII por impedir su unión al complejo CaCaM (Colbran, 1993; Erickson y col., 2008).

Existen cuatro isoformas diferentes de CaMKII codificadas por genes separados: α , β , γ y δ , siendo la isoforma δ la predominante en músculo cardíaco (Tobimatsu y Fujisawa, 1989). A su vez, existen variantes de *splicing* de la isoforma cardíaca que se localizan en diferentes regiones dentro del miocito (Edman y Schulman, 1994). Se ha sugerido que la forma δB modula la expresión de genes pro-hipertróficos y la señalización nuclear de Ca^{+2} (Ramirez y col., 1997; Bare y col., 2005) mientras que la forma δC está asociada a la regulación de proteínas implicadas en el AEC cardíaco (Maier y col., 2003). CaMKII δC fosforila a muchas de las proteínas involucradas en la homeostasis del Ca^{+2} y en la función contráctil (Hudmon y Schulman, 2002): LTCC, RyR2, PLN, SERCA2a, MBPc y Troponina I (TnI).

Por ser una fosfoproteína, la actividad de CaMKII depende de la actividad de PPs que, a través de la desfosforilación de la quinasa, regulan su acción. Se ha demostrado la existencia de cuatro especies de PPs capaces de regular la actividad de CaMKII: PP1, PP2A, PP2C y una nueva familia de PPs específicas de CaMKII (Ishida y col., 2003).

Proteína quinasa dependiente de AMPc

La proteína quinasa dependiente de AMPc fue una de las primeras proteínas Ser/Thr quinasas en ser descubierta (Walsh y col., 1968). Esta proteína está compuesta por cuatro subunidades: dos catalíticas (C) y dos regulatorias (R). El sitio activo de la subunidad C se asocia reversiblemente con el dominio inhibitorio de la subunidad R. La asociación cooperativa de moléculas de AMPc a los cuatro sitios de unión presentes en la subunidad R causa la disociación de la subunidad C y la consecuente activación de la quinasa (Taylor y col., 1990). Existen dos clases de PKA: PKA I y PKA II, debido a diferencias en la subunidad R (RI y

RII). Las isoformas R se expresan diferencialmente en muchos tejidos (Hofmann y col., 1977) y su distribución subcelular parece estar finamente modulada por proteínas de anclaje específicas denominadas AKAP (Scott y McCartney, 1994), las cuales proveen un mecanismo de control espacial y temporal de los eventos de señalización mediados por el AMPc (Wong y Scott, 2004).

PKA puede fosforilar a distintos sustratos, entre los que se incluyen LTCC, RyR2, PLN, MBPc y TnI, por lo cual también cumple una función crítica en la regulación de la homeostasis del Ca^{+2} y la contractilidad.

Proteína quinasa dependiente de diacilglicerol y/o Ca^{+2}

La proteína dependiente de diacilglicerol y/o Ca^{+2} o proteína quinasa C (PKC) forma parte de una superfamilia de enzimas activadas por lípidos que resultan de la hidrólisis de fosfoinosítidos de membrana. Las PKCs comparten una región regulatoria N-terminal que contiene una secuencia de direccionamiento a membrana y responde a cofactores lipídicos, y un dominio catalítico C-terminal que une ATP y sustratos (Steinberg, 2008).

La hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP₂) por la fosfolipasa C genera inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). El IP₃ moviliza Ca^{+2} de depósitos intracelulares. El DAG se asocia al sitio regulatorio de PKC e induce un cambio conformacional que lleva a la remoción del pseudosustrato autoinhibitorio del sitio catalítico (activación) y expone simultáneamente el sitio de anclaje a membrana (translocación) (Nishizuka, 1992). Una vez activadas, las PKCs se unen a proteínas de anclaje específicas para diferentes isoformas de PKC (RACKs) que las localizan en la cercanía de sus sustratos, confiriendo de esta manera especificidad funcional para cada isoforma (Mackay y Mochly-Rosen, 2001). Sin embargo, la translocación parece no ser el único mecanismo de activación de las PKCs. Se ha demostrado

que la actividad de PKC puede estar modificada por fosforilación, proteólisis parcial u oxidación (Steinberg, 2008).

Existen al menos diez isoenzimas de PKC, las cuales se clasifican en tres sub-familias basadas en homologías en el dominio regulatorio: **PKCs clásicas** (α , β I, β II, y γ) cuya activación depende tanto del DAG como del Ca^{+2} ; **PKCs nuevas** (δ , ϵ , θ , y η) que requieren DAG pero no Ca^{+2} y las **PKCs atípicas** (ζ y λ) que no son estimuladas por DAG ni por Ca^{+2} pero sí por otros segundo mensajeros derivados de lípidos, como fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) y ceramidas.

El contenido relativo de cada isoenzima en corazón ha sido materia de discusión, ya que depende de la especie y del estadio de desarrollo analizado. En uno de los primeros estudios realizados al respecto se postuló que era PKC ϵ la isoenzima mayoritaria en corazón (Bogoyevitch y col., 1993). Sin embargo, años más tarde se encontraron otras isoenzimas, principalmente PKC α , PKC δ y PKC ζ (Mackay y Mochly-Rosen, 2001).

Las PKCs pueden actuar sobre varios sustratos intracelulares que incluyen componentes del sistema miofibrilar: MBPc, TnI y reguladores de la homeostasis del Ca^{+2} : LTCC (Venema y Kuo, 1993; Kamp y Hell, 2000; Xiao y col., 2007).

Proteínas serina/treonina fosfatasas

Originariamente las Ser/Thr fosfatasas se clasificaron en fosfatasa tipo 1 (PP1) y fosfatasa tipo 2 (PP2) de acuerdo a su capacidad para ser inhibidas por las pequeñas proteínas inhibidor-1 (Inh-1) e inhibidor-2 (Inh-2), y su preferencia por desfosforilar a las subunidades α y β de la fosforilasa quinasa. Las PP2 fueron a su vez subdivididas en PP2A, PP2B y PP2C, de acuerdo a sus requerimientos de iones bivalentes. Posteriormente se clonaron nuevas fosfatasas: PP4, PP5, PP6 y PP7 (Depaoli-Roach y col., 1994). Todas estas PPs están codificadas por dos familias de genes: PPP y PPM.

Proteínas fosfatasas tipo 1

Cerca del 60% de la actividad fosfatasa en tejido de mamíferos es debida a PP1. Estudios a nivel celular demuestran que existen tres isoformas de la subunidad catalítica de PP1: PP1 α , PP1 β y PP1 γ .

La subunidad catalítica de PP1 raramente se encuentra libre en citosol debido a que, o está unida a inhibidores endógenos, como el Inh-1 e Inh-2, o anclada a sus subunidades regulatorias (Cohen, 2002). La actividad del Inh-1 está regulada por señalización intracelular y sólo cuando el Inh-1 se fosforila en el sitio Thr35, mediado por PKA, resulta ser inhibitorio de PP1 (Aitken y col., 1982). Además, el Inh-1 puede ser fosforilado *in vivo* en Ser67 (Aitken y col, 1982; Huang y Paudel, 2000) y en este caso, la fosforilación de este sitio ocurre por PKC α e impide la asociación entre el inhibidor y PP1, permitiendo así que la fosfatasa mantenga su estado activo. La inactivación de Inh-1 ocurre por acción de PP2A y PP2B, las cuales remueven el grupo fosfato del sitio Thr35 (El-Armouche y col., 2006). A su vez, PP2A es activada por CaMKII (Zhang y col., 2002), por lo que, aumentos en el Ca⁺² intracelular, contribuyen a

activar a PP1 por eliminar la inhibición ejercida por Inh-1. Así mismo, Inh-2 también es capaz de formar complejo con PP1 e inhibirlo (Kirchhefer y col., 2005).

PP1 tiene un papel crítico en el control de la contractilidad cardíaca, siendo la fosfatasa más importante involucrada en la desfosforilación de las principales proteínas implicadas en el manejo del Ca^{+2} intracelular: LTCC, RyR2 y PLN (Steenart y col., 1992; duBell y col., 1996; Huke y Bers, 2008).

Proteínas fosfatasas tipo 2

La PP2A es una proteína heterotrimérica compuesta por las subunidades: A, B y C. La actividad catalítica de esta fosfatasa reside en la subunidad C que se une de manera estable a la subunidad A. La subunidad B se une a la subunidad A y determina la especificidad de sustrato del complejo (Ruediger y col., 1994). La diversidad de funciones de PP2A resulta de, al menos, 15 subunidades B regulatorias diferentes (Wera y Hemmings, 1995). PP2A interviene en la regulación de la actividad contráctil cardíaca a través de la desfosforilación de proteínas miofibrilares como TnI y MBPc y del RyR2 (Heijman y col., 2013).

La PP2B o calcineurina (Cn) es una proteína heterodimérica que requiere Ca^{+2} para su actividad. Esta proteína está compuesta por dos subunidades: CnA y CnB. CnA posee un dominio catalítico N-terminal (Gupta y col., 1985) y un dominio regulatorio que contiene una secuencia de unión a CaM, un sitio de unión a la CnB y una región autoinhibitoria. Cuando aumenta la $[\text{Ca}^{+2}]_c$, el complejo CaCaM se une a la enzima liberando el sitio catalítico de la fosfatasa (Klee, 1991). PP2B está asociada a la hipertrofia e insuficiencia cardíaca (Molkentin y col., 1998; Wilkins y col., 2004) por su acción sobre factores de transcripción tales como el factor de transcripción nuclear de linfocitos-T activados (NFAT). Sin embargo, la

participación de esta PP en la regulación de la función de proteínas involucradas en el manejo del Ca^{+2} es poco relevante.

La PP2C es una proteína monomérica que posee un dominio catalítico N-terminal, común a todos los miembros de la familia PP2C, capaz de coordinarse con dos iones Mg^{+2} y un dominio C-terminal, exclusivo de las PP2Cs de mamíferos, cuya función podría estar relacionada con la especificidad de sustrato (Barford y col., 1998). Al igual que PP2B, es una fosfatasa con poca intervención en el control de la actividad de proteínas del AEC.

V- Efecto de la fosforilación sobre las proteínas del RS involucradas en el manejo de Ca^{+2} asociado a la función contráctil

La capacidad de transporte de Ca^{+2} de las proteínas del RS está críticamente regulada por mecanismos de fosforilación/desfosforilación, que pasaremos a describir.

RyR2

Como ya vimos, varias PKs y PPs colocalizan con el RyR2. CaMKII puede fosforilar directamente a RyR2 en varios residuos, siendo Ser2815 en rata y conejo o Ser2814 en ratón y humano, el sitio determinante en la regulación de la función del canal por esta quinasa (Witcher y col., 1991; Wehrens y col., 2004) lo que genera un aumento en la liberación de Ca^{+2} desde el RS (Li y col., 1997; Ferrero y col., 2007). Por otro lado, se ha demostrado que durante la insuficiencia cardíaca existe un aumento en la liberación espontánea de Ca^{+2} en diástole, dependiente de CaMKII, que contribuiría al vaciamiento del RS característico de esta enfermedad (Maier y col., 2003; Guo y col., 2006). En conclusión, CaMKII puede regular la actividad de RyR2 tanto en sístole, donde posee un efecto benéfico sobre el AEC por estimular la liberación de Ca^{+2} desde el RS (Ferrero y col., 2007), como en diástole, donde tiene efectos negativos por incrementar la pérdida de Ca^{+2} del RS y contribuir de esta manera a la disminución de la contractilidad y a la generación de eventos arrítmicos (Ai y col., 2005; Maier y Bers, 2007; Curran y col., 2007). También se ha planteado la posibilidad que CaMKII pueda regular a RyR2 en forma indirecta. Por ejemplo, Anthony y colaboradores (2007), mostraron en estudios *in vitro* que CaMKII puede fosforilar a sorcina, revirtiendo el efecto inhibitorio que ésta tiene sobre el canal.

PKA se asocia al RyR2 a través de la AKAP selectiva de músculo (mAKAP) y regula su actividad. Esta enzima fosforila a RyR2 en el sitio Ser2808. Valdivia y colaboradores (1995) encontraron que PKA incrementaba la P_o del canal en experimentos donde la $[\text{Ca}^{+2}]$ aumentaba

rápidamente, pero no afectaba en forma considerable el estado basal del canal cuando la $[Ca^{+2}]$ se mantenía a niveles bajos (0,1 μM) en concordancia con experimentos posteriores de Li y colaboradores (2002). Por el contrario, el grupo de Marks (Marx y col., 2000; Wehrens y col., 2006) demostró que la fosforilación de RyR2 en el sitio Ser2808 incrementa la P_o en estado basal del canal, por producir la disociación de calstabin-2 de su sitio en RyR2, ocasionando una pérdida continua de Ca^{+2} durante la diástole. Sin embargo, estos datos son algo controvertidos ya que otros grupos encontraron que calstabin-2 se mantenía asociada a RyR2 aún luego de la fosforilación dependiente de PKA (Xiao y col., 2004). Por otro lado, Xiao y colaboradores describieron otro sitio de fosforilación específico para la PKA en el RyR2: Ser2030 (Xiao y col., 2005). Se sugiere que esta fosforilación es la responsable del aumento en la sensibilidad del canal al Ca^{+2} luminal (Xiao y col., 2005; 2007). Además, parece estar asociada al efecto inotrópico positivo del isoproterenol. Sin embargo, su relevancia funcional aún está en discusión (Huke y Bers, 2008; Wehrens y col., 2006).

PP1 y PP2A se asocian indirectamente a RyR2 a través de moléculas accesorias tales como espinofilina y PR130, respectivamente. De esta forma se produce la regulación del canal por desfosforilación, lo que reduce la actividad liberadora de Ca^{+2} del mismo (duBell y col., 1996). Se cree que PP1 desfosforila los sitios Ser2808/Ser2814/5 y PP2A sólo a Ser2814/5 (Huke y Bers, 2008).

SERCA2a y PLN

Además de estar presente en la cisterna del RS, en estrecha proximidad con RyR2 y LTCC, CaMKII se encuentra en el RS longitudinal, donde regula la actividad de SERCA2a ya sea en forma directa o indirecta (fosforilación de PLN). Algunos investigadores han propuesto que CaMKII fosforila directamente a la bomba en el sitio Ser38, lo que genera un aumento en la velocidad de transporte de Ca^{+2} (Toyofuku y col., 1994; Narayanan y Xu, 1997; Xu y col.,

1999). Sin embargo, esta fosforilación ha generado controversia entre los investigadores, ya que existen varios trabajos publicados en contra de esta idea (Odermatt y col., 1996; Reddy y col., 1996; Rodriguez y col., 2004).

PLN puede ser fosforilada en tres sitios: Thr17 por CaMKII, Ser16 por PKA y Ser10 por PKC (Simmerman y col., 1986; Drago y Colyer, 1994). Evidencias experimentales indican sin embargo, que la fosforilación de PLN dependiente de PKC no es fisiológicamente relevante (Edes y Kranias, 1990). La fosforilación en Thr17 y Ser16 genera una disociación funcional entre SERCA2a y PLN, permitiendo una mayor actividad de la bomba e incrementando el secuestro y en consecuencia el contenido de Ca^{+2} del RS y su liberación en los siguientes latidos (Figura 5). Estas modificaciones del ciclado de Ca^{+2} en el RS se traducen mecánicamente en aumentos de la relajación y la contractilidad miocárdicas.

La actividad de PLN es regulada también por desfosforilación inducida principalmente por PP1 y en menor medida por PP2A, lo que contribuye a reducir el contenido de Ca^{+2} del RS por disminuir el transporte del ión mediado por SERCA2a (MacDougall y col., 1991).

Figura 5. Esquema representativo de los efectos de la fosforilación de PLN sobre la mecánica contráctil.

VI- Estimulación β -adrenérgica: su señalización

El sistema nervioso simpático, un regulador fundamental de la función cardíaca, es el mecanismo más efectivo para incrementar en forma aguda el rendimiento de la bomba cardíaca. La unión de sus neurotransmisores, noradrenalina y adrenalina, a receptores β -adrenérgicos (β -AR) acoplados a proteína G, inicia una cascada de señalización que, a través de la fosforilación de proteínas, produce un aumento en la frecuencia, contractilidad y relajación cardíacas (efecto cronotrópico, inotrópico y lusitrópico positivos, respectivamente). Si bien en el tejido cardíaco se expresan las tres isoformas β -AR, β_1 , β_2 y β_3 , β_1 representa el 75-80 % (Brodde, 1993). Por lo tanto, la mayor parte de los efectos β -adrenérgicos descriptos en corazón están mediados por los receptores β_1 -adrenérgicos (β_1 -AR).

El β_1 -AR es una proteína integral con siete regiones transmembrana. La unión de su ligando promueve un cambio conformacional del receptor que afecta su interacción con la segunda proteína en la vía de transducción de señales, la proteína de unión a guanosín trifosfato (GTP) o proteína G estimuladora (Gs). Ésta es una proteína heterotrimérica conformada por las subunidades α , β y γ , que se halla en la cara citosólica de la membrana plasmática. Cuando el sitio de unión a nucleótido de Gs (en la subunidad α) está ocupado por guanosín difosfato (GDP), la proteína está inactiva. Al activarse por su ligando, el β_1 -AR cataliza el desplazamiento del GDP unido a Gs por GTP, convirtiéndola en su forma activa. Cuando esto sucede las subunidades β y γ se disocian de la subunidad α , y ésta, con su GTP unido, se desplaza desde el receptor hacia una proteína cercana anclada a membrana plasmática, la Adenilato Ciclasa (AC). Esta enzima cataliza la síntesis de AMPc a partir de ATP. La consecuencia final de la activación del β_1 -AR es entonces, el aumento citosólico del nucleótido AMPc, segundo mensajero en muchas vías de señalización intracelular (Figura 6).

Una vez ocupado por el agonista, el β -AR puede desensibilizarse (o desacoplarse) en cuestión de segundos o minutos mediante su fosforilación. Esta fosforilación puede ser realizada tanto por una quinasa específica de receptores acoplados a proteína G (GRKs) o por la PKA y promueve la unión del β -AR a otra proteína denominada β -arrestina, previniéndose de esta manera la interacción con Gs (Lefkowitz, 1993). La fijación de β -arrestina dirige la internalización de los receptores desensibilizados que serán degradados, reciclados (retornando al sarcolema) y/o generarán nuevas señales intracelulares (Ferguson y col., 1996; Shenoy y Lefkowitz, 2003).

Vía clásica: activación de PKA

La activación de los β_1 -AR estimula a la AC, lo que genera, como ya se mencionó, un aumento en la concentración citosólica de AMPc. En la vía clásica de estimulación β -adrenérgica (Figura 6) esta molécula actúa activando a la PKA, que fosforila a un amplio número de proteínas involucradas en el AEC. A su vez, PKA inhibe a PP1 a través de la fosforilación y consecuente activación del Inh-1 (Aitken y col., 1982). La fosforilación de Inh-1 podría entonces potenciar los efectos de PKA sobre sus proteínas sustrato.

Figura 6. Estimulación β-adrenérgica: vía clásica.

En presencia de agonistas β-adrenérgicos, la fosforilación por PKA del LTCC aumenta la entrada de Ca^{+2} a la célula, lo que provoca una mayor liberación de Ca^{+2} del RS. A su vez el RS retoma y acumula una mayor fracción de Ca^{+2} debido a la fosforilación de PLN. Este aumento del contenido de Ca^{+2} del RS también contribuye a la mayor liberación de Ca^{+2} en un próximo latido. Como consecuencia, la estimulación β-adrenérgica genera transitorios de Ca^{+2} más amplios y más rápidos. Por otro lado la activación β-adrenérgica induce la fosforilación de TnI, determinando una disminución en la sensibilidad al Ca^{+2} de los miofilamentos (Okazaki y

col., 1990); no obstante, el dramático aumento en la amplitud del transitorio compensa ampliamente este fenómeno, por lo que el resultado final sigue siendo un aumento sustancial en la contractilidad miocárdica. La menor sensibilidad al Ca^{+2} de los miofilamentos también contribuiría con el aumento en la velocidad de relajación. Sin embargo, datos aportados por McIvor y colaboradores (1988) y Endoh y Blinks (1988) sugieren que el efecto lusitrópico positivo inducido por agonistas β -adrenérgicos es atribuible principalmente a la estimulación de SERCA2a a través de la fosforilación de PLN, más que al efecto sobre la sensibilidad al Ca^{+2} de los miofilamentos (Kentish y col., 2001; Peña y Wolska, 2004).

Durante mucho tiempo se consideró que los efectos observados tras la estimulación β_1 -adrenérgica se debían exclusivamente a la activación de PKA mediada por AMPc. Sin embargo a partir de la década del '80, varios laboratorios demostraron la participación de CaMKII en esta vía de señalización, siendo también las proteínas involucradas en el manejo del Ca^{+2} , sustrato de esta quinasa (Figura 6) (Lindemann y Watanabe, 1985; Mundiña y col., 1996; Baltas y col., 1997; Kuschel y col., 1999; Said y col., 2002; Ferrero y col., 2007; Curran y col., 2007; Wang y col., 2004). Entonces, los cambios funcionales del LTCC, RyR2 y SERCA2a-PLN durante la estimulación β_1 -adrenérgica serían consecuencia de su fosforilación por PKA y/o CaMKII. Estudios realizados por Mattiazzi y colaboradores demostraron que durante la estimulación β_1 -adrenérgica, el efecto relajante de altas concentraciones del agonista β isoproterenol requiere de la fosforilación dual de PLN por PKA y CaMKII (Mundiña y col., 1996; Said y col., 2002), mientras que el aumento de la actividad del RyR2 responde sólo a la fosforilación específica por CaMKII (Ferrero y col., 2007).

Si bien los mecanismos por los cuales la estimulación de los β_1 -AR conduce a la activación de PKA están bien definidos, aquellos que activan a CaMKII son aún motivo de estudio y

discusión. Se podría considerar que el aumento de la $[Ca^{+2}]_c$ que ocurre durante la estimulación de los β -AR es estímulo suficiente para activar la CaMKII. Sin embargo, se demostró que maniobras no asociadas a aumentos del AMPc, que provocaron aumentos de la $[Ca^{+2}]_c$ de magnitud similar a la estimulación β_1 -adrenérgica (aumento del Ca^{+2} extracelular: $[Ca^{+2}]_o$, agonistas del LTCC, ionóforo de Ca^{+2} , tetanización) no produjeron activación de CaMKII, medida indirectamente a través de la fosforilación de PLN en su sitio Thr17 (Vittone y col., 1990; Napolitano y col., 1991; 1992). La clave para entender esta aparente discrepancia fue dada por experimentos realizados por Mundiña y colaboradores (1996) en donde se estudió la cascada de activación de CaMKII/Thr17-PLN en presencia del inhibidor de PP1: ácido ocadaico. Bajo estas condiciones, el aumento en la contractilidad producido por incrementos en la $[Ca^{+2}]_o$ se asoció a una potente fosforilación en el sitio Thr17 y a un efecto relajante. De estos experimentos se desprende que la fosforilación de PLN por CaMKII requiere de la simultánea activación de la quinasa e inhibición de PP1 como ocurre cuando aumenta el AMPc por estimulación β -adrenérgica.

La relación entre PKA y CaMKII en respuesta a la estimulación β -adrenérgica no significa necesariamente que sus proteínas sustrato sean obligatoriamente fosforiladas por las dos quinasas. La compartimentalización de las señales que llevan a la activación de las quinasas (Ca^{+2} y AMPc) así como su ubicación y/o relación con PPs y/o fosfodiesterasas que hidrolizan AMPc (PDE) en macrocomplejos, hacen que los sustratos puedan aparecer fosforilados por una u otra quinasa, o por ambas, dependiendo de la situación.

Vía independiente de PKA: activación de Epac

A fines de la década del '90, se demostró que PKA no era el único efector activado directamente por AMPc. Una proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina, a la que se denominó Epac, podía ser directamente activada por este segundo mensajero (de Rooij y col., 1998; Kawasaki y col., 1998). Las proteínas Epac actúan como factores de intercambio de nucleótidos de guanina específicos para Rap1 y Rap2, proteínas pertenecientes a la familia de Ras-GTPasas. Tras la unión del AMPc, Epac activa a Rap a través de la remoción e intercambio del GDP por GTP.

Debido a nuestro interés en Epac, en las siguientes secciones vamos a describir los aspectos más relevantes asociados a estas proteínas y su participación en la función cardíaca.

Mecanismos de activación de Epac

Existen dos isoformas de Epac codificadas por genes diferentes: Epac1 y Epac2 (de Rooij y col., 1998; Kawasaki y col., 1998). Una variante de *splicing* de Epac2 denominada Epac2B (más corta desde el extremo N-terminal) se ha identificado en glándula adrenal sugiriendo que eventos de *splicing* alternativo contribuyen a la complejidad funcional de las proteínas Epac (Niimura y col., 2009). A partir de este descubrimiento, la isoforma más larga de Epac2 fue renombrada Epac2A.

Epac1 y Epac2 son proteínas multidominio que poseen alta homología en su secuencia. Ambas isoformas contienen una región regulatoria N-terminal y una región catalítica C-terminal (Figura 7A). La región regulatoria contiene un dominio DEP (del inglés *Disheveled/Egl-10/pleckstrin*), responsable de la asociación de Epac a membrana (Ponsioen y col., 2009), y un dominio de unión al AMPc (CNB) homólogo al que presenta la subunidad regulatoria de PKA. Epac2, sólo en su variante Epac2A, contiene un dominio de unión adicional al nucleótido cíclico, con una afinidad por el AMPc 20 veces menor, cuya función biológica parece estar

asociada a la localización subcelular de la proteína (CNB-A). La variante Epac2B carece de este dominio, pues lo pierde durante el *splicing* (Breckler y col., 2011). En todas las isoformas, la región catalítica C-terminal posee un dominio de homología CDC25 responsable de la actividad de intercambio de nucleótidos, un motivo de intercambio RAS (REM) que estabiliza al dominio de homología CDC25 y un dominio de asociación a RAS (RA) (Gloerich y Bos, 2010), que se ha descrito implicado en la translocación de Epac2 a membrana plasmática (Li y col., 2006; Liu y col., 2008). En ausencia de AMPc, la región regulatoria de Epac interactúa directamente con la región catalítica, inhibiendo de esta manera la capacidad de intercambio de nucleótidos. La unión del AMPc induce un gran cambio conformacional dentro de la proteína y libera el efecto autoinhibitorio de la región N-terminal, permitiendo la activación de Rap (Gloerich y Bos, 2010) (Figura 7B).

Figura 7. A) Estructura de dominios múltiples de Epac. Señalización de los dominios regulatorio y catalítico de Epac1 y Epac2A. B) Activación de Epac por AMPc y su interacción con la proteína Rap1.

Las proteínas Epac responden a concentraciones de AMPc fisiológicamente relevantes, similares a los que activan a PKA (Dao y col., 2006). Como ya mencionamos, los niveles de AMPc resultan de la actividad de las AC ancladas a membrana o solubles, pero también dependen de la actividad de enzimas que lo hidrolizan, las PDEs.

Experimentalmente, activadores de AC como la forskolina, inhibidores de PDEs como el IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) o análogos del AMPc, insensibles a PDEs, como el dibutilil-AMPc, se utilizan como herramientas farmacológicas para aumentar la concentración de AMPc. El descubrimiento de Epac generó la necesidad de desarrollar un agonista capaz de discriminar entre las distintas proteínas activadas por AMPc. En este sentido, se encontró que análogos del AMPc que tienen una modificación en la posición 6 de la adenina, como el N⁶-benzoil AMPc (6-Bnz-AMPc), son activadores selectivos de la PKA. Por otro lado, análogos del AMPc en los que se reemplaza el grupo 2'OH del anillo de ribosa del AMPc por 2'O-Me, activan selectivamente a las proteínas Epac. Uno de ellos, el 8-(4-chloro-phenylthio)-2'-O-metiladenosina-3',5'-AMPc (8-CPT), exhibe alta afinidad por Epac (K_d 2,2 μ M), actuando por igual sobre Epac1 y Epac2, y muy baja afinidad por PKA (K_d 200-300 μ M) (Enserink y col., 2002). Como veremos más adelante, el 8-CPT fue y es crucial en los estudios de la participación de Epac1 y Epac2 en respuestas celulares mediadas por AMPc. La utilización experimental de inhibidores de estas proteínas no es aún posible ya que, o bien no están comercialmente disponibles o su especificidad es aún muy cuestionada (Courilleau y col., 2012; Courilleau y col., 2013; Rehmann, 2013; Chen y col., 2014).

Expresión y relevancia relativa de cada isoforma

Epac1 y Epac2 poseen diferentes patrones de expresión en corazón, cerebro, riñón y pulmón dependiendo del estadio en el que se encuentre el animal (fetal, neonatal o adultez) (Ulucan y col., 2007). Se ha sugerido que el nivel de expresión de Epac1 en miocitos cardíacos es

mayoritario respecto a Epac2 durante el período neonatal (de Rooij y col., 1998; Kawasaki y col., 1998; Ulucan y col., 2007), mientras que la relación en el ARNm de Epac1/Epac2 disminuye en animal adulto, sugiriendo que los efectos funcionales de Epac2 cobran relevancia con la edad (Pereira y col., 2013).

A nivel subcelular, Epac1 se localiza en membrana plasmática, citosol, región perinuclear, membrana nuclear y mitocondria; por su parte, Epac2 se localiza en membrana plasmática, fracciones citosólicas y citoesqueleto (Grandoch y col., 2010). Su redistribución subcelular parece estar finamente regulada (Qiao y col., 2002; DiPilato y col., 2004), mecanismo que determinaría la participación de Epac en diversas respuestas celulares. Al respecto, se encontró un aumento de la expresión de Epac1 en corazones de ratas hipertrofiados por sobrecarga de presión y su silenciamiento en miocitos neonatales de la misma especie, redujo la hipertrofia causada por estimulación β -adrenérgica (Métrich y col., 2008). Sin embargo, se demostró que en la hipertrofia de miocitos neonatales inducida por citoquinas, Epac1 participa de manera inhibitoria (McConnachie y col., 2006), formando parte de un complejo multiproteico agrupado en torno a la proteína de anclaje mAKAP en la membrana nuclear que permite la interrelación entre componentes de la cascada del AMPc: PKA, PDE4D3 y Epac1 y elementos de la cascada de las quinasas activadas por mitógeno (MEK5 y ERK5) (Dodge-Kafka y col., 2005). Estudios recientes en ratones TG carentes de Epac1 y Epac2 generaron aún más contradicciones. Mientras que Pereira y colaboradores (2013) mostraron que la activación de Epac2 y no de Epac1, era la señal involucrada en el desarrollo de la cardiomiopatía y arritmias inducidas por estimulación β -adrenérgica, Okumura y colaboradores (2014) encontraron que Epac1 y no Epac2, desempeñaba este rol. Por lo tanto, no existe consenso aún respecto a la función de Epac y la importancia de sus isoformas en el músculo cardíaco.

Vías de señalización de Epac en músculo cardíaco

Estudios realizados en miocitos aislados demuestran que Epac puede incrementar la actividad de CaMKII en forma independiente de PKA, seguido de un aumento en el estado de fosforilación de PLN y RyR2 en sus sitios Thr17 y Ser2814/5, respectivamente (Pereira y col., 2007; Oestreich y col., 2007, 2009; Métrich y col., 2008) (Figura 8). Se ha demostrado además que el activador selectivo de Epac, 8-CPT, propicia la fosforilación por CaMKII de las proteínas miofibrilares MBPc y TnI (Cazorla y col., 2009). Pero la vía de señalización por la cual Epac activa a CaMKII no ha sido completamente identificada aún. Se ha publicado que la estimulación de Epac activa a la proteína Rap GTPasa, que induce la activación de la isoforma ϵ de la proteína lipasa C (PLC ϵ) (Schmidt y col., 2001). Oestreich y colaboradores (2007; 2009) han propuesto que es la PKC ϵ , que se activa como consecuencia del accionar de la PLC ϵ , la enzima que induce la activación de CaMKII. Por otra parte, Pereira y colaboradores (2012) han sugerido que es el IP3, producto de la reacción de la PLC, que actuando a través de sus receptores provee el Ca^{+2} necesario para la activación de la quinasa. Por lo tanto si bien queda claro que CaMKII es una señal río debajo de la activación de PLC ϵ , resta por definir aún si es PKC o IP3 la molécula involucrada en la activación de CaMKII o si ambas pueden intervenir dependiendo del compartimiento subcelular sobre el que Epac esté actuando (Ruiz-Hurtado y col., 2013).

Figura 8. Posible relación de Epac en la respuesta β-adrenérgica.

Efectos de Epac sobre el manejo del Ca^{+2} intracelular y la contractilidad

Los primeros trabajos sobre efectos de Epac en el corazón se remontan a menos de 10 años atrás y son muchos los interrogantes que persisten respecto a su función. Se ha involucrado a Epac en la regulación del manejo del Ca^{+2} citosólico, la sensibilidad al Ca^{+2} de las proteínas contráctiles, la contractilidad, la formación de uniones Gap y la generación de arritmias (Somekawa y col., 2005; Pereira y col., 2007; Oestreich y col., 2007; 2009; Métrich y col., 2008; Hothi y col., 2008; Cazorla y col., 2009). También se la ha involucrado en la regulación del Ca^{+2} nuclear y en la activación de factores de transcripción dependientes de Ca^{+2} implicados en la expresión de genes pro-hipertróficos, participando así del proceso

denominado acoplamiento excitación-transcripción (AET) (Métrich y col., 2010; Pereira y col., 2012). Estos mecanismos permiten explicar el rol de Epac en la hipertrofia y remodelamiento (Morel y col., 2005; Métrich y col., 2008; 2009).

El papel que desempeña Epac en la regulación de la homeostasis del Ca^{+2} intracelular y su relación con la función contráctil es aún tema de discusión. Por un lado se ha demostrado que en miocitos aislados de rata, la estimulación aguda de Epac por 8-CPT induce una disminución en la amplitud de los transitorios de Ca^{+2} (Pereira y col., 2007; Cazorla y col., 2009), asociada con aumentos o no cambio en el acortamiento celular, lo cual sugiere una alteración en la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{+2} . La disminución en la amplitud del transitorio se acompañó de un descenso en el contenido de Ca^{+2} del RS, que podría ser consecuencia del aumento de la liberación espontánea de Ca^{+2} provocado por la fosforilación de RyR2 dependiente de CaMKII (Pereira y col., 2007). Por el contrario, estudios recientes llevados a cabo en miocitos de esta misma especie, demostraron un incremento del transitorio de Ca^{+2} y un marcado efecto inotrópico positivo, asociados con un aumento de la carga del RS y de la corriente de Ca^{+2} a través del LTCC, en respuesta a la activación sostenida de Epac (Ruiz-Hurtado y col., 2012). Estos autores además sugirieron que tanto el aumento de la entrada de Ca^{+2} como de la carga del RS, podrían participar en la generación de eventos proarritmogénicos. Del mismo modo, Oestreich y colaboradores observaron incrementos en la amplitud del transitorio de Ca^{+2} y en la fosforilación por CaMKII de RyR2 y PLN, pero utilizando en este caso miocitos ventriculares de ratón estimulados en forma aguda por el activador específico de Epac (Oestreich y col., 2007; 2009). Finalmente Hothi y colaboradores (2008), trabajando en miocitos murinos, no encontraron modificaciones en la amplitud del transitorio de Ca^{+2} , pero atribuyeron a la activación aguda de Epac la aparición de efectos arritmogénicos, al detectar transitorios de Ca^{+2} espontáneos independientes del estímulo eléctrico.

Una posible explicación a estas contradicciones encontradas respecto al rol de Epac en la regulación de la homeostasis del Ca^{+2} intracelular es que existan diferencias en las condiciones experimentales usadas: modelo animal empleado (rata vs ratón), distinto tiempo de exposición al activador de Epac y/o diferencias en la $[\text{Ca}^{+2}]_o$ a la que el miocito cardíaco fue expuesto.

HIPOTESIS EXPERIMENTAL

De acuerdo con el estado actual del tema se desprende que son muchos los interrogantes respecto a las proteínas Epac en el corazón. El surgimiento de estas proteínas como un mecanismo alternativo de especificidad en la cascada del AMPc, nos obliga a reconsiderar las vías de señalización de este importantísimo segundo mensajero y el impacto de sus efectores en la regulación de la función cardíaca. Todavía se discute qué isoforma de Epac es funcionalmente relevante en miocardio, su localización subcelular, la posibilidad de su translocación a membranas en respuesta al estímulo y las vías de señalización involucradas. Más aún, siguen siendo sumamente dispares los resultados respecto a los efectos de Epac sobre el manejo del Ca^{+2} intracelular y la contractilidad miocárdica. Si bien son muchos los interrogantes, este Trabajo de Tesis se propuso fundamentalmente discernir y entender los motivos de las contradicciones observadas con respecto a la activación de Epac y su efecto sobre el manejo del Ca^{+2} y la contractilidad miocárdica, poniendo énfasis en la participación de las fosforilaciones dependientes de CaMKII de las proteínas del RS, RyR2 y PLN.

Nuestra hipótesis es que dentro de las diferencias experimentales observadas, la oferta de Ca^{+2} extracelular es la que condiciona los efectos agudos de Epac sobre la homeostasis del Ca^{+2} y la contractilidad, debido a que modifica la relación entre secuestro y pérdida de Ca^{+2} por el RS, procesos controlados por la fosforilación dependiente de CaMKII de la PLN y RyR2 respectivamente. Recordemos que el aumento del secuestro de Ca^{+2} o la disminución de su pérdida, aumentan el contenido de Ca^{+2} del RS, lo que mejora la contractilidad. Por otro lado, una disminución del secuestro o un aumento de la pérdida conducen a una disminución del contenido de Ca^{+2} del RS con aumento del Ca^{+2} diastólico, deterioro de la contractilidad e inducción de arritmias. Trataremos de establecer además qué isoforma de Epac está involucrada en los cambios contráctiles y si su activación requiere translocación a membranas.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo de Tesis fue profundizar el conocimiento de las proteínas Epac como reguladores de la función miocárdica. En particular, nos centramos en conocer la participación de Epac en la activación de CaMKII y la consiguiente fosforilación de sus sustratos en el RS, involucrados en el manejo del Ca^{+2} intracelular asociado a la función contráctil.

Objetivos específicos

- 1) Estudiar los efectos de la activación de Epac sobre el manejo de Ca^{+2} intracelular y la contractilidad en miocitos cardíacos en diferentes especies y bajo diferentes condiciones experimentales (variaciones de la $[\text{Ca}^{+2}]_o$).
- 2) Evaluar el efecto de la activación de Epac sobre el contenido y la pérdida espontánea de Ca^{+2} del RS en las distintas condiciones experimentales utilizadas.
- 3) Examinar el impacto de la estimulación de Epac sobre la función diastólica y la aparición de arritmias en dos modelos experimentales: miocitos aislados y corazón aislado y perfundido.
- 4) Estudiar las vías de señalización de Epac y la importancia de la activación de CaMKII como mecanismo mediador de los efectos de Epac en el miocardio.
- 5) Disecar la participación de la fosforilación dependiente de CaMKII de PLN y del RyR2 en los efectos de Epac sobre la respuesta contráctil y la generación de arritmias a través del uso de ratones TG.
- 6) Identificar y estudiar la distribución subcelular de las proteínas Epac1 y Epac2 en el miocardio no estimulado y luego de su estimulación con el activador específico 8-CPT.

CENTRO DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES

Facultad de Ciencias Médicas - UNLP

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Para este Trabajo de Tesis se utilizaron ratas Wistar macho de 3 a 5 meses de edad y los siguientes ratones macho de 4 a 6 meses de edad: C57BL/6, RyR2-WT (C57BL/6 que expresan RyR2 en su forma nativa), S2814A (C57BL/6 que expresan una forma mutante del RyR2 en la cual se reemplazó el sitio fosforilable por CaMKII, Ser2814, por alanina, un aminoácido no fosforilable) y PLN-DM (C57BL/6 que expresan la proteína PLN con sus dos sitios fosforilables, Ser16 y Thr17, reemplazados por alaninas). Los animales TG: RyR2-WT y S2814A, se obtuvieron del Departamento de Fisiología y Biofísica Celular del Dr. Xander Wehrens (Universidad de Columbia, USA) y los ratones PLN-DM, se obtuvieron del Departamento de Farmacología y Biofísica Celular de la Dra. Evangelia Kranias (Universidad de Cincinnati, USA). Ambas cepas fueron reproducidas y tipificadas genéticamente en nuestro laboratorio.

Elección de la concentración del activador de Epac

Para estudiar el rol de las proteínas Epac utilizamos el análogo del AMPc selectivo para Epac: 8-CPT (Biolog). Se demostró en algunos modelos experimentales, que el 8-CPT a altas concentraciones puede activar vías de señalización que involucran a AMPc/PKA (Poppe y col., 2008). En este Trabajo de Tesis se utilizó, en modelos *in vitro* y *ex vivo*, una concentración de 10 μ M 8-CPT. Nuestros experimentos confirmaron que la concentración seleccionada fue la correcta ya que no se alteraron las fosforilaciones de PLN y RyR2 en sus sitios específicos para PKA (véase Resultados, Figura 22).

Aislamiento de miocitos cardíacos

El aislamiento de miocitos que se describe a continuación, se realizó por digestión enzimática de acuerdo a lo descrito por Vila-Petroff y colaboradores (2000).

Rata: Se procedió a la eutanasia de los animales (250-300g) mediante inyección intraperitoneal única de pentobarbital sódico (35 mg/kg). Luego de confirmar la pérdida de respuesta del animal a estímulos mecánicos, se inyectó en el ápice del corazón heparina sódica (2,5 unidades/gr) para mantenerlo anticoagulado. Se procedió luego a la extirpación quirúrgica del corazón que se canuló a través de la aorta y se perfundió de acuerdo a la técnica de Langendorff. En este sistema de retroperfusión continua, el corazón fue perfundido a flujo constante por unos minutos (hasta lograr su estabilización) con solución Tyrode (ST), termostatzada a 37°C, suplementada con Ca^{+2} a una concentración final de 1 mM y equilibrada con O_2 . La composición de la ST fue (mM): ClNa 146,2; ClK 4,7; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,05; HPO_4Na_2 0,35; glucosa 11; Hepes 10; pH 7,4 (ajustado con NaOH). A continuación, la solución de perfusión fue cambiada por ST sin Ca^{+2} y suplementada con 0,01 mM EGTANa_2 , solución que se mantuvo durante no más de 4 minutos (en este momento el corazón deja de latir por la quelación del Ca^{+2} con EGTANa_2). Por último se reemplazó la solución conteniendo EGTANa_2 por ST suplementada con enzimas: colagenasa (136 U/ml; Worthington, type II), proteasa (0,02 mg/ml; Sigma, type XIV), seroalbúmina bovina (1 mg/ml; Sigma) y Ca^{+2} (0,06 mM) a fin de conseguir la digestión enzimática del tejido cardíaco. Esta solución fue recirculada para alcanzar un tiempo de perfusión total de 8-10 minutos, al final del cual el corazón fue removido de la cánula, cortado en pequeñas piezas y colocado en un recipiente que contenía ST suplementada con enzimas. Este recipiente fue colocado en un baño termostatzado a 37°C con agitación suave y continua durante 5 minutos a fin de lograr la correcta separación de las células. Luego de cada período de 5 minutos, se tomó la solución en la cual estaban contenidas las células (cuidando de no tomar tejido del

fondo del recipiente) y se la centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante (SN) fue removido y el pellet celular resuspendido en ST suplementada con concentraciones crecientes de Ca^{+2} (mM): 0,08; 0,16; 0,32; 0,64 y 1 a fin de lograr una recalcificación gradual de las células. Cuando las células alcanzan la concentración de Ca^{+2} deseada (1 mM para miocitos de rata) están listas para ser utilizadas (Figura 9).

Ratón: El procedimiento empleado fue similar al utilizado para aislar células de rata con algunas modificaciones. Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con heparina (2,5 unidades/gr) previamente a la inyección de pentobarbital sódico. La ST suplementada con enzimas y termostatzada a 37°C contenía: colagenasa (109 U/ml; Worthington, type II), proteasa (0,02 mg/ml; Sigma, type XIV), seroalbúmina bovina (1 mg/ml; Sigma) y Ca^{+2} (0,06 mM). Las soluciones de recalcificación tenían las siguientes $[\text{Ca}^{+2}]$ (mM): 0,1; 0,3; 0,6; 1,2 y 1,8, concentración final deseada para los miocitos de ratón.

Figura 9. Miocitos aislados de rata adulta mediante el método de Langendorff.

Medida de transitorios de Ca^{+2} eléctricamente evocados en miocitos ventriculares aislados

De acuerdo a lo descrito por Vila Petroff y colaboradores (2000), los miocitos ventriculares aislados de rata y ratón fueron incubados con el indicador fluorescente de Ca^{+2} FURA-2 acetometil ester (FURA-2AM, Invitrogen) (2 μM) por 8 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, a fin de incorporar el indicador al citosol celular. Los miocitos fueron lavados luego

con ST suplementada con Ca^{+2} (1 mM para rata, 1,8 mM para ratón) y mantenidos en oscuridad durante otros 30 minutos, a fin de permitir la desesterificación del indicador a cargo de las proteínas esterasas intracelulares. Este procedimiento asegura que el indicador se retenga dentro del miocito. A continuación se colocó un volumen pequeño de células cargadas con el indicador fluorescente sobre un microscopio invertido (Nikon Diaphot 200) adaptado para epifluorescencia (IonOptix) donde, bajo estimulación eléctrica (1 Hz), perfusión continua con ST y temperatura ambiente ($\sim 23^\circ\text{C}$), se registraron medidas simultáneas de los cambios transitorios de Ca^{+2} en el citosol (transitorio de Ca^{+2}) y acortamiento del sarcómero (Figura 10). La longitud sarcomérica de los miocitos y su acortamiento fueron determinados por un detector de movimiento (Crescent electronics, UT, USA). Como parámetros contráctiles se utilizaron la amplitud de los transitorios de Ca^{+2} y del acortamiento, los cuales fueron registrados y analizados usando un equipo y un software especializados (IonOptix y IonWizard; IonOptixCorp.). Como medida de la relajación miocárdica se empleó el tiempo a la mitad de la relajación ($t_{1/2}$) y la constante de tiempo exponencial de la caída de la relajación (τ), los cuales fueron calculados por el programa antedicho. La longitud de onda de excitación empleada para monitorear la señal de Ca^{+2} unido a FURA-2AM y Ca^{+2} libre fue de 360 y 380 nm respectivamente; la señal de emisión fue recogida a 510 nm. Debido a que el indicador se compartamentaliza dentro de organelas celulares (Williford y col., 1990) se vuelve problemático calcular la $[\text{Ca}^{+2}]$ a partir de la fluorescencia de FURA-2AM. Es por ello que las medidas de la $[\text{Ca}^{+2}]$ fueron reportadas como fracción de fluorescencia (F340/380).

Figura 10. *A. Representación gráfica de un registro de acortamiento celular cardíaco. B. Representación gráfica de un registro de transitorio de Ca^{+2} . En ambos gráficos se indican los parámetros contráctiles evaluados.*

Las células estudiadas fueron seleccionadas teniendo en cuenta su morfología ($\sim 1,7 \mu\text{m}$ de longitud sarcomérica basal), el porcentaje de acortamiento (4-8%) y la amplitud del transitorio de Ca^{+2} (0,5-0,7 para rata y 0,2-0,4 para ratón) al momento de iniciar el estudio.

Luego de 5 minutos de estabilización durante los cuales se registraron los parámetros antedichos, se suplementó la ST con 8-CPT llegando a una concentración final de $10 \mu\text{M}$. El tratamiento fue mantenido hasta alcanzar una respuesta estable (entre 5-10 minutos), durante los cuales se tomaron medidas del acortamiento y de los cambios del Ca^{+2} citosólico. Los miocitos tratados con 8-CPT fueron expuestos a continuación a ST suplementada con 25 mM de cafeína por 4 segundos, a fin de evaluar el contenido de Ca^{+2} del RS, que fue determinado como la amplitud del transitorio de Ca^{+2} inducido por la cafeína (Bers, 2001). Cabe remarcar que esta sustancia es capaz de abrir en forma total y completa los RyR2 del RS, produciendo el vaciamiento del mismo. Por otra parte, dado que en estas condiciones hay una inhibición funcional de la SERCA2a, la remoción de Ca^{+2} del citosol luego del pulso de cafeína se debe a la acción del NCX. En consecuencia, la constante de tiempo de la caída del transitorio de Ca^{+2} (τ) inducido por cafeína es una medida de la actividad de dicho transportador. Estos

experimentos fueron repetidos a diferentes $[Ca^{+2}]_o$ y usando diferentes modelos animales (0,5, 1 y 1,8 mM para rata y 1,8 y 2,5 mM para ratón).

Estudio de la frecuencia de sparks o chispas de Ca^{+2} usando microscopía confocal

La activación simultánea de varios RyR2 genera un incremento local y restringido en la $[Ca^{+2}]$, conocido como *sparks* o chispas de Ca^{+2} (Figura 11) (Cheng y col., 1993; Lopez-Lopez y col., 1995), los cuales pueden producirse de forma espontánea durante el período diastólico del miocito cardíaco. Estos eventos, muy útiles para estudiar la actividad de RyR2 *in situ*, podrían contribuir al vaciamiento del RS en diástole (Bers, 2001).

Para realizar este estudio registramos la señal de Ca^{+2} de células cargadas con el indicador de Ca^{+2} fluorescente Fluo-4 (Invitrogen) (10 μ M), utilizando un microscopio confocal de barrido láser (Zeiss, LSM410). El indicador fluorescente fue excitado usando un láser de argón (488 nM) y la fluorescencia emitida fue recogida por un filtro de emisión de 515 nM. Las liberaciones espontáneas de Ca^{+2} desde el RS fueron analizados por un programa especial (SparkMaster plugin for ImageJ) (Picht y col., 2007) que las detecta como áreas de incremento de fluorescencia respecto al nivel basal. Las chispas fueron individualmente analizadas respecto a su amplitud (diferencia entre el pico de fluorescencia y la fluorescencia basal: $\Delta F/F_0$), ancho (μ m) y duración (ms). La frecuencia de chispas se obtuvo promediando el número de las mismas en imágenes recogidas en reposo, luego 10 minutos de estimulación a 1 Hz en situación control (n= 28) o bajo tratamiento con 8-CPT (n= 20).

Figura 11. Representación tridimensional de una chispa de Ca^{+2} registrada en célula cardíaca.

Perfusión de corazones de rata

Los corazones fueron obtenidos en las mismas condiciones que para el aislamiento de células y perfundidos de acuerdo a la técnica de Langendorff a temperatura (37°C) y flujo (14 ml/min) constantes. Luego de la ablación del nodo aurículo-ventricular por pinzamiento del tabique interauricular, la frecuencia cardíaca fue mantenida a 240 pulsos/minuto mediante la utilización de electrodos de platino colocados a los lados del corazón (Figura 12A). El corazón fue perfundido con solución buffer bicarbonato fisiológica (BBS), conteniendo (mM): ClNa 128,3; ClK 4,7; Cl₂Ca 1,35; CO₃HNa 20,2; PO₄H₂Na 0,4; Cl₂Mg 1,1; glucosa 11,1; EDTANa₂ 0,04; esta solución fue equilibrada con 95% O₂-5% CO₂ para obtener un pH de 7,4. Luego de un breve período de estabilización, el corazón fue perfundido con BBS suplementada con 10 μM de 8-CPT durante un período de tiempo total de 40 minutos. Los parámetros mecánicos se estudiaron mediante la introducción en el ventrículo izquierdo de un globo de látex conectado a un sistema de transducción de presión. El globo se llenó de solución acuosa para lograr una presión ventricular izquierda de fin de diástole de 6-12 mmHg (Mundiña-Weilenmann y col., 2005). Los parámetros mecánicos obtenidos para caracterizar el estado contráctil y de relajación del corazón fueron: presión diastólica final (PDF), presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PVI), presión sistólica máxima (PSM), máxima velocidad de desarrollo de la presión (+dP/dt) y tiempo a la mitad de la relajación ($t_{1/2}$) (Figura 12B).

Figura 12. *A. Corazón montado en sistema Langendorff de retroperusión continua para el estudio de los parámetros mecánicos cardíacos. B. Esquema del registro de la presión intraventricular y su derivada donde se especifican los parámetros contráctiles estudiados.*

Estudio in vitro del efecto de la activación de Epac sobre la fosforilación proteica

Para este estudio se utilizaron miocitos aislados de rata adulta incubados con ST a diferentes $[Ca^{+2}]_o$ (0,5, 1 y 1,8 mM) estimulados eléctricamente a 1 Hz durante 5 minutos, en condiciones control o bajo tratamiento con 10 μ M de 8-CPT. Los miocitos fueron luego lisados con buffer lisis conteniendo (mM): $P_2O_7Na_4$ 1; glicerofosfato sódico 20; $EGTANa_2$ 2; $EDTANa_2$ 2; VO_4Na_3 1; DTT 2; FNa 50; Tritón X-100 1%; SDS 1%; ácido ocaidaico 10^{-3} ; cocktail inhibidor de proteasas. El estudio bioquímico se basó en el análisis del estado de fosforilación de CaMKII y dos de sus proteínas sustrato: PLN y RyR2.

Aislamiento de fracciones celulares

El aislamiento de fracciones celulares se realizó por centrifugación diferencial a partir de 500 mg de tejido cardíaco pulverizado y homogeneizado con vástago de Teflón en 4 volúmenes de buffer A conteniendo (mM): Tris-HCl 10 (pH 7,4); sacarosa 350; $EGTANa_2$ 0,5 y cocktail inhibidor de proteasas. Todo el procedimiento fue realizado a 4°C. El homogenato fue

centrifugado a 1500xg durante 5 minutos y el SN reservado. El pellet fue resuspendido en 2 volúmenes del mismo buffer y recentrifugado a 1500xg por 5 minutos. Este segundo SN se sumó al primero, reservándose una parte como “homogenato” y el resto se centrifugó 12000xg durante 30 minutos. El SN fue separado cuidadosamente del pellet y vuelto a centrifugar a 100000xg por 60 minutos. El SN obtenido en esta nueva centrifugación fue reservado como “citosol” y el pellet resuspendido en 100 µl de buffer B (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4; sacarosa 0,35 M; EGTA Na_2 0,5 mM, Tritón-X100 1%, cocktail inhibidor de proteasas) y centrifugado a 1000xg por 3 minutos. El SN así obtenido contiene la fracción de membranas. Las muestras resultantes fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización. En la Figura 13 se resume el protocolo descripto.

Figura 13. Esquema del protocolo empleado para el aislamiento de fracciones celulares por centrifugación diferencial.

Estudio proteico por la técnica de Western blot

El contenido proteico de las muestras se determinó por el método de Bradford. A continuación, se disolvió el volumen correspondiente a la cantidad de proteína a sembrar en solución solubilizante (buffer de muestra). Las proteínas contenidas en la muestra fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS) de acuerdo a la técnica de Laemmli (Laemmli, 1970) o a la técnica de Porzio y Pearson (modificación de la anterior) (Porzio y Pearson, 1977), donde el porcentaje de acrilamida empleado dependió del peso molecular de la proteína en estudio. El gel de apilamiento se preparó según la siguiente composición: 4% acrilamida (relación acrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida 30:0,8 según la técnica de Laemmli y 30:1 según la técnica de Porzio y Pearson), Tris-HCl 125 mM (pH: 6,8) y SDS 0,1%. El gel de resolución preparado siguiendo el método de Laemmli contuvo: acrilamida (en el porcentaje que correspondiera en cada caso), Tris 375 mM (pH 8,7) y SDS 0,1%. El gel de resolución preparado siguiendo el método de Porzio y Pearson contuvo: acrilamida (en el porcentaje que correspondiera en cada caso), Tris/glicina 400 mM (3:1) (pH 8,8), glicerol 5%, SDS 0,1% y EDTANa₂ 0,2 mM. La polimerización del gel fue catalizada en todos los casos por el agregado de 0,08% tetrametilendiamina y se inició por el agregado de trazas de persulfato de amonio. El buffer de electroforesis empleado contuvo: Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% (pH 8,3).

La cantidad de proteína sembrada en cada gel fue: 25 µg para la detección de PLN (proteína total y forma fosforilada) y GAPDH; 50 µg para pThr286-CaMKII, CQS, Na⁺/K⁺ATPasa y β-actina y 100 µg para Epac1, Epac2 y RyR2 (proteína total y forma fosforilada). La electroforesis fue realizada a potencial constante, comenzando a 100 voltios durante el apilamiento de las muestras, y luego a 120 voltios durante la resolución de las proteínas. Al término de la electroforesis, los geles fueron lavados 3 veces durante 15 minutos en solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 10%) a fin de eliminar la mayor

cantidad de SDS posible. Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF) (Immobilon-P, Millipore, USA) en condiciones semisecas durante 1 hora a 12 voltios (proteínas de bajo peso molecular) o por la técnica de transferencia húmeda durante 15 horas a 25 voltios (proteínas de alto peso molecular). Al finalizar la transferencia, la membrana fue expuesta al colorante reversible rojo Ponceau S para evidenciar la correcta transferencia de las proteínas, luego de lo cual se lavó 2 ó 3 veces con solución salina amortiguadora de Tris (TBS: Tris 50 mM y ClNa 150 mM, pH 7,4) o TBS adicionado con 0,1% de detergente Tween 20 (TBS-T) de acuerdo al anticuerpo utilizado. Una vez libres de colorante, las membranas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con solución de TBS o TBS-T suplementada al 5% con leche descremada con el objeto de bloquear los sitios libres de proteínas en la membrana, y así evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la superficie de la misma. Para la detección inmunológica de las proteínas de interés, las membranas ya bloqueadas fueron incubadas con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: pThr17-PLN (1:2000; Badrilla, Leeds, UK), pSer16-PLN (1:5000; Badrilla, Leeds, UK), PLN (1:5000; Badrilla, Leeds, UK), pThr286-CaMKII (1:1000; Abcam), pSer2808/9-RyR2 (1:5000; Badrilla, Leeds, UK), pSer2814/5-RyR2 (1:5000; Badrilla, Leeds, UK), RyR2 (1:5000; Thermo Scientific, USA), Epac1 y Epac2 (1:1000; Cell Signaling), CQS (1:2000; ABR), Na⁺/K⁺ATPasa (1:5000; Santa Cruz), β-actina (1:2000; Santa Cruz) y GAPDH (1:5000; Millipore).

Al día siguiente el anticuerpo fue retirado y las membranas fueron lavadas 3 veces durante 15 minutos con TBS o TBS-T. Finalmente, las membranas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora con anticuerpos secundarios específicos conjugados a la peroxidasa de rabanito (Santa Cruz). El revelado fue realizado con reactivos quimioluminiscentes (ECL, Amersham) y la señal fue recogida por un sistema de alta sensibilidad de detección (ChemiDoc™ XRS). El

análisis de resultados fue hecho usando el programa ImageJ (1.37v NIH, USA). Los niveles de fosforilación fueron expresados como porcentaje de la fosforilación inducida por el tratamiento respecto a la situación control.

Análisis estadístico

Los resultados promedio fueron expresados como la media $\pm$ error estándar. Para el estudio de significación se utilizó el test de t-Student para muestras apareadas o independientes. Para la comparación entre diferentes grupos se utilizó el test de Análisis de Varianza (ANOVA). Las diferencias estadísticas observadas con ANOVA fueron examinadas con el test de Dunnet. En todos los casos se consideró $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

CENTRO DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES

Facultad de Ciencias Médicas - UNLP

RESULTADOS

La activación de Epac modifica el acortamiento celular y el transitorio de Ca^{+2}

Con el fin de encontrar una explicación a los efectos contradictorios en respuesta a la activación de Epac descritos en la literatura, realizamos experimentos en miocitos aislados de rata donde se evaluó la acción del activador de Epac, 8-CPT, sobre la función contráctil y el manejo del Ca^{+2} intracelular, a distintas concentraciones de Ca^{+2} extracelular ($[\text{Ca}^{+2}]_o$). Como se muestra en la Figura 14 la administración de 8-CPT en presencia de $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 0,5 mM, produjo un efecto intrópico positivo que se manifestó en el incremento tanto del acortamiento sarcomérico como del transitorio de Ca^{+2} . Sin embargo, a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1 mM, ninguno de estos parámetros se modificó. Más interesante aún fue el resultado obtenido a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1,8 mM, ya que tanto el acortamiento celular como el transitorio de Ca^{+2} disminuyeron en forma significativa (Figura 14A y 14C). Por otra parte a bajas $[\text{Ca}^{+2}]_o$, la estimulación de Epac produjo un efecto relajante que se detectó como una disminución del $t_{1/2}$ del acortamiento y del transitorio de Ca^{+2} (Figura 14B y 14D). El hecho de que los cambios en el acortamiento se acompañen de cambios de los transitorios de Ca^{+2} en el mismo sentido, sugiere que en nuestras condiciones experimentales, si existe una modificación de la sensibilidad al Ca^{+2} de las miofibrillas, ésta tendría una participación limitada en los cambios contráctiles inducidos por Epac. Refuerza esta conclusión el hecho de que, como veremos más adelante, el 8-CPT no modificó la fosforilación de MBPc, una de las proteínas contráctiles que regula la sensibilidad al Ca^{+2} de los miofilamentos.

Figura 14. Efectos del 8-CPT en miocitos aislados de rata cargados con el indicador de Ca²⁺ fluorescente FURA-2AM y enfrentados a diferentes [Ca²⁺]_o: 0,5; 1 y 1,8 mM. **A)** Acortamiento del sarcómero; **B)** Tiempo a la mitad de la relajación del sarcómero ($t_{1/2}$); **C)** Amplitud del transitorio de Ca²⁺; **D)** Tiempo a la mitad de la caída del transitorio de Ca²⁺ ($t_{1/2}$). * $p < 0,05$ vs control a cada [Ca²⁺]_o.

Dado que las controversias respecto a los efectos de Epac provienen de experimentos realizados tanto en rata como en ratón, decidimos estudiar si el patrón inotrópico y relajante en respuesta a la activación de Epac también se observaba en miocitos aislados de ratón. Para ello se buscaron [Ca²⁺]_o que produjeran en esta especie acortamientos y transitorios de Ca²⁺ similares a los detectados en la rata. A [Ca²⁺]_o 1,8 mM, [Ca²⁺]_o que promueve un estado contráctil semejante al de 0,5 mM en la rata, el 8-CPT produjo efectos inotrópico positivo y relajante (Figura 15). Sin embargo, a [Ca²⁺]_o 2,5 mM, [Ca²⁺]_o que promueve un estado

contráctil semejante al de 1 mM en la rata, no se observaron cambios contráctiles ni de relajación luego de la activación de Epac (Figura 15).

Figura 15. Efectos del 8-CPT en miocitos aislados de ratón cargados con el indicador de Ca^{+2} fluorescente FURA-2AM y enfrentados a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1,8 y 2,5 mM. **A)** Acortamiento del sarcómero; **B)** Tiempo a la mitad de la longitud de reposo del sarcómero ($t_{1/2}$); **C)** Amplitud del transitorio de Ca^{+2} ; **D)** Tiempo a la mitad de la caída del transitorio de Ca^{+2} . * $p < 0,05$ vs control a cada $[\text{Ca}^{+2}]_o$.

Estos resultados nos permiten confirmar que la activación de Epac produce diferentes efectos sobre la contractilidad y el manejo del Ca^{+2} . Por otra parte nos permiten establecer que estos efectos no dependen de la especie sino de las situaciones experimentales, en las que la oferta de $[\text{Ca}^{+2}]_o$ a la célula parece ser un condicionante crítico de la respuesta final a la activación de Epac. Una posible explicación a esta variabilidad, podría surgir de diferencias en el balance entre retoma de Ca^{+2} hacia el RS a través del complejo SERCA2a/PLN y pérdida espontánea

de Ca^{+2} desde el RS a través del RyR2, a cada $[\text{Ca}^{+2}]_o$. Beneficios y riesgos potenciales están asociados a modificaciones de este balance. Si la retoma supera a la pérdida, aumentará el contenido de Ca^{+2} del RS y esto conducirá a un aumento de la contractilidad. Por el contrario, si la pérdida supera a la retoma, disminuirá el contenido de Ca^{+2} del RS con la consiguiente depresión contráctil. Además esta situación podría conducir a un manejo alterado de Ca^{+2} diastólico y a la aparición de arritmias.

La activación de Epac modifica el contenido de Ca^{+2} del retículo sarcoplasmático

A continuación estudiamos la posibilidad de que las alteraciones observadas en la contractilidad celular y en el transitorio de Ca^{+2} luego del tratamiento con 8-CPT, fueran consecuencia de una carga diferente del RS. Para determinar esta posibilidad se midió en miocitos de rata, el contenido de Ca^{+2} del RS a través de la amplitud de los transitorios de Ca^{+2} inducidos por cafeína, a una concentración capaz de abrir completamente los RyR2 y producir el vaciamiento de la organela (Figura 16). Los resultados muestran aumento, no cambio y disminución en el contenido de Ca^{+2} del RS cuando las células se enfrentaron al activador de Epac, a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 0,5; 1 y 1,8 mM respectivamente. En consecuencia, estas modificaciones del contenido de Ca^{+2} frente a 8-CPT podrían explicar las variaciones en acortamiento y transitorio de Ca^{+2} descriptas previamente. Nótese que el 8-CPT a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 0,5 mM incrementó el contenido de Ca^{+2} del RS a un valor que no fue superado, ni por el aumento de $[\text{Ca}^{+2}]_o$ (1 mM o 1,8 mM), ni por el agregado de 8-CPT a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1 mM. Esto podría indicar que en estas distintas condiciones se alcanzó la carga máxima de Ca^{+2} del RS. Por otra parte, al analizar el tiempo de caída del Ca^{+2} citosólico luego de la aplicación de cafeína, no se vieron cambios en ninguna de las tres condiciones. Debido a que la remoción de Ca^{+2} del citosol luego de un

pulso de cafeína se logra por acción del NCX, estos resultados indican que la activación de Epac no afecta la actividad de este intercambiador (Tabla 1).

Figura 16. Estudio del contenido de Ca^{+2} del RS a través de la aplicación de un pulso de cafeína en situación control o luego de 10 minutos de tratamiento con 8-CPT. **A)** Registros típicos de transitorios de Ca^{+2} inducidos por cafeína; **B)** Resultados totales del contenido de Ca^{+2} del RS. * $p < 0,05$ vs control a cada $[\text{Ca}^{+2}]_o$.

τ de los transitorios de Ca^{+2} inducidos por cafeína						
	0,5 mM Ca^{+2}		1 mM Ca^{+2}		1,8 mM Ca^{+2}	
	Ctrl	8-CPT	Ctrl	8-CPT	Ctrl	8-CPT
media	2,57	2,87	3,23	2,92	2,83	3,72
ES	0,16	0,20	0,28	0,18	0,30	0,61
n	6	7	7	7	6	4

Tabla 1. Constante de tiempo (seg) de la caída del transitorio de Ca^{+2} , evocado por la aplicación de un pulso de cafeína sobre miocitos aislados de rata. Los datos se tomaron a tres $[\text{Ca}^{+2}]_o$: 0,5; 1 y 1,8 mM en situaciones control (Ctrl) y luego de 10 minutos de tratamiento con 10 μM 8-CPT.

La estimulación de Epac incrementa la liberación espontánea de Ca^{+2} del RS

Para evaluar el peso de la pérdida de Ca^{+2} en la determinación del contenido de Ca^{+2} en el RS, estudiamos las chispas de Ca^{+2} o *sparks* que aparecen en el citosol como consecuencia de la apertura espontánea de los RyR2. La Figura 17A muestra imágenes obtenidas con el microscopio confocal de barrido láser en miocitos cardíacos de rata en reposo, antes y después del tratamiento con 8-CPT. Los resultados totales (Figura 17B) muestran que la aplicación de 8-CPT aumentó la frecuencia de liberaciones espontáneas de Ca^{+2} a todas las $[\text{Ca}^{+2}]_o$ estudiadas. Es importante destacar que a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1,8 mM, el tratamiento con 8-CPT generó la aparición de ondas de Ca^{+2} (Figura 17A, panel inferior derecho), que resultan de la confluencia de un gran número de chispas. Este fenómeno, si bien dificulta la individualización y en consecuencia, subestima el número de chispas (Figura 17B), es un indicador de pérdida masiva de Ca^{+2} del RS.

Figura 17. Liberación espontánea de Ca^{+2} del RS en miocitos aislados de rata cargados con el indicador fluorescente de Ca^{+2} Fluo-4. Los miocitos fueron estudiados antes (Control) y después del tratamiento con 8-CPT (10 μM). **A)** Imágenes obtenidas con el microscopio confocal donde se observan claramente las liberaciones espontáneas de Ca^{+2} del RS (chispas). A $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1,8 mM, la presencia de 8-CPT promovió la aparición de ondas de Ca^{+2} ; **B)** Resultados totales de la frecuencia de chispas de Ca^{+2} . * $p < 0,05$ vs control a cada $[\text{Ca}^{+2}]_o$; # $p < 0,05$ entre controles a diferente $[\text{Ca}^{+2}]_o$.

Las características de las chispas de Ca^{+2} (amplitud, duración y ancho) no fueron significativamente diferentes entre los grupos, como se muestra en la Tabla 2.

Características de las chispas de Ca^{+2}						
Amplitud (F/Fo)						
	0,5 mM Ca^{+2}		1 mM Ca^{+2}		1,8 mM Ca^{+2}	
	Ctrl	8-CPT	Ctrl	8-CPT	Ctrl	8-CPT
Promedio	0,61	0,61	0,53	0,43	0,51	0,41
ES	0,13	0,07	0,06	0,05	0,08	0,09
n	5	4	14	12	8	4
Duración (mseg)						
	0,5 mM Ca^{+2}		1 mM Ca^{+2}		1,8 mM Ca^{+2}	
	Ctrl	8-CPT	Ctrl	8-CPT	Ctrl	8-CPT
Promedio	22,34	29,66	30,37	31,67	37,73	30,79
ES	2,36	0,91	1,64	1,99	2,15	2,78
n	5	4	14	12	8	4
Ancho (μm)						
	0,5 mM Ca^{+2}		1 mM Ca^{+2}		1,8 mM Ca^{+2}	
	Ctrl	8-CPT	Ctrl	8-CPT	Ctrl	8-CPT
Promedio	2,56	2,78	2,88	2,92	2,98	2,89
ES	0,14	0,07	0,06	0,05	0,05	0,10
n	5	4	14	12	8	4

Tabla2. Análisis de la amplitud, duración y ancho de las chispas de Ca^{+2} . Estas medidas se tomaron sobre la misma célula, antes y después de 10 minutos de tratamiento con 8-CPT (10 μM). Se comparan los valores hallados en las tres condiciones experimentales propuestas: $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 0,5; 1 y 1,8 mM.

Como se mencionó previamente, las liberaciones espontáneas de Ca^{+2} dependen de la carga del RS. Para estudiar esta relación, graficamos la frecuencia de chispas en función del contenido de Ca^{+2} del RS a cada una de las situaciones estudiadas (Figura 18). Los resultados indican que sólo a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 0,5 mM, el aumento en la frecuencia de chispas de Ca^{+2} provocado por estimulación de Epac puede ser consecuencia del aumento en el contenido de Ca^{+2} del RS. Sin embargo, a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1 y 1,8 mM, el aumento de la pérdida espontánea no se asoció a aumentos del contenido de Ca^{+2} del RS. Como muestra la Figura 18, situaciones de igual carga (Ctrl a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1 y 1,8 mM y 8-CPT a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 0,5 y 1 mM) se asociaron con frecuencias de

liberaciones espontáneas significativamente distintas. Más aún, 8-CPT en $[Ca^{+2}]_o$ 1,8 mM produjo la mayor frecuencia de chispas de Ca^{+2} con la menor carga del RS.

Figura 18. Dependencia de la pérdida espontánea de Ca^{+2} del RS (frecuencia de chispas) con el contenido de Ca^{+2} del RS.

Estos resultados, aparentemente contradictorios, pueden encontrar explicación en la existencia de mecanismos que modifiquen la actividad del RyR2 y faciliten la pérdida espontánea de Ca^{+2} por el canal, de manera independiente del contenido de Ca^{+2} del RS. Entre los posibles mecanismos se puede considerar la fosforilación del RyR2 por la CaMKII (Maier y col., 2003; Wehrens y col., 2004; Maier y Bers, 2007).

La activación de Epac altera la función diastólica y promueve la aparición de arritmias

Como se planteó previamente, el aumento de la pérdida espontánea de Ca^{+2} por el RS podría manifestarse en una alteración del manejo de la $[\text{Ca}^{+2}]_c$ diastólico y/o en la aparición de arritmias. Para corroborar si estas alteraciones forman parte de los efectos de la estimulación de Epac, se midió en miocitos de rata el transcurso en el tiempo del Ca^{+2} diastólico luego de la exposición a 8-CPT a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1 mM. Como se muestra en la Figura 19A y 19B, el Ca^{+2} diastólico aumentó significativamente a partir de los 10 minutos de tratamiento, sugiriendo una modificación en el balance entre retoma y pérdida espontánea de Ca^{+2} por el RS, con predominio de la pérdida. Esta alteración del manejo del Ca^{+2} podría ser la responsable de las modificaciones en la presión ventricular izquierda observadas en el corazón entero bajo el mismo tratamiento. Como muestran los registros típicos obtenidos de corazones perfundidos de rata (Figura 19C), la administración de 8-CPT produjo un aumento en la presión de fin de diástole (contractura), sin cambios en la presión sistólica máxima, con la disminución consecuente de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo. Los resultados totales (Figura 19D) indican que el aumento de la presión diastólica final alcanzó niveles significativos a los 40 minutos.

Por otra parte en miocitos de ratón, la intensidad en la alteración del balance retoma/pérdida provocó arritmogénesis. A $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 2,5 mM, la activación de Epac generó, en forma temprana, la aparición de arritmias que fueron evidentes tanto en los registros de acortamiento como de transitorio de Ca^{+2} (Figura 20A). En estas condiciones, se detectaron patrones arrítmicos en el 100% de los miocitos estudiados en presencia de 8-CPT y 37,5% en su ausencia (Figura 20B). Nótese que durante la arritmogénesis hay una disminución de la longitud diastólica en el miocito en concordancia con la contractura observada en el corazón perfundido.

Figura 19. Curso en el tiempo del efecto del 8-CPT sobre el Ca^{+2} diastólico en miocitos de rata a $[Ca^{+2}]_o$ 1 mM y sobre la presión ventricular izquierda de corazones aislados de rata adulta perfundidos a $[Ca^{+2}]_o$ 2,5 mM. **A)** Registros de los transitorios de Ca^{+2} en ausencia y presencia de 8-CPT. **B)** Valores promedio de Ca^{+2} diastólico. **C)** Registros de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PVI) y **D)** Valores promedio de presión diastólica final de ventrículo izquierdo (PDF) obtenidos en presencia y ausencia de 8-CPT. * $p < 0,05$ vs control.

Figura 20. Efecto del 8-CPT en la generación de arritmias en miocitos de ratón estudiados en condiciones control y bajo tratamiento con 8-CPT (10 μ M) a $[Ca^{+2}]_o$ 2,5 mM. Registro completo del acortamiento sarcomérico (μ m) en ausencia (**A**) y presencia de la droga (**B**). **C** Incidencia de eventos arritmogénicos luego del tratamiento con 8-CPT. * $p < 0,05$ vs control.

Vía de señalización de Epac: la estimulación de Epac activa a CaMKII y aumenta la fosforilación de sus proteínas sustrato, PLN y RyR2

Como se describió en la Introducción, una de las vías de señalización de Epac propuesta en el músculo cardíaco involucra a Rap1-PLC ϵ -PKC ϵ -CaMKII. La Figura 21A muestra que el tratamiento de miocitos de rata con 8-CPT a $[Ca^{+2}]_o$ 1 mM aumentó la fosforilación de CaMKII en su sitio Thr286 -un indicador del aumento de su actividad- y también la fosforilación de sus sustratos: Thr17 de PLN y Ser2815 de RyR2. Esta respuesta asociada a la activación de Epac se inhibió cuando los miocitos fueron preincubados con el inhibidor específico de CaMKII, AIP, confirmando a esta quinasa como eslabón río abajo en la cascada de señalización de Epac. Por otra parte, la administración de calfostina C (CC) -un inhibidor inespecífico de PKC- también anuló el incremento de las fosforilaciones dependientes de CaMKII. Estos resultados indican que en nuestras condiciones experimentales, PKC está involucrada en la señalización de Epac y que, como fue sugerido previamente, se encuentra río arriba de CaMKII. Corrobora esta conclusión el hecho de que CC anuló el aumento de Ca^{+2} diastólico inducido por 8-CPT en miocitos de rata (Figura 21B). Finalmente, el 8-CPT no tuvo efecto sobre el estado de fosforilación de MBPc, que sí se fosforiló cuando los miocitos se trataron con el agonista β -adrenérgico isoproterenol (Figura 21C). Estos resultados sugieren que en nuestras condiciones, la estimulación de Epac no altera, a través de MBPc, la sensibilidad al Ca^{+2} de las proteínas contráctiles.

Figura 21. Cascada de señalización activada por Epac. **A)** Estado de fosforilación de CaMKII (p-CaMKII) y sus sustratos Thr17 de PLN (pThr17-PLN) y Ser2815 de RyR2 (pSer2815-RyR2) luego de la incubación de los miocitos con 10 μM 8-CPT a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1 mM. Se utilizó AIP (1 μM) y CC (0,5 μM) como inhibidores de CaMKII y PKC respectivamente. **B)** Efectos de CC sobre los aumentos del Ca^{+2} diastólico. **C)** Estado de fosforilación de MBPc (pMBPc) luego de la incubación de los miocitos con 10 μM 8-CPT. Se empleó 1 μM Isoproterenol (Iso) como control positivo de la fosforilación. * $p < 0,05$ vs control, # $p < 0,05$ vs 8-CPT.

Para confirmar la especificidad del 8-CPT, debimos descartar la posible activación de otro efector del AMPc, la PKA. Como se observa en la Figura 22, Ser16 de PLN, un sitio indicador específico de la activación de PKA y Ser2809 de RyR2, principalmente fosforilado por esta quinasa, no mostraron aumentos de fosforilación en respuesta al tratamiento de los miocitos con el activador de Epac. Sin embargo, sí se observaron las fosforilaciones dependientes de PKA cuando se utilizó el agente β -adrenérgico isoproterenol.

Figura 22. Estudio del estado de fosforilación de dos sustratos clásicos de PKA (pSer16-PLN y pSer2809-RyR2) en miocitos de rata tratados con 8-CPT (10 μ M) o con Isoproterenol (Iso 1 μ M).

Fosforilaciones de PLN y RyR2 inducidas por la activación de Epac a distintas $[Ca^{+2}]_o$

Como ya se mencionó, la variación de la respuesta a Epac en función de la oferta de $[Ca^{+2}]_o$ al miocito, podría ser consecuencia de cambios en el balance entre retoma y pérdida espontánea de Ca^{+2} por el RS. Dado que la fosforilación por CaMKII de PLN y RyR2 aumenta la retoma y la pérdida de Ca^{+2} por el RS respectivamente, decidimos evaluar dichas fosforilaciones en respuesta a Epac a las tres $[Ca^{+2}]_o$ empleadas. Se analizaron entonces el estado de fosforilación de PLN en su sitio Thr17 y de RyR2 en su sitio Ser2815 (Figura 23). Los resultados revelaron que la activación de Epac aumentó significativamente la fosforilación de PLN y RyR2 a cada una de las $[Ca^{+2}]_o$ estudiadas. Sin embargo la contribución de estas fosforilaciones al balance ganancia/pérdida de Ca^{+2} del RS no parece ser igual. A $[Ca^{+2}]_o$ 0,5 mM, la fosforilación de PLN prevalecería como mecanismo regulador ya que en esta condición se detecta un aumento neto de la carga de Ca^{+2} del RS y de la contractilidad (Figura 16). La aceleración de la caída del transitorio de Ca^{+2} y el efecto relajante detectado a nivel del acortamiento sarcomérico

(Figura 14) confirman que la función del complejo SERCA2a/PLN está aumentada y domina el manejo de Ca^{+2} por el RS. A $[\text{Ca}^{+2}]_o$ superiores, la fosforilación del RyR2 adquiere mayor relevancia, promoviendo una pérdida que impide la ganancia de Ca^{+2} del RS. Esta pérdida, o bien contrarresta el aumento de la retoma y en consecuencia no se observan cambios en la carga de Ca^{+2} ($[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1 mM), o bien lo supera provocando la disminución del contenido de Ca^{+2} de la organela ($[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1,8 mM) (Figura 16), y esto se manifiesta en los respectivos cambios contráctiles (Figura 14). A una conclusión similar se puede arribar analizando los efectos del aumento de la $[\text{Ca}^{+2}]_o$ en ausencia de 8-CPT: cuando la $[\text{Ca}^{+2}]_o$ se incrementó de 0,5 a 1 mM, la fosforilación de PLN prevaleció en el manejo de Ca^{+2} por el RS favoreciendo la ganancia y en consecuencia el aumento de la carga de Ca^{+2} ; cuando la $[\text{Ca}^{+2}]_o$ se incrementó de 1 a 1,8 mM la fosforilación del RyR2 predominó favoreciendo la pérdida e impidiendo el aumento del contenido de Ca^{+2} del RS (Figura 18). Es interesante destacar que sólo los niveles de fosforilación del RyR2 alcanzados con 8-CPT a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1,8 mM provocaron una pérdida de Ca^{+2} que lleva al vaciamiento del RS.

Figura 23. Fosforilación de Thr17 de PLN (pThr17-PLN) y Ser2815 de RyR2 (pSer2815-RyR2) en respuesta a 8-CPT a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ de 0,5; 1 y 1,8 mM. * $p < 0,05$ vs control a cada $[\text{Ca}^{+2}]_o$; # $p < 0,05$ entre controles a diferentes $[\text{Ca}^{+2}]_o$.

Contribución relativa de la fosforilación de PLN y del RyR2 en la respuesta a la activación de Epac

El siguiente paso fue comprobar la contribución relativa de la fosforilación de PLN y RyR2 en la respuesta contráctil y arritmogénica a la activación de Epac. Para ello realizamos experimentos en miocitos aislados de dos modelos de ratones TG: a) ratones en los que los sitios de fosforilación de PLN, Ser16 y Thr17, fueron reemplazados por el aminoácido no fosforilable, alanina (PLN-DM) y b) ratones en los que el sitio de fosforilación del RyR2, Ser2814, fue mutado a alanina (Ser2814A).

En la Figura 24 se muestran los resultados totales obtenidos en los PLN-DM a $[Ca^{+2}]_o$ 1,8 mM. Mientras que en ratones WT el agregado de 8-CPT aumentó el acortamiento y el transitorio de Ca^{+2} y aceleró la relajación (Figura 15), estos efectos inotrópico positivo y relajante no se manifestaron en los ratones PLN-DM. Los resultados indican que es necesaria la fosforilación de PLN para que la estimulación de Epac incremente la contractilidad y relajación en el miocito. Este hallazgo confirma que en condiciones de baja $[Ca^{+2}]_o$, es la fosforilación de esta proteína, la que al activar la retoma, determina la ganancia de Ca^{+2} del RS responsable de los efectos contráctiles observados en respuesta a Epac.

Figura 24. Efectos del 8-CPT en miocitos aislados de ratones WT y PLN-DM cargados con el indicador de Ca²⁺ fluorescente FURA-2AM y enfrentados a [Ca²⁺]_o 1,8 mM. **A)** Acortamiento del sarcómero; **B)** Tiempo a la mitad de la relajación del sarcómero (t 1/2); **C)** Amplitud del transitorio de Ca²⁺; **D)** Tiempo a la mitad de la caída del transitorio de Ca²⁺ (t 1/2). *p<0,05 vs control.

Como muestra la Figura 25, la aparición de arritmias inducidas por activación de Epac en ratones WT, disminuyó notablemente en los ratones Ser2814A. Mientras que el 8-CPT indujo arritmias en el 100% de los miocitos de ratones WT estudiados, sólo se observaron en el 28,6% de los miocitos provenientes de Ser2814A. La aparición de arritmias fue simultánea con el aumento del Ca²⁺ diastólico y la disminución de la longitud inicial del miocito (contractura). Estos resultados confirman la importancia de la fosforilación del RyR2 en el control de la pérdida espontánea de Ca²⁺ por el RS inducida por activación de Epac a alta [Ca²⁺]_o.

Figura 25. Estudio de la incidencia de eventos arritmogénicos en miocitos aislados de ratones WT y S2814A tratados con 8-CPT (10 μ M) y $[Ca^{+2}]_o$ 2,5 mM. **A)** Registro representativo de los transitorios de Ca^{+2} (F380/F340) y del acortamiento sarcomérico (μ m) de miocitos WT en ausencia y presencia de la droga. **B)** Registro representativo de los transitorios de Ca^{+2} y del acortamiento sarcomérico de miocitos S2814A en ausencia y presencia de la droga. **C)** Valores totales. * $p < 0,05$ vs control.

Isoformas de Epac en el miocardio: su distribución

Finalmente decidimos estudiar qué isoformas de Epac están presentes en el miocardio y si la activación de esta proteína conlleva a su redistribución entre compartimentos celulares.

Para resolver estos interrogantes analizamos la presencia de Epac1 y Epac2 en homogenatos y fracciones citosólicas y de membranas, provenientes de corazones perfundidos de rata en condiciones control o luego del tratamiento con 8-CPT. Como muestra la Figura 26, el miocardio expresa las dos isoformas de Epac con distinta distribución: Epac1 se encuentra principalmente en la fracción de membranas, mientras que Epac2 es más abundante en el citosol. Si bien la expresión total de Epac1 y Epac2 en homogenatos no se modificó con el tratamiento de 8-CPT, se produjo un aumento de Epac1 en la fracción de membrana, sin cambios en la distribución de Epac2. Estos resultados nos permiten sugerir que en nuestras condiciones experimentales, la translocación a membrana de la isoforma 1 es la involucrada en el manejo de Ca^{+2} por el RS y sus consecuencias funcionales.

Figura 26. A) Identificación de Epac1 y Epac2 en fracciones subcelulares en presencia y ausencia de 8-CPT. Na^+/K^+ ATPase y GAPDH se utilizaron como marcadores específicos de las fracciones de membrana y citosólica, respectivamente. **B)** Resultados totales de la presencia de Epac1 en homogenatos (expresión total) y en fracción de membranas. * $p < 0,05$ vs control.

CENTRO DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES

Facultad de Ciencias Médicas - UNLP

DISCUSIÓN

A fin de satisfacer las demandas circulatorias, el AEC cardíaco se halla constantemente modulado por un conjunto de mecanismos fisiológicos, siendo la estimulación β -adrenérgica uno de los más relevantes. Clásicamente durante muchos años, la señalización β -adrenérgica en el miocardio se explicó en términos de la activación de PKA y la consiguiente fosforilación de proteínas involucradas en la regulación del manejo del Ca^{+2} intracelular y la contractilidad, entre otras funciones (Bers, 2002). Sin embargo, el descubrimiento de las proteínas Epac (de Rooij y col., 1998; Kawasaki y col., 1998) amplió el abanico de blancos del AMPc en la vía de señalización β -adrenérgica. Así fue necesaria la revisión de esta cascada en distintos tejidos, y muchos mecanismos que se asumían dependientes de PKA, resultaron ser Epac dependientes (Gloerich y Bos, 2010).

Previo al hallazgo de las proteínas Epac, varios laboratorios habían demostrado la participación de CaMKII en la vía de señalización β -adrenérgica en el miocardio (Lindemann y Watanabe, 1985; Mundiña y col., 1996; Baltas y col., 1997; Kuschel y col., 1999; Said y col., 2002; Wang y col., 2004; Ferrero y col., 2007; Curran y col., 2007). Esta quinasa, que promueve la fosforilación de las mismas proteínas regulatorias fosforiladas por PKA pero en sitios distintos, resultó ser responsable de efectos tanto agudos como crónicos de la estimulación β -adrenérgica (Grimm y Brown, 2010). Por ser una quinasa dependiente de Ca^{+2} , la actividad de CaMKII se incrementa cuando aumenta el Ca^{+2} intracelular. La respuesta β -adrenérgica provoca un aumento del Ca^{+2} intracelular por mecanismos dependientes de PKA: aumento en la entrada de Ca^{+2} a la célula por fosforilación del LTCC y aumento en la liberación de Ca^{+2} por el RS como resultado de la fosforilación del RyR2 y del mayor contenido de Ca^{+2} mediado por la fosforilación de PLN. Sin embargo en estos últimos años, se

ha propuesto que la activación de CaMKII también podría ocurrir a través de Epac (Ruiz-Hurtado y col., 2013).

En este Trabajo de Tesis nos propusimos investigar cuáles son los efectos de la activación de Epac sobre el manejo del Ca^{+2} y la contractilidad y en qué medida está involucrada en estos efectos la activación de CaMKII por mecanismos independientes de PKA, poniendo especial énfasis en la fosforilación de las proteínas del RS, RyR2 y PLN. Para ello se realizaron experimentos empleando un análogo del AMPc específico para Epac, 8-CPT.

Pudimos demostrar que: 1) La activación de Epac produce diferentes efectos sobre la contractilidad y el manejo del Ca^{+2} intracelular de miocitos cardíacos, que no dependen de la especie sino de las condiciones experimentales, siendo la oferta de Ca^{+2} a la célula, una de las variables determinantes; 2) Los efectos de la estimulación de Epac son consecuencia de los cambios que esta proteína produce a nivel del RS, modulando tanto la retoma como la pérdida de Ca^{+2} por esta organela; 3) A altas $[\text{Ca}^{+2}]_o$, la estimulación de Epac conduce a alteraciones diastólicas y la aparición de arritmias; 4) La CaMKII es un componente esencial de la cascada río abajo de señalización de Epac; 5) La fosforilación por CaMKII de PLN determina el efecto inotrópico positivo de la estimulación de Epac a bajas $[\text{Ca}^{+2}]_o$ y la fosforilación por CaMKII del RyR2 es responsable de los efectos arritmogénicos de la estimulación de Epac a altas $[\text{Ca}^{+2}]_o$, hechos que se confirmaron a través del uso de ratones TG y 6) Si bien Epac1 y Epac2 están presentes en el miocardio, con localización preferencial en membranas y citosol respectivamente, sólo Epac1 altera su distribución en respuesta al agonista de las proteínas Epac, lo que sugiere la participación selectiva de esta isoforma en los efectos observados sobre el manejo del Ca^{+2} y la contractilidad miocárdica.

Epac en el manejo de Ca^{+2} y la contractilidad cardíaca

A partir de las primeras observaciones realizadas en células pancreáticas respecto a la participación de Epac en la regulación del Ca^{+2} intracelular (Kang y col., 2003), varios laboratorios demostraron que también en miocitos cardíacos, la activación de esta proteína era capaz de modificar la homeostasis del Ca^{+2} y en consecuencia la contractilidad cardíaca (Morel y col., 2005; Pereira y col., 2007; Oestreich y col., 2007; 2009; Hothi y col., 2008; Cazorla y col., 2009; Ruiz-Hurtado y col., 2012; Pereira y col., 2012). Como se planteó en la Introducción, los estudios sobre el efecto de Epac en el manejo del Ca^{+2} y la contractilidad condujeron a resultados diametralmente opuestos. Este Trabajo de Tesis fue inspirado en la necesidad de esclarecer estas discrepancias y establecer la relevancia de Epac en la función cardíaca. Nuestros resultados demuestran que la respuesta contráctil a la activación de Epac está condicionada por la $[\text{Ca}^{+2}]_o$ a la que se encuentran expuestas las células miocárdicas y es independiente de la especie.

A baja $[\text{Ca}^{+2}]_o$ el agonista de Epac, 8-CPT, produjo un efecto inotrópico positivo (aumento de la amplitud del transitorio de Ca^{+2} y del porcentaje de acortamiento sarcomérico) y un efecto relajante (aceleración de la caída del acortamiento y del transitorio de Ca^{+2}) tanto en miocitos de rata como de ratón (Figuras 14 y 15). El hecho de que estos efectos se acompañaran de un mayor contenido de Ca^{+2} del RS (Figura 16) sugirió un aumento en la captura de Ca^{+2} realizada por el complejo SERCA2a/PLN. Ciertamente las evidencias experimentales señalaron que la fosforilación de PLN en el sitio sustrato de CaMKII (Thr17), un mecanismo acelerador de la retoma, estaba incrementada (Figura 23). Nuestra hipótesis de que a baja $[\text{Ca}^{+2}]_o$ la fosforilación de PLN media los efectos de la estimulación de Epac pudo ser verificada con experimentos realizados en ratones transgénicos PLN-DM. En estos ratones, en los que la proteína PLN carece de sitios fosforilables, la estimulación de Epac no produjo ningún efecto significativo. Se demostró así, por primera vez, que el efecto inotrópico positivo

y relajante inducidos por la activación de Epac a baja $[Ca^{+2}]_o$, se debe al incremento en la retoma de Ca^{+2} hacia el RS, mediado por la fosforilación de PLN dependiente de CaMKII.

La estimulación de Epac produjo además en este grupo de experimentos, un aumento en la fosforilación de RyR2 en su sitio Ser2815 y en la frecuencia de liberaciones espontáneas de Ca^{+2} en miocitos quiescentes. ¿Por qué este aumento de la pérdida de Ca^{+2} no condujo a la descarga del RS? Consideramos que a baja $[Ca^{+2}]_o$ el efecto de la activación del complejo SERCA2a/PLN prevalece, modificando el balance entre retoma y pérdida de Ca^{+2} del RS en favor del primero. En este caso, el aumento de la liberación de Ca^{+2} no alcanza a provocar el vaciamiento del RS y parece ser consecuencia del mayor contenido de Ca^{+2} de la organela (Figura 27 A) (Györke y col., 2002).

Figura 27. Esquema representativo de los efectos de la estimulación de Epac sobre el manejo del Ca^{+2} y el contenido de Ca^{+2} del RS cuando se emplean: **A)** baja $[Ca^{+2}]_o$ y **B)** alta $[Ca^{+2}]_o$.

La situación fue distinta cuando los efectos de la activación de Epac se midieron en células expuestas a una $[Ca^{+2}]_o$ elevada. En este entorno, el miocito cardíaco exhibió un severo detrimento en la función contráctil luego de la activación de Epac (disminución en el transitorio de Ca^{+2} y el acortamiento sarcomérico) en asociación a una disminución de la carga de Ca^{+2} del RS luego de la exposición al 8-CPT (Figura 14 y 16). El menor contenido de Ca^{+2} del RS podría ser el resultado de una alteración en el flujo de Ca^{+2} a través del sarcolema, ya sea por disminución en la entrada a través del LTCC o aumento en la salida via NCX1. Sin embargo, datos aportados por otros laboratorios indican que si bien el tratamiento crónico con 8-CPT incrementa la I_{Ca} , la estimulación aguda de Epac no afecta esta corriente (Pereira y col., 2007; Oestreich y col., 2009; Ruiz-Hurtado y col., 2012). Por otra parte nuestros resultados excluyen una modificación de la actividad del NCX1 en respuesta a la exposición al 8-CPT ya que la constante de tiempo del decaimiento del transitorio de Ca^{+2} evocado por cafeína no cambió (Tabla 1). Es por ello que el siguiente paso fue analizar si la disminución de la carga del RS provocada por la estimulación de Epac podía ser explicada por una alteración del manejo de Ca^{+2} a nivel de la organela: disminución en la retoma y/o aumento importante de la pérdida. Cuando evaluamos la fosforilación de PLN encontramos que, lejos de estar disminuida, se hallaba notablemente aumentada (Figura 23). Por otra parte, el drástico aumento de la frecuencia de liberaciones espontáneas de Ca^{+2} (Figura 17), al grado de generar ondas propagadas (Figura 17A), el incremento en los niveles de Ca^{+2} diastólico (Figura 18) y la aparición de arritmias (Figura 20), todas expresiones funcionales de un RyR2 hiperactivo, sugirieron una alteración a nivel de la pérdida de Ca^{2+} por el RS en respuesta a la activación de Epac.

Tal como fue descripto en la Introducción, el incremento en la actividad del RyR2 puede ser el resultado de un mayor contenido de Ca^{+2} del RS y/o de un aumento en la sensibilidad al Ca^{+2} del canal (Györke y col., 2002; Venetucci y col., 2008). Aunque no podemos descartar que el

aumento de la fosforilación de PLN provocado por la estimulación de Epac a alta $[Ca^{+2}]_o$ (Figura 23) haya llevado inicialmente a un aumento de la carga Ca^{+2} del RS que por superar el umbral promovió la pérdida, el hecho de que las liberaciones espontáneas de Ca^{+2} se sostuvieran en el tiempo, aún incluso en condiciones de baja carga (Figura 16 y 17), indican una alteración intrínseca del RyR2 como responsable de estos eventos. Ha sido reiteradamente demostrado que la fosforilación del canal en el sitio específico para CaMKII es un mecanismo que aumenta su P_o y la pérdida diastólica de Ca^{+2} (Wehrens y col., 2004, Ai y col., 2005; Curran y col., 2007). La estimulación de Epac a alta $[Ca^{+2}]_o$ incrementó significativamente los niveles de fosforilación del RyR2, en su sitio específico para CaMKII (Figura 23) y su importancia como acontecimiento determinante en los efectos funcionales de Epac, pudo ser verificada con la utilización de un modelo de ratón TG, carente de este sitio: ratones S2814A. El tratamiento con 8-CPT, que provocaba eventos arrítmicos en el 100% de las células WT estudiadas, sólo promovió la aparición de arritmias en el 28,6% de los miocitos provenientes de S2814A (Figura 25). De estos resultados puede concluirse que cuando la célula se enfrenta a condiciones de $[Ca^{+2}]_o$ elevadas, la activación de Epac conduce a una alteración del balance entre retoma y pérdida de Ca^{+2} en favor de la pérdida, que es debida al control que sobre la misma ejerce la fosforilación del RyR2 dependiente de CaMKII. Esto conduce a consecuencias deletéreas sobre el manejo del Ca^{+2} , descarga de Ca^{+2} del RS, disminución de la contractilidad y generación de arritmias.

Una observación interesante fue que, en ausencia de la activación de Epac, el aumento de la $[Ca^{+2}]_o$ también incrementó en forma progresiva y significativa la frecuencia de chispas de Ca^{+2} y las fosforilaciones de PLN y RyR2 dependientes de CaMKII. El contenido de Ca^{+2} del RS que aumentó de 0,5 a 1 mM $[Ca^{+2}]_o$ no se modificó de 1 a 1,8 mM. Esto podría indicar una preponderancia del efecto funcional de la fosforilación de PLN en el primer caso, y un creciente rol de la fosforilación del RyR2, que impidió la ganancia de Ca^{+2} , en la segunda

situación. De lo dicho hasta aquí se desprende que, a medida que se incrementa la actividad de CaMKII, no importa cuál sea la vía de su activación, las fosforilaciones de sus sustratos adquieren distinta relevancia en el control del manejo de Ca^{+2} por el RS, siendo la fosforilación de PLN paulatinamente desplazada por la del RyR2.

Nuestros resultados respecto al rol diferencial de la estimulación de Epac a alta y baja $[\text{Ca}^{+2}]_o$ nos permiten explicar las discrepancias encontradas por los distintos investigadores. Así se podría comprender el hecho de que Oestreich y colaboradores (2007; 2009) utilizando miocitos de ratón a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 2 mM, situación de baja $[\text{Ca}^{+2}]_o$ cercana a 1,8 mM utilizada en nuestros experimentos, describieran un aumento del transitorio de Ca^{+2} en respuesta a la estimulación de Epac, en tanto que Pereira y colaboradores (2007; 2012) y Cazorla y colaboradores (2009) utilizando miocitos de rata a $[\text{Ca}^{+2}]_o$ 1,8 mM, situación de alta $[\text{Ca}^{+2}]_o$ en esta especie, encontraran una disminución del transitorio de Ca^{+2} . Sin embargo, aún queda por resolver la discrepancia entre nuestros resultados y los de Cazorla y colaboradores (2009) respecto a los efectos de la estimulación de Epac sobre sensibilidad de las proteínas contráctiles. Mientras que éstos investigadores describieron un aumento en la sensibilidad asociado a la fosforilación por CaMKII de TnI y MBPc (Cazorla y col., 2009), en nuestras condiciones experimentales no pudimos detectar tales cambios, siendo nulo el efecto del 8-CPT sobre el estado de fosforilación de MBPc (Figura 21C).

Los efectos arritmogénicos de la estimulación de Epac fueron descriptos por primera vez por Hothi y colaboradores (2008). Este grupo, midiendo potenciales de acción monofásicos en corazón perfundido de ratón, demostró que la activación de Epac provocaba taquicardias ventriculares sin cambios en la duración del potencial de acción y del gradiente transmural de repolarización, dos mecanismos fundamentales en el disparo de arritmias por trastornos en la conducción (Bers, 2001). Este hecho junto con la observación en miocitos aislados de un incremento en las liberaciones espontáneas de Ca^{+2} y una marcada tendencia a la aparición de

ondas que se suprimían con el inhibidor de CaMKII, KN-93, llevó a estos autores a proponer que las arritmias provocadas por estimulación de Epac se debían a una iniciación anormal del impulso eléctrico por posdespolarización (arritmias gatilladas, DADs). Los experimentos de este Trabajo de Tesis confirmaron estos hallazgos y permitieron avanzar en el conocimiento de las consecuencias funcionales de la estimulación de Epac al comprobar de manera inequívoca en miocitos, que el mecanismo que participa en los eventos arritmogénicos de esta proteína activada por AMPc, es la fosforilación por CaMKII del RyR2.

Evidencias experimentales indican que la activación de Epac modula la función de varios canales y proteínas que podrían ser potencialmente arritmogénicos, aunque esto en el tejido cardíaco ha sido poco estudiado. Epac regula los canales de Na^+ sensibles a amiloride en pulmón (Helms y col., 2006), canales de Ca^{+2} tipo T en células cromafines (Novara y col., 2004), canales de K^+ modulados por ATP en células pancreáticas y vasculares (Kang y col., 2006; Purves y col., 2009), canales neuronales de K^+ dependientes de Ca^{+2} , canales de Ca^{+2} operados por vaciamiento de depósito y canales de Cl^- activados por hinchamiento hepáticos (Aromataris y col., 2006). Ninguna de las corrientes a través de los canales mencionados es relevante en la electrofisiología del músculo cardíaco, pero no podemos descartar que en circunstancias fisiopatológicas en las que adquieren mayor importancia (isquemia, shock hipotónico), contribuyan a los efectos arritmogénicos de la activación de Epac. Las corrientes que sí podrían ser relevantes en la generación de arritmias y que se ha demostrado son blanco de Epac en el músculo cardíaco, son la I_{Na} y la corriente de K^+ , I_{Ks} . Experimentos recientes demostraron que la estimulación de Epac provoca modificaciones CaMKII dependientes de la I_{Na} (Dybкова y col., 2014). La fosforilación por esta quinasa del canal de Na^+ voltaje operado, provoca una modificación en su cinética que prolonga el potencial de acción, lo que podría favorecer la entrada de Ca^{+2} a través del LTCC y la aparición de arritmias por EADs. Por otra parte, la estimulación de Epac deprime la I_{Ks} que al enlentecer la repolarización también se

constituye en un mecanismo proarritmogénico (Brette y col., 2013; Aflaki y col., 2014). Finalmente se ha visto que Epac regula tanto la actividad de la conexina 43 en las uniones gap como la síntesis de colágeno que lleva a la fibrosis y el remodelamiento cardíaco a través de su interacción con la pequeña proteína, rac1. Esto también podría promover arritmias debidas a trastornos en la conducción del impulso (Duquesnes y col., 2010; Reil y col., 2010).

Teniendo en cuenta el conjunto de los resultados disponibles, es posible que la activación de Epac provoque alteraciones del AEC tanto a nivel eléctrico como en el manejo de Ca^{+2} que puedan confluir en la generación de arritmias. Si bien nuestros experimentos en miocitos aislados indican que las arritmias inducidas por activación de Epac son gatilladas a nivel celular y resultan de la pérdida de Ca^{+2} por el RS debida a la fosforilación del RyR2 por la CaMKII, serán necesarios estudios electrofisiológicos a nivel de miocitos y de corazón entero, para determinar en qué medida colaboran los distintos mecanismos a la arritmogénesis inducida por Epac.

Vías de señalización de Epac

Hasta el momento, la cascada de señalización de Epac que lleva a la regulación del AEC no se conoce con precisión. Oestreich y colaboradores demostraron que las modificaciones del transitorio de Ca^{+2} provocadas por estimulación de Epac no ocurrían en cardiomiocitos provenientes de ratones knock out (KO) de PLC ϵ y eran inhibidas por KN-93, lo que indicaba que tanto PLC ϵ como CaMKII eran esenciales en la respuesta a Epac (Oestreich y col., 2007; 2009). Más tarde, Pereira y colaboradores (2012) establecieron que CaMKII es un componente río abajo de la activación de PLC al observar que la fosforilación del RyR2 en el sitio Ser2815 inducida por Epac en cardiomiocitos de rata, se prevenía en presencia de un inhibidor específico de PLC. Pero la controversia surge respecto al mecanismo que lleva a la activación de CaMKII. Como es sabido, la acción de la PLC promueve la hidrólisis del PIP₂ para producir

IP₃ y DAG. Pereira y colaboradores (2012) sostienen que la liberación de Ca⁺² inducida por IP₃ activa a la CaMKII responsable del aumento de los niveles de Ca⁺² diastólico en cardiomiocitos de rata provocada por la exposición a 8-CPT. Dado que los receptores de IP₃ son mucho más abundantes en la membrana nuclear de miocitos ventriculares adultos que en el RS, donde predominan los RyR2, la activación de CaMKII dependiente de IP₃ podría estar fundamentalmente asociada a la regulación de la transcripción génica que ocurre durante la estimulación sostenida de Epac (Morel y col., 2005; Métrich y col., 2008; Pereira y col., 2012). Por otra parte, Oestreich y colaboradores (2007; 2009) y los presentes resultados indican que los cambios agudos en el manejo del Ca⁺² en respuesta a la estimulación de Epac, dependen de la activación de CaMKII por PKC. Nuestros resultados confirman que PKC se halla río arriba respecto a CaMKII ya que la inhibición de PKC anuló: a) el aumento de la autofosforilación de CaMKII, b) la fosforilación de sus sustratos Thr17-PLN y Ser2815-RyR2 y c) el incremento del Ca⁺² diastólico producidos por 8-CPT (Figura 21 A y B). Hasta el momento se desconoce el mecanismo molecular a través del cual PKC aumenta la actividad de CaMKII.

Isoformas de Epac y su activación en músculo cardíaco

Nuestro último objetivo fue determinar qué isoforma de Epac (Epac1 vs Epac2) está involucrada en los efectos inducidos por el 8-CPT sobre la homeostasis del Ca⁺² y la contractilidad cardíaca y si la activación de Epac implica su translocación a fracciones de membrana.

El rol específico de las isoformas de Epac en la función y patogénesis cardíaca sigue siendo tema de debate. El uso de distintas herramientas experimentales como la transfección adenoviral de una forma constitutivamente activa de Epac1 humana en miocitos aislados de rata adulta (Cazorla y col., 2009) o el silenciamiento de esta isoforma por la utilización de RNA de interferencia (siRNA) en miocitos de la misma especie (Ruiz-Hurtado y col., 2012)

apuntaban a Epac1, la variante más abundante en el miocardio, como la isoforma relevante en el manejo del Ca^{+2} y la regulación de la contractilidad. El advenimiento de los ratones TG de las isoformas de Epac pudo haber sido una herramienta categórica para definir la isoforma de mayor peso funcional en el corazón. Sin embargo los resultados obtenidos por distintos grupos de investigación al estudiar ratones carentes de Epac1 y Epac2 (Epac1KO y Epac2KO) siguen siendo contradictorios. Pereira y colaboradores (2013) demostraron que el aumento en la liberación espontánea de Ca^{+2} y la disminución del contenido de Ca^{+2} del RS inducidos por 8-CPT, se abolían tanto en los ratones Epac2KO como en ratones en los que se anularon simultáneamente la expresión de Epac1 y Epac2 (DKO), pero no en los Epac1KO. En concordancia con la menor pérdida, los ratones Epac2KO mostraron ser menos susceptibles a la aparición de arritmias. Por otra parte Okumura y colaboradores (2014) encontraron que los Epac1KO y no los Epac2KO, eran más resistentes a la disfunción contráctil y la arritmogénesis en respuesta a distintas situaciones de estrés. La discrepancia de los resultados encontrados por los dos grupos podría radicar en diferencias en la manipulación de la carga genética y/o en las condiciones ambientales. Por lo tanto consideramos que el estudio de la redistribución espacial y activación compartimentalizada de las isoformas Epac, podría constituirse en un indicador crítico de su implicancia en los cambios funcionales. Al respecto, se demostró recientemente que la modificación de la corriente lenta de Na^{+} en respuesta a 8-CPT en cardiomiocitos de ratón, requiere de la integridad del citoesqueleto, sugiriendo que Epac necesita translocarse al sarcolema para su activación (Dybko y col., 2014).

Como ya vimos en la Introducción tanto Epac1 como Epac2 contienen un dominio que permite la unión de estas proteínas a la membrana plasmática (dominio DEP) y en consecuencia condiciona espacialmente la activación de la proteína Rap1 asociada a membrana. En el caso de Epac1, este direccionamiento ocurre como consecuencia del cambio conformacional inducido por la unión del AMPc. Así el AMPc ejerce una regulación dual sobre Epac1

controlando tanto su actividad de factor de intercambio de nucleótidos de guanina como su unión a la membrana plasmática (Ponsioen y col., 2009). En cambio, Epac2 unida (Li y col., 2006) o no al AMPc (Liu y col., 2008), requiere la asociación previa de proteínas Ras activadas a su dominio RA, para dirigirse a membrana. Por lo tanto la activación de Epac1 y su translocación a membrana, puede ocurrir en respuesta a agonistas que, actuando a través de un receptor acoplado a proteína Gs, aumenten el AMPc. Mientras que la activación y translocación a membrana de Epac2 parece requerir además la participación de agonistas que actuando sobre receptores tirosina quinasa pongan en marcha el sistema las proteínas Ras (Li y col., 2006).

Si bien la translocación de Epac1 a membrana plasmática en respuesta a distintas intervenciones fue observada en diversas líneas celulares (Ponsioen y col., 2009), hasta el momento no había sido estudiada en el corazón entero. Nuestros resultados mostraron por primera vez que la activación farmacológica de Epac con 8-CPT, un agonista que no discrimina entre isoformas, está asociada con un aumento en la cantidad de Epac1 en la fracción de membrana sin cambios en su expresión total (Figura 26). Epac2, por otro lado, no modificó su distribución en respuesta a 8-CPT. Estos resultados sugieren entonces que los efectos sobre el manejo del Ca^{+2} y la regulación de la contractilidad en el músculo cardíaco en respuesta a 8-CPT, son mediados por la activación y translocación de Epac1. Por otra parte, nuestros hallazgos concuerdan con el hecho de que la unión del AMPc a Epac2 no es suficiente para promover su traslado a membranas y que se requiere de un mecanismo adicional como la descrita activación de proteínas Ras (Li y col., 2006; Liu y col., 2008).

Conclusiones

Según los resultados obtenidos en el desarrollo de este Trabajo de Tesis podemos inferir que los efectos relacionados a la activación de Epac a través de la vía de señalización Epac/PKC/CaMKII, estarían fuertemente condicionados por los niveles de Ca^{+2} a los que la célula miocárdica se enfrente. A baja $[\text{Ca}^{+2}]_o$, observamos un efecto inotrópico positivo asociado a una mayor carga del RS, mientras que a alta $[\text{Ca}^{+2}]_o$, detectamos un detrimento en la función contráctil y arritmias que pueden explicarse por el aumento en la frecuencia de liberaciones espontáneas de Ca^{+2} y consecuente vaciamiento del RS. Modificaciones en el balance entre retoma/pérdida del RS subyacen a estos cambios. A medida que aumenta la $[\text{Ca}^{+2}]_o$, se incrementa la actividad de CaMKII y las fosforilaciones de sus sustratos adquieren distinta relevancia en el control del manejo de Ca^{+2} por el RS, siendo la fosforilación de PLN (estimulación de la retoma) paulatinamente desplazada por la fosforilación del RyR2 (facilitación de la pérdida).

La modificación del $[\text{Ca}^{+2}]_o$, maniobra que se utilizó en este Trabajo de Tesis para alterar la llegada de Ca^{+2} al miocito, no es un mecanismo fisiológico del control de la homeostasis del Ca^{+2} intracelular y la contractilidad del miocardio. Sin embargo, la relevancia de nuestros hallazgos radica en que las conclusiones obtenidas podrían trasladarse a los efectos de la estimulación simpática a través de los receptores β -adrenérgicos, mecanismo fundamental en el control del inotropismo. Durante la estimulación β -adrenérgica no sólo aumentan los niveles de AMPc, necesarios para activar a Epac, sino también la entrada de Ca^{+2} a la célula, que es mayor a medida que se intensifica el grado de estimulación de los receptores β . Entonces, la estimulación de Epac podría estar involucrada tanto en los efectos beneficiosos (aumentos de la contractilidad y relajación) como deletéreos (arritmias e insuficiencia cardíaca) que resultan de la estimulación β -adrenérgica. El importante hallazgo de este Trabajo de Tesis de mostrar por primera vez que la translocación de Epac1 a membranas está asociada a los efectos sobre el

manejo del Ca^{+2} y la contractilidad, brinda la posibilidad de utilizar la redistribución espacial en compartimientos subcelulares de las isoformas de Epac, como un indicador de su activación en respuesta a distintos agonistas que aumenten el AMPc. Estudios en curso de nuestro laboratorio intentan profundizar el conocimiento de la participación de Epac durante la estimulación β -adrenérgica.

CENTRO DE INVESTIGACIONES CARDIOVASCULARES

Facultad de Ciencias Médicas - UNLP

BIBLIOGRAFÍA

- Aflaki M, Qi XY, Xiao L, Ordog B, Tadevosyan A, Luo X, Maguy A, Shi Y, Tardif JC, Nattel S. Exchange protein directly activated by cAMP mediates slow delayed-rectifier current remodeling by sustained β -adrenergic activation in guinea pig hearts. *Circ Res* **2014**; 114:993-1003.
- Ai X, Curran JW, Shannon TR, Bers DM, Pogwizd SM. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak in heart failure. *Circ Res* **2005**; 97:1314-1322.
- Aitken A, Bilham T, Cohen P. Complete primary structure of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* **1982**; 126:235-246.
- Algenstaedt P, Antonetti DA, Yaffe MB, Kahn CR. Insulin receptor substrate proteins create a link between the tyrosine phosphorylation cascade and the Ca^{2+} -ATPases in muscle and heart. *J Biol Chem* **1997**; 272:23696-23702.
- Anthony DF, Beattie J, Paul A, Currie S. Interaction of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ C with sorcin indirectly modulates ryanodine receptor function in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **2007**; 43:492–503.
- Aromataris EC, Roberts ML, Barritt GJ, Rychkov GY. Glucagon activates Ca^{2+} and Cl^- channels in rat hepatocytes. *J Physiol* **2006**; 573:611-625.
- Asahi M, Otsu K, Nakayama H, Hikoso S, Takeda T, Gramolini AO, Trivieri MG, Oudit GY, Morita T, Kusakari Y, Hirano S, Hongo K, Hirotsu S, Yamaguchi O, Peterson A, Backx PH, Kurihara S, Hori M, MacLennan DH. Cardiac-specific overexpression of sarcolipin inhibits sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2a) activity and impairs cardiac function in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**; 101:9199–9204.
- Babu GJ, Zheng Z, Natarajan P, Wheeler D, Janssen PM, Periasamy M. Overexpression of sarcolipin decreases myocyte contractility and calcium transient. *Cardiovasc Res* **2005**; 65:177–86.
- Babu GJ, Bhupathy P, Petrashevskaya NN, Wang H, Raman S, Wheeler D, Jagatheesan G, Wiecek D, Schwartz A, Janssen PM, Ziolo MT, Periasamy M. Targeted overexpression of sarcolipin in the mouse heart decreases sarcoplasmic reticulum calcium transport and cardiac contractility. *J Biol Chem* **2006**; 281:3972–3979.
- Baltas LG, Karczewski P, Bartel S, Krause EG. The endogenous cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} /calmodulin dependent kinase is activated in response to beta-adrenergic stimulation and becomes Ca^{2+} -independent in intact beating hearts. *FEBS Lett* **1997**; 409:131-136.
- Bare DJ, Kettlun CS, Liang SM, Bers DM, Mignery GA. Cardiac type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: interaction and modulation by CaM kinase II. *J Biol Chem* **2005**; 280:15912-15920.
- Barford D, Das AK, Egloff MP. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **1998**; 27:133-164.
- Bassani R, Bassani JW, Bers DM. Mitochondrial and sarcolemmal Ca^{2+} transport reduce Ca^{2+} during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol* **1992**; 453:591-608.

Bers DM, Stiffel VM. Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. *Am J Physiol* **1993**; 264:C1587-1593.

Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers **2001**.

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **2002**; 415:198-205.

Bers D M. Macromolecular complexes regulating cardiac ryanodine receptor function. *J Mol Cell Cardiol* **2004**; 37:417-429.

Bogoyevitch MA, Parker PJ, Sugden PH. Characterization of protein kinase C isotype expression in adult rat heart. Protein kinase C-epsilon is a major isotype present, and it is activated by phorbol esters, epinephrine, and endothelin. *Circ Res* **1993**; 72:757-767.

Breckler M, Berthouze M, Laurent AC, Crozatier B, Morel E, Lezoualc'h F. Rap-linked cAMP signaling Epac proteins: compartmentation, functioning and disease implications. *Cell Signal* **2011**; 23:1257-1266.

Brette F, Blandin E, Simard C, Guinamard R, Sallé L. Epac activator critically regulates action potential duration by decreasing potassium current in rat adult ventricle. *J Mol Cell Cardiol* **2013**; 57:96-105.

Brodde OE. β -Adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol Ther* **1993**; 60:405-430.

Cain BS, Medlum DR, Joo KS, Wang JF, Meng X, Cleland JC Jr, Banerjee A, Harken AH. Human SERCA2a levels correlate inversely with age in senescent human myocardium. *J Am Coll Cardiol* **1998**; 32:458-467.

Campbell KP, MacLennan DH, Jorgensen AO, Mintzner MC. Purification and characterization of calsequestrin from canine cardiac sarcoplasmic reticulum and identification of the 53,000 Dalton glycoprotein. *J Biol Chem* **1983**; 258:1197-1204.

Cantilina T, Sagara Y, Inesi G, Jones LR. Comparative studies of cardiac and skeletal sarcoplasmic reticulum ATPases. Effect of a phospholamban antibody on enzyme activation by Ca^{2+} . *J Biol Chem* **1993**; 268:17018-17025.

Caswell AH, Brandt NR, Brunschwig JP, Purkerson S. Localization and partial characterization of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95,000 protein (triadin) which binds the ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadic vesicles. *Biochemistry* **1991**; 30:7507-7513.

Cazorla O, Lucas A, Poirier F, Lacampagne A, Lezoualc'h F. The cAMP binding protein Epac regulates cardiac myofilament function. *Proc Natl Acad Sci USA* **2009**; 106:14144-14149.

Chen F, Ding S, Lee BS, Wetzel GT. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and cell contraction in developing rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* **2000**; 32:745-755.

Chen Z, Stokes DL, Rice WJ, Jones LR. Spatial and dynamic interactions between phospholamban and the canine cardiac Ca^{2+} pump revealed with use of heterobifunctional cross-linking agents. *J Biol Chem* **2003**; 278:48348-48356.

Chen X, Zhang X, Kubo H, Harris DM, Mills GD, Moyer J, Berretta R, Potts ST, Marsh JD, Houser SR. Ca^{2+} influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes. *Circ Res* **2005**; 97:1009-1017.

Chen H, Wild C, Zhou X, Ye N, Cheng X, Zhou J. Recent advances in the discovery of small molecules targeting exchange proteins directly activated by cAMP (EPAC). *J Med Chem* **2014**; 57:3651-3665.

Cheng H, Lederer WJ, Cannell MB. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science* **1993**; 262:740-744.

Cohen PT. Protein phosphatase 1-targeted in many directions. *J Cell Sci* **2002**; 115:241-56.

Colbran RJ. Inactivation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II by basal autophosphorylation. *J Biol Chem* **1993**; 268:7163-7170.

Copello JA, Barg S, Onoue H, Fleischer S. Heterogeneity of Ca^{2+} gating of skeletal muscle and cardiac ryanodine receptors. *Biophys J* **1997**; 73:141-156.

Courilleau D, Bissierier M, Jullian JC, Lucas A, Bouyssou P, Fischmeister R, Blondeau JP, Lezoualc'h F. Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac. *J Biol Chem* **2012**; 287:44192-44202.

Courilleau D, Bouyssou P, Fischmeister R, Lezoualc'h F, Blondeau JP. The (R)-enantiomer of CE3F4 is a preferential inhibitor of human exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1 (Epac1). *Biochem Biophys Res Commun* **2013**; 440:443-448.

Curran J, Hinton MJ, Rios E, Bers DM, Shannon TR. Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res* **2007**; 100:391-398.

Cutler MJ, Plummer BN, Wan X, Sun QA, Hess D, Liu H, Deschenes I, Rosenbaum DS, Stamler JS, Laurita KR. Aberrant S-nitrosylation mediates calcium-triggered ventricular arrhythmia in the intact heart. *Proc Natl Acad Sci USA* **2012**; 109:18186-18191.

Dao KK, Teigen K, Kopperud R, Hodneland E, Schwede F, Christensen AE, Martinez A, Doskeland SO. Epac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition. *J Biol Chem* **2006**; 281:21500-21511.

Depaoli-Roach AA, Park IK, Cerovsky V, Csontos C, Durbin SD, Kuntz MJ, Sitikov A, Tang PM, Verin A, Zolnierowicz S. Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function. *Adv Enzyme Regul* **1994**; 34:199-224.

de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* **1998**; 396:474-477.

De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **2011**; 476:336-340.

DiPilato LM, Cheng X, Zhang J. Fluorescent indicators of cAMP and Epac activation reveal differential dynamics of cAMP signaling within discrete subcellular compartments. *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**; 101:16513-16518.

Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, Michel CJJ, Langeberg LK, Kapiloff MS, Scott JD. The protein kinase A anchoring protein mAKAP co-ordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* **2005**; 437: 574-578.

Drago GA, Colyer J. Discrimination between two sites of phosphorylation on adjacent amino acids by phosphorylation site-specific antibodies to phospholamban. *J Biol Chem* **1994**; 269:25073-25077.

duBell WH, Lederer WJ, Rogers TB. Dynamic modulation of excitation-contraction coupling by protein phosphatases in rat ventricular myocytes. *J Physiol* **1996**; 493:793-800.

Duquesnes N, Derangeon M, Métrich M, Lucas A, Mateo P, Li L, Morel E, Lezoualc'h F, Crozatier B. Epac stimulation induces rapid increases in connexin43 phosphorylation and function without preconditioning effect. *Pflügers Arch* **2010**; 460:731-741.

Dybкова N, Wagner S, Backs J, Hund TJ, Mohler PJ, Sowa T, Nikolaev VO, Maier LS. Tubulin polymerization disrupts cardiac β -adrenergic regulation of late I_{Na} . *Cardiovasc Res* **2014**; 103:168-177.

Ebashi S. Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. *J Biochem* **1961**; 50:236-244.

Ebashi S, Lipmann F. Adenosine triphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle. *J Cell Biol* **1962**; 14:389-400.

Edes I, Kranias EG. Phospholamban and troponin I are substrates for protein kinase C in vitro but not in intact beating guinea pig hearts. *Circ Res* **1990**; 67:394-400.

Edman CF, Schulman H. Identification and characterization of δ B-CaM kinase and δ C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim Biophys Acta* **1994**; 1221:89-101.

El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didié M, Dobrev D, Eschenhagen T. Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **2006**; 346:700-706.

Endoh M, Blinks JR. Actions of sympathomimetic amines on the Ca^{2+} transients and contractions of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to Ca^{2+} mediated through alpha- and beta-adrenoceptors. *Circ Res* **1988**; 62:247-265.

Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, van Triest M, Schwede F, Genieser HG, Doskeland SO, Blank JL, Bos JL. A novel Epac specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol* **2002**; 4:901-906.

Erickson JR, Joiner MA, Guan X, Kutschke W, Yang J, Oddis CV, Bartlett RK, Lowe JS, O'Donnell SE, Aykin-Burns N, Zimmerman MC, Zimmerman K, Ham AL, Weiss RM, Spitz DR, Shea MA, Colbran RJ, Mohler PJ, Anderson ME. A dynamic pathway for calcium-independent activation of CaMKII by methionine oxidation. *Cell* **2008**; 133:462-474.

Fabiato A, Fabiato F. Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res* 1977; 40:119-29.

Farrell EF, Antaramian A, Rueda A, Gómez AM, Valdivia HH. Sorcin inhibits calcium release and modulates excitation-contraction coupling in the heart. *J Biol Chem* **2003**; 278:34660-34666.

Ferguson SS, Downey WE 3rd, Colapietro AM, Barak LS, Ménard L, Caron MG. Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science* **1996**; 271:363-366.

- Ferrero P, Said M, Sanchez G, Vittone L, Valverde C, Donoso P, Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C. Ca^{2+} -kinase II increases ryanodine binding and Ca^{2+} -induced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release kinetics during beta-adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol* **2007**; 43:281-291.
- Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Reviews* **2002**; 82:893-922.
- Franzini-Armstrong C, Protasi F, RameshV. Shape, size, and distribution of Ca^{2+} release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys J* **1999**; 77:1528-39.
- Froehlich JP, Mahaney JE, Keceli G, Pavlos CM, Goldstein R, Redwood AJ, Sumbilla C, Lee DI, Tocchetti CG, Kass DA, Paolocci N, Toscano JP. Phospholamban thiols play a central role in activation of the cardiac muscle sarcoplasmic reticulum calcium pump by nitroxyl. *Biochemistry* **2008**; 47:13150-13152.
- Gloerich M, Bos JL. Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2010**; 50:355-375.
- Gombosova I, Boknik P, Kirchhefer U, Knapp J, Luss H, Muller FU, Muller T, Vahlensieck U, Schmitz W, Bodor GS, Neumann J. Postnatal changes in contractile time parameters, calcium regulatory proteins, and phosphatases. *Am J Physiol* **1998**; 274:H2123-H2132.
- Grandoch M, Roscioni SS, Schmidt M. The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function. *British J Pharmacol* **2010**; 159:265-284.
- Grimm M, Brown JH. Beta-adrenergic receptor signaling in the heart: role of CaMKII. *J Mol Cell Cardiol* **2010**; 48:322-330.
- Guo T, Zhang T, Mestral R, Bers DM. Ca^{2+} /Calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation of ryanodine receptor does affect calcium sparks in mouse ventricular myocytes. *Circ Res* **2006**; 99:398-406.
- Gupta RC, Khandelwal RL, Sulakhe PV. Resolution of bovine brain calcineurin subunits: stimulatory effect of subunit B on subunit A phosphatase activity. *FEBS Lett* **1985**; 190:104-108.
- Györke I, Györke S. Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca^{2+} involves luminal Ca^{2+} sensing sites. *Biophys J* **1998**; 75:2801-2810.
- Györke S, Györke I, Lukyanenko V, Terentyev D, Viatchenko-Karpinski S, Wiesner TF. Regulation of sarcoplasmic reticulum calcium release by luminal calcium in cardiac muscle. *Front Biosci* **2002**; 7:1454-1463.
- Györke I, Hester N, Jones LR, Györke S. The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys J* **2004**; 86:2121-2128.
- Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Imoto K. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. *FEBS Lett* **1992**; 312:229-235.
- Hasselbach W, Makinose M. The calcium pump of the “relaxing granules” of the muscle and its dependence on ATP-splitting. *Biochem Z* **1961**; 333:518-528.
- Heijman J, Dewenter M, El-Armouche A, Dobrev D. Function and regulation of serine/threonine phosphatases in the healthy and diseased heart. *J Mol Cell Cardiol* **2013**; 64:90-98.

- Helms MN, Chen XJ, Ramosevac S, Eaton DC, Jain L. Dopamine regulation of amiloride-sensitive sodium channels in lung cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2006**; 290:L710-L722.
- Herzig S, Neumann J. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* **2000**; 80:173-210.
- Hoelz A, Nairn AC, Kuriyan J. Crystal structure of a tetradecameric assembly of the association domain of Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II. *Mol Cell* **2003**; 11:1241-1251.
- Hofmann F, Bechtel PJ, Krebs EG. Concentrations of cyclic AMP-dependent protein kinase subunits in various tissues. *J Biol Chem* **1977**; 252:1441-1447.
- Hothi SS, Gurung IS, Heathcote JC, Zhang Y, Booth SW, Skepper JN, Grace AA, Huang CL. Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart. *Pflugers Arch* **2008**; 457:253-270.
- Huang KX, Paudel HK. Ser67-phosphorylated inhibitor 1 is a potent protein phosphatase 1 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* **2000**; 97:5824-5829.
- Hudmon A, Schulman H. Structure–function of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* **2002**; 364: 593-611.
- Huke S, Bers DM. Ryanodine receptor phosphorylation at Serine 2030, 2808 and 2814 in rat cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**; 376:80-85.
- Ishida A, Shigeri Y, Taniguchi T, Kameshita I. Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology. *Pharmacol Ther* **2003**; 100:291-305.
- Jiang D, Xiao B, Yang D, Wang R, Choi P, Zhang L, Cheng H, Chen SR. RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca^{2+} release (SOICR). *Proc Natl Acad Sci USA* **2004**; 101:13062-13067.
- Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO, Kelley J. Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26-kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **1995**; 270:30787-30796.
- Jorgensen AO, Jones LR. Immunoelectron microscopical localization of phospholamban in adult canine ventricular muscle. *J Cell Biol* **1987**; 104:1343-1352.
- Kamp TJ, Hell JW. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res* **2000**; 87:1095-1102.
- Kang G, Joseph JW, Chepurny OG, Monaco M, Wheeler MB, Bos JL, Schwede F, Genieser HG, Holz GG. Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a stimulus for Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **2003**; 278:8279-8285.
- Kang G, Chepurny OG, Malester B, Rindler MJ, Rehmann H, Bos JL, Schwede F, Coetzee WA, Holz GG. cAMP sensor Epac as a determinant of ATP-sensitive potassium channel activity in human pancreatic beta cells and rat INS-1 cells. *J Physiol* **2006**; 573:595-609.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* **1998**; 282:2275-2279.

- Kentish JC, McCloskey DT, Layland J, Palmer S, Leiden JM, Martin AF, Solaro RJ. Phosphorylation of troponin I by protein kinase A accelerates relaxation and crossbridge cycle kinetics in mouse ventricular muscle. *Circ Res* **2001**; 88:1059-1065.
- Kielley WW, Meyerhof O. A new magnesium-activated adenosinetriphosphatase from muscle. *J Biol Chem* **1948**; 174:387-388.
- Kim E, Shin DW, Hong CS, Jeong D, Kim do H, Park WJ. Increased Ca^{2+} storage capacity in the sarcoplasmic reticulum by overexpression of HRC (histidine-rich Ca^{2+} binding protein). *Biochem Biophys Res Commun* **2003**; 300:192-196.
- Kirchberger MA, Tada M, Katz AM. Adenosine 3':5' monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **1974**; 249:6166-6173.
- Kirchhefer U, Baba HA, Boknik P, Breeden KM, Mavila N, Brüchert N, Justus I, Matus M, Schmitz W, Depaoli-Roach AA, Neumann J. Enhanced cardiac function in mice overexpressing protein phosphatase Inhibitor-2. *Cardiovasc Res* **2005**; 68:98-108.
- Klee CB. Concerted regulation of protein phosphorylation and dephosphorylation by calmodulin. *Neurochem Res* **1991**; 16:1059-1065.
- Kobayashi YM, Jones LR. Identification of triadin 1 as the predominant triadin isoform expressed in mammalian myocardium. *J Biol Chem* **1999**; 274:28660-28668.
- Kobayashi YM, Alseikhan BA, Jones LR. Localization and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence for a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J Biol Chem* **2000**; 275:17639-17646.
- Kolodziej SJ, Hudmon A, Waxham MN, Stoops JK. Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase II α and truncated CaM kinase II α reveal a unique organization for its structural core and functional domains. *J Biol Chem* **2000**; 275:14354-14359.
- Kuschel M, Karczewski P, Hempel P, Schlegel WP, Krause EG, Bartel S. Ser16 prevails over Thr17 phospholamban phosphorylation in the beta-adrenergic regulation of cardiac relaxation. *Am J Physiol* **1999**; 276:H1625-633.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of acteriphage T4. *Nature* **1970**; 227: 680-685.
- Lefkowitz RJ. G protein-coupled receptor kinases. *Cell* **1993**; 74:409-412.
- Li L, Satoh H, Ginsburg KS, Bers DM. The effect of Ca-calmodulin dependent protein kinase II on cardiac excitation-contraction coupling in ferret ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* **1997**; 501:17-32.
- Li Y, Kranias EG, Mignery GA, Bers DM. Protein kinaseA phosphorylation of the ryanodine receptor does not affect Ca sparks in permeabilized mouse ventricular myocytes. *Circ Res* **2002**; 90:309-316.
- Li Y, Asuri S, Rebhun JF, Castro AF, Parnavitana NC, Quilliam LA. The RAP1 guanine nucleotide exchange factor Epac2 couples cyclic AMP and Ras signals at the plasma membrane. *J Biol Chem* **2006**; 281:2506-2514.

- Lindemann JP, Watanabe AM. Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca^{2+} -calmodulin-dependent mechanisms. *J Biol Chem* **1985**; 260:4516-4525.
- Liu C, Takahashi M, Li Y, Song S, Dillon TJ, Shinde U, Stork P. Ras is required for the cyclic AMP-dependent activation of Rap1 via Epac2. *Mol Cell Biol* **2008**; 28:7109-7125.
- Liu Y, Porta M, Qin J, Ramos J, Nani A, Shannon TR, Fill M. Flux regulation of cardiac ryanodine receptor channels. *J Gen Physiol* **2010**; 135:15-27.
- Lopez-Lopez JR, Shacklock PS, Balke CW, Wier WG. Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells. *Science* **1995**; 268:1042-1045.
- Luss I, Boknik P, Jones LR, Kirchhefer U, Knapp J, Linck B, Luss H, Meissner A, Muller FR, Schmitz W, Vahlensieck U, Neumann J. Expression of cardiac calcium regulatory proteins in atrium vs ventricle in different species. *J Mol Cell Cardiol* **1999**; 31:1299-1314.
- MacDougall LK, Jones LR, Cohen P. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* **1991**; 196:725-734.
- Mackay K, Mochly-Rosen D. Localization, anchoring, and functions of protein kinase C isozymes in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **2001**; 33:1301-1307.
- MacLennan DH, Wong PT. Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* **1971**; 68:1231-1235.
- MacLennan DH, Rice WJ, Green NM. The mechanism of Ca^{2+} transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *J Biol Chem* **1997**; 272:28815-28818.
- Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII δ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte handling: reduced SR Ca^{2+} load and activated SR Ca^{2+} release. *Circ Res* **2003**; 92:904-911.
- Maier LS, Ziolo MT, Bossuyt J, Persechini A, Mestral R, Bers DM. Dynamic changes in free Ca-calmodulin levels in adult cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **2006**; 41:451-458.
- Maier LS, Bers DM. Role of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) in excitation-contraction coupling in the heart. *Cardiovasc Res* **2007**; 73:631-640.
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): Defective regulation in failing hearts. *Cell* **2000**; 101:365-376.
- Marx SO, Gaburjakova J, Gaburjakova M, Henrikson C, Ondrias K, Marks A. Coupled gating between cardiac calcium release channels (Ryanodine receptors). *Circ Res* **2001**; 88:1151-1158.
- Matsumoto T, Hisamatsu Y, Ohkusa T, Inoue N, Sato T, Suzuki S, Ikeda Y, Matsuzaki M. Sorcin interacts with sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and modulates excitation-contraction coupling in the heart. *Basic Res Cardiol* **2005**; 100:250-262.
- McConnachie G, Langeberg LK, Scott JD. AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol Med* **2006**; 12:317-323.

- McIvor ME, Orchard CH, Lakatta EG. Dissociation of changes in apparent myofibrillar Ca^{2+} sensitivity and twitch relaxation induced by adrenergic and cholinergic stimulation in isolated ferret cardiac muscle. *J Gen Physiol* **1988**; 92:509-529.
- Métrich M, Lucas A, Gastineau M, Samuel JL, Heymes C, Morel E, Lezoualc'h F. Epac mediates betaadrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **2008**; 102:959-965.
- Métrich M, Morel E, Berthouze M, Pereira L, Charron P, Gomez AM, Lezoualc'h F. Functional characterization of the cAMP-binding proteins Epac in cardiac myocytes. *Pharmacol Rep* **2009**; 61:146-153.
- Métrich M, Laurent AC, Breckler M, Duquesnes N, Hmitou I, Courillau D, Blondeau JP, Crozatier B, Lezoualc'h F, Morel E. Epac activation induces histone deacetylase nuclear export via a Ras-dependent signalling pathway. *Cell Signal* **2010**; 22:1459-1468.
- Meyers MB, Pickel VM, Sheu SS, Sharma VK, Scotto KW, Fishman GI. Association of sorcin with the cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem* **1995**; 270:26411-8.
- Meyers MB, Puri TS, Chien AJ, Gao T, Hsu P-H, Hosey MM, Fishman GI. Sorcin associates with the pore-forming subunit of voltage-dependent L-type Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* **1998**; 273:18930-18935.
- Minajeva A, Kaasik A, Paju K, Seppet E, Lompre AM, Veksler V, Ventura-Clapier R. Sarcoplasmic reticulum function in determining atrioventricular contractile differences in rat heart. *Am J Physiol* **1997**; 273:H2498-H2507.
- Miura M, Ishide N, Oda H, Sakurai M, Shinozaki T, Takishima T. Spatial features of calcium transients during early and delayed afterdepolarizations. *Am J Physiol* **1993**; 265:H439-444.
- Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **1998**; 93:215-228.
- Morel E, Marcantoni A, Gastineau M, Birkedal R, Rochais F, Garnier A, Lompré AM, Vandecasteele G, Lezoualc'h F. cAMP-binding protein Epac induces cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* **2005**; 97:1296-1304.
- Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Ortale M, Chiappe de Cingolani G, Mattiazzi A. Immunodetection of phosphorylation sites gives new insights into the mechanisms underlying phospholamban phosphorylation in the intact heart. *J Biol Chem* **1996**; 271:33561-33567.
- Mundiña-Weilenmann C, Said M, Ferrero P, Vittone L, Kranias E, Mattiazzi A. Role of phosphorylation of Thr17 of phospholamban in the mechanical recovery from hypercapnic acidosis. *Cardiovasc Res* **2005**; 66:114-122.
- Napolitano R, Vittone L, Mundiña C, Chiappe de Cingolani G, Mattiazzi A. Decrease in tetanic tension elicited by beta-adrenergic stimulation. *Arch Int Physiol Biochim Biophys* **1991**; 99:303-307.
- Napolitano R, Vittone L, Mundiña C, Chiappe de Cingolani G, Mattiazzi A. Phosphorylation of phospholamban in the intact heart. A study on the physiological role of the Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinase system. *J Mol Cell Cardiol* **1992**; 24:387-396.
- Narayanan N, Xu A. Phosphorylation and regulation of the Ca^{2+} -pumping ATPase in cardiac sarcoplasmic reticulum by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Basic Res Cardiol* **1997**; 92:25-35.

Niimura M, Miki T, Shibasaki T, Fujimoto W, Iwanaga T, Seino S. Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function. *J Cell Physiol* **2009**; 219:652-658.

Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **1992**; 258:607-614.

Novara M, Baldelli P, Cavallari D, Carabelli V, Gianniccoli A, Carbone E. Exposure to cAMP and beta-adrenergic stimulation recruits Ca(V)_3 T-type channels in rat chromaffin cells through Epac cAMP-receptor proteins. *J Physiol* **2004**; 558:433-449.

Odermatt A, Kurzydowski K, MacLennan DH. The v_{max} of the Ca^{2+} -ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum (SERCA2a) is not altered by Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphorylation or by interaction with phospholamban. *J Biol Chem* **1996**; 271:14206-14213.

Oestreich EA, Wang H, Malik S, Kaproth-Joslin KA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka AV. Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca^{2+} mobilization in cardiac myocytes. *J Biol Chem* **2007**; 282:5488-5495.

Oestreich EA, Malik S, Goonasekera SA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka AV. Epac and phospholipase Cepsilon regulate Ca^{2+} release in the heart by activation of protein kinase Cepsilon and calcium-calmodulin kinase II. *J Biol Chem* **2009**; 284:1514-1522.

Okazaki O, Suda N, Hongo K, Konishi M, Kurihara S. Modulation of Ca^{2+} transients and contractile properties by β -adrenoceptor stimulation in ferret ventricular myocytes. *J Physiol* **1990**; 423:221-240.

Okumura S, Fujita T, Cai W, Jin M, Namekata I, Mototani Y, Jin H, Ohnuki Y, Tsuneoka Y, Kurotani R, Suita K, Kawakami Y, Hamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Tsunematsu T, Bai Y, Suzuki S, Hidaka Y, Umemura M, Ichikawa Y, Yokoyama U, Sato M, Ishikawa F, Izumi-Nakaseko H, Adachi-Akahane S, Tanaka H, Ishikawa Y. Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *J Clin Invest* **2014**; 124:2785-2801.

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

Peña JR, Wolska BM. Troponin I phosphorylation plays an important role in the relaxant effect of beta-adrenergic stimulation in mouse hearts. *Cardiovasc Res* **2004**; 61:756-763.

Pereira L, Métrich M, Fernandez-Velasco M, Lucas A, Leroy J, Perrier R, Morel E, Fischmeister R, Richard S, Bénitah JP, Lezoualc'h F, Gómez AM. The cAMP binding protein Epac modulates Ca^{2+} sparks by a Ca^{2+} /calmodulin kinase signalling pathway in rat cardiac myocytes. *J Physiol* **2007**; 583:685-694.

Pereira L, Ruiz-Hurtado G, Morel E, Laurent AC, Métrich M, Domínguez A, Lauton S, Lucas A, Benitah JP, Bers DM, Lezoualc'h F, Gómez AM. Epac enhances excitation–transcription coupling in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **2012**; 52:283-291.

Pereira L, Cheng H, Hung Lao D, Na L, van Oort RJ, Heller Brown J, Wehrens XHT, Chen J, Bers D. Epac2 mediates cardiac β 1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak and arrhythmia. *Circulation* **2013**; 127:913-922.

Picht E, Zima AV, Blatter LA, Bers DM. SparkMaster: automated calcium spark analysis with ImageJ. *Am J Physiol* **2007**; 293:C1073-1081.

Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* **2001**; 88:1159-1167.

Ponsioen B, Gloerich M, Ritsma L, Rehmann H, Bos JL, Jalink K. Direct spatial control of Epac1 by cyclic AMP. *Mol Cell Biol* **2009**; 29: 2521-2531.

Poppe H, Rybalkin SD, Rehmann H, Hinds TR, Tang XB, Christensen AE, Schwede F, Genieser HG, Bos JL, Doskeland SO, Beavo JA, Butt E. Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways. *Nat Methods* **2008**; 5:277-278.

Porzio MA, Pearson AM. Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* **1977**; 490: 27-34.

Pouliquin P, Pace SM, Dulhunty AF. In vitro modulation of the cardiac ryanodine receptor activity by Homer1. *NFAT Pflugers Arch - Eur J Physiol* **2009**; 458:723-732.

Priori SG, Napolitano C, Tiso N, Memmi M, Vignati G, Bloise R, Sorrentino V, Danieli GA. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation* **2001**; 103:196-200.

Purves GI, Kamishima T, Davies LM, Quayle JM, Dart C. Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP-dependent but protein kinase A-insensitive modulation of vascular ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol* **2009**; 587:3639-3650.

Qiao J, Mei FC, Popov VL, Vergara LA, Cheng X. Cell cycle-dependent subcellular localization of exchange factor directly activated by cAMP. *J Biol Chem* **2002**; 277:26581-26586.

Ramirez MT, Zhao XL, Schulman LH, Heller Brown J, Brown J. The nuclear δB isoform of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II regulates atrial natriuretic factor gene expression in ventricular myocytes. *J Biol Chem* **1997**; 272:31203-31208.

Reddy LG, Jones LR, Pace RC, Stokes DL. Purified, reconstituted cardiac Ca^{2+} -ATPase is regulated by phospholamban but not by direct phosphorylation with Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **1996**; 271:14964-14970.

Rehmann H. Epac-inhibitors: facts and artefacts. *Sci Rep* **2013**; 3:3032.

Reil JC, Hohl M, Oberhofer M, Kazakov A, Kaestner L, Mueller P, Adam O, Maack C, Lipp P, Mewis C, Allessie M, Laufs U, Böhm M, Neuberger HR. Cardiac Rac1 overexpression in mice creates a substrate for atrial arrhythmias characterized by structural remodelling. *Cardiovasc Res* **2010**; 87:485-493.

Ringer S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the he3art. *J Physiol (Paris)* **1883**; 4:29-42.

Rodriguez P, Jackson WA, Colyer J. Critical evaluation of cardiac Ca^{2+} -ATPase phosphorylation on serine 38 using a phosphorylation site-specific antibody. *J Biol Chem* **2004**; 279:17111-17119.

Ruediger R, Hentz M, Fait J, Mumby M, Walter G. Molecular model of the A subunit of protein phosphatase 2A: interaction with other subunits and tumor antigens. *J Virol* **1994**; 68:123-129.

Ruiz-Hurtado G, Domínguez-Rodríguez A, Pereira L, Fernández-Velasco M, Cassan C, Lezoualc'h F, Benitah JP, Gómez AM. Sustained Epac activation induces calmodulin dependent positive inotropic effect in adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **2012**; 53:617-625.

Ruiz-Hurtado G, Morel E, Domínguez-Rodríguez A, Llach A, Lezoualc'h F, Benitah JP, Gomez AM. Epac in cardiac calcium signaling. *J Mol Cell Cardiol* **2013**; 58:162-171.

Sacchetto R, Damiani E, Turcato F, Nori A, Margreth A. Ca(2+)-dependent interaction of triadin with histidine-rich Ca(2+)-binding protein carboxyl-terminal region. *Biochem Biophys Res Commun* **2001**; 289:1125-1134.

Said M, Mundiña-Weilenmann C, Vittone L, Mattiazzi A. The relative relevance of phosphorylation of the Thr(17) residue of phospholamban is different at different levels of beta-adrenergic stimulation. *Pflugers Arch* **2002**; 444:801-809.

Said M, Becerra R, Valverde CA, Kaetzel MA, Dedman JR, Mundiña-Weilenmann C, Wehrens XH, Vittone L, Mattiazzi A. Calcium-calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII): a main signal responsible for early reperfusion arrhythmias. *J Mol Cell Cardiol* **2011**; 51:936-944.

Sandona D, Tibaldo E, Volpe P. Evidence for the presence of two homer 1 transcripts in skeletal and cardiac muscles. *Biochem Biophys Res Commun* **2000**; 279:348-353.

Schmidt M, Evellin S, Weernink PA, von Dorp F, Rehmann H, Lomasney JW, Jakobs KH. A new phospholipase-C-calcium signalling pathway mediated by cyclic AMP and a Rap GTPase. *Nat Cell Biol* **2001**; 3:1020-1024.

Schworer CM, Colbran RJ, Soderling TR. Reversible generation of a Ca²⁺-independent form of Ca²⁺ (calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism. *J Biol Chem* **1986**; 261:8581-8584.

Scott JD, McCartney S. Localization of A-kinase through anchoring proteins. *Mol Endocrinol* **1994**; 8:5-11.

Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J* **2003**; 375:503-515.

Simmerman HK, Collins JH, Theibert JL, Wegener AD, Jones LR. Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J Biol Chem* **1986**; 261:13333-13341.

Simmerman HKB, Jones LR. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* **1998**; 78:921-947.

Somekawa S, Fukuhara S, Nakaoka Y, Fujita H, Saito Y, Mochizuki N. Enhanced functional gap junction neofunction by protein-kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circ Res* **2005**; 97:655-662.

Steenart NA, Ganim JR, DiSalvo J, Kranias EG. The phospholamban phosphatase associated with cardiac sarcoplasmic reticulum is a type 1 enzyme. *Arch Biochem Biophys* **1992**; 293:17-24.

Steinberg S. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev* **2008**; 88:1341-1378.

Strynadka NCJ, James MNG. Crystal structures of the helix-loop-helix calcium-binding proteins. *Annu Rev Biochem* **1989**; 58:951-998.

- Suk JY, Kim YS, Park WJ. HRC (histidine-rich Ca^{2+} binding protein) resides in the lumen of sarcoplasmic reticulum as a multimer. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**; 263:667-671.
- Szabadkai G, Rizzuto R. Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett* **2004**; 567:111-115.
- Tada M, Kirchberger MA, Katz AM. Phosphorylation of a 22,000-Dalton Component of the Cardiac Sarcoplasmic Reticulum by Adenosine $3'$: S-Monophosphate-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* **1975**; 250:2640-2647.
- Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Ueda M, Hanaoka M, Hirose T, Shosaku N. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. *Nature* **1989**; 339:439-445.
- Taylor SS, Buechler JA, Yonemoto W. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annu Rev Biochem* **1990**; 59:971-1005.
- Timerman AP, Onoue H, Xin HB, Barg S, Copello J, Wiederrecht G, Fleischer S. Selective binding of FKBP12.6 by the cardiac ryanodine receptor. *J Biol Chem* **1996**; 271:20385-20391.
- Tobimatsu T, Fujisawa H. Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem* **1989**; 264:17907-17912.
- Toyofuku T, Curotto Kurzydowski K, Narayanan N, MacLennan DH. Identification of Ser38 as the site in cardiac sarcoplasmic reticulum $\text{Ca}(2+)$ -ATPase that is phosphorylated by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **1994**; 269:26492-26496.
- Tripathy A, Xu L, Mann G, Meissner G. Calmodulin binding and inhibition of cardiac muscle calcium release channel (ryanodine receptor). *Biophys J* **1995**; 69: 106-119.
- Ulucan C, Wang X, Baljinnyam E, Bai Y, Okumura S, Sato M, Minamisawa S, Hirotsu S, Ishikawa Y. Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2007**; 293:H1662-H1672.
- Valdivia HH, Kaplan JH, Ellis-Davies GCR, Lederer WJ. Rapid adaptation of cardiac ryanodine receptors: modulation by Mg^{2+} and phosphorylation. *Science* **1995**; 267:1997-2000.
- Vandecaetsbeek I, Raeymaekers L, Wuytack F, Vangheluwe P. Factors controlling the activity of the SERCA2a pump in the normal and failing heart. *Biofactors* **2009**; 35:484-499.
- Venema R, Kuo J. Protein kinase C-mediated phosphorylation of troponin I and C-protein in isolated myocardial cells is associated with inhibition of myofibrillar actomyosin MgATPase . *J Biol Chem* **1993**; 268:2705-2711.
- Venetucci LA, Trafford AW, O'Neill SC, Eisner DA. The sarcoplasmic reticulum and arrhythmogenic calcium release. *Cardiovasc Res* **2008**; 77:285-292.
- Vila-Petroff MG, Aiello EA, Palomeque J, Salas MA, Mattiazzi A. Subcellular mechanisms of the positive inotropic effect of angiotensin II in cat myocardium. *J Physiol* **2000**; 529:189-203.
- Viner RI, Ferrington DA, Williams TD, Bigelow DJ, Schoneich C. Protein modification during biological aging: selective tyrosine nitration of the SERCA2a isoform of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in skeletal muscle. *Biochem J* **1999**; 340:657-669.

- Vittone L, Mundiña C, Chiappe de Cingolani G, Mattiazzi A. cAMP and calcium-dependent mechanisms of phospholamban phosphorylation in intact hearts. *Am J Physiol* **1990**; 258:H318-325.
- Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem* **1968**; 243:3763-3765.
- Wang W, Zhu W, Wang S, Yang D, Crow MT, Xiao RP, Cheng H. Sustained beta1-adrenergic stimulation modulates cardiac contractility by Ca^{2+} /calmodulin kinase signaling pathway. *Circ Res* **2004**; 95:798-806.
- Wawrzynow A, Theibert JL, Murphy C, Jona I, Martonosi A, Collins JH. Sarcolipin, the "proteolipid" of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, is a unique, amphipathic, 31-residue peptide. *Arch Biochem Biophys* **1992**; 298:620-623.
- Wegener AD, Jones LR. Phosphorylation-induced mobility shift in phospholamban in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Evidence for a protein structure consisting of multiple identical phosphorylatable subunits. *J Biol Chem* **1984**; 259:1834-1841.
- Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken SR, Marks AR. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation regulates the cardiac ryanodine receptor. *Circ Res* **2004**; 94:e61-e70.
- Wehrens XH, Lehnart SE, Reiken S, Vest JA, Wronska A, Marks AR. Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**; 103:511-518.
- Weidmann S. The diffusion of radiopotassium across intercalated disks of mammalian cardiac muscle. *J Physiol (Lond)* **1966**; 187:323-342.
- Wera S, Hemmings BA. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochem J* **1995**; 311:17-29.
- Westhoff JH, Hwang SY, Scott Duncan R, Ozawa F, Volpe P, Inokuchi K, Koulen P. Ves1/Homer proteins regulate ryanodine receptor type 2 function and intracellular calcium signaling. *Cell Calcium* **2003**; 34:261-269.
- Wilkins BJ, Dai YS, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, Kimball TR, Molkentin JD. Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* **2004**; 94:110-118.
- Williford DJ, Sharma VK, Korth M, Sheu SS. Spatial heterogeneity of intracellular Ca^{2+} concentration in nonbeating guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* **1990**; 66:241-248.
- Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem* **1991**; 266:11144-11152.
- Wong W, Scott JD. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**; 5:959-970.
- Xiao B, Sutherland C, Walsh MP, Chen SR. Protein kinase A phosphorylation at Serine-2808 of the cardiac Ca^{2+} -release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ Res* **2004**; 94:487-495.

Xiao B, Jiang MT, Zhao M, Yang D, Sutherland C, Lai FA, Walsh MP, Warltier DC, Cheng H, Chen SR. Characterization of a novel PKA phosphorylation site, Serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circ Res* **2005**; 96:847-855.

Xiao B, Tian X, Xie W, Jones PP, Cai S, Wang X, Jiang D, Kong H, Zhang L, Chen K, Walsh MP, Cheng H, Chen SR. Functional consequence of protein kinase A-dependent phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor: sensitization of store overload-induced Ca^{2+} release. *J Biol Chem* **2007**; 282:30256-30264.

Xiao L, Zhao Q, Du Y, Yuan C, Solaro RJ, Buttrick PM. PKCepsilon increases phosphorylation of the cardiac myosin binding protein C at serine 302 both in vitro and in vivo. *Biochemistry* **2007**; 46:7054-7061.

Xu A, Netticadan T, Jones DL, Narayanan N. Serine phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in the intact beating rabbit heart. *Biochem Biophys Res Commun* **1999**; 264:241-246.

Xu L, Meissner G. Mechanism of calmodulin inhibition of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor). *Biophys J* **2004**; 86:797-804.

Yuan Q, Fan GC, Dong M, Altschaffl BA, Diwan A, Ren X, Hahn HH, Zhao W, Waggoner JR, Jones LR, Jones WK, Bers DM, Dorn II GW, Wang HS, Valdivia HH, Chu G, Kranias EG. Sarcoplasmic reticulum calcium overloading in junctin deficiency enhances cardiac contractility but increases ventricular automaticity. *Circulation* **2007**; 115:300-309.

Zalk R, Lehnart SE, Marks AR. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Ann Rev Biochem* **2007**; 76:367-385.

Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR. Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. Proteins of the cardiac junctional sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **1997**; 272:23389-23397.

Zhang T, Johnson EN, Gu Y, Morissette MR, Sah VP, Gigena MS, Belke DD, Dillmann WH, Rogers TB, Schulman H, Ross J Jr, Brown JH. The cardiac-specific nuclear delta(B) isoform of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II induces hypertrophy and dilated cardiomyopathy associated with increased protein phosphatase 2A activity. *J Biol Chem* **2002**; 277:1261-1267.