

MODELO NUMERICO PARA DESCRIBIR LA INCIDENCIA DEL ISOPROTERENOL EN LA FOSFORILACION DE UNA PROTEINA INVOLUCRADA EN LA REGULACION DE LA CONTRACCION CARDIACA.

D.G. Renzi^{1,2}, S.E. Rodríguez², A. Mattiazzi³, F. Vericat^{1,2,*}

¹Area Física, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario

²Grupo de Aplicaciones Matemáticas y Estadísticas de la Facultad de Ingeniería (GAMEFI), Universidad Nacional de La Plata

³Centro de Investigaciones Cardiovasculares, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

vericat@ifysib.unlp.edu.ar

En este trabajo presentamos un modelo teórico que ayuda a sostener una hipótesis acerca de la influencia de la droga estimulante isoproterenol sobre la relajación y contracción cardíaca. Nuestros resultados indican que el isoproterenol no sólo participa favoreciendo la fosforilación, sino que además reduce la actividad de la proteína que cataliza la desfosforilación del fosfolambán.

El fosfolambán es una proteína localizada en el retículo sarcoplasmático cardíaco que participa de forma esencial en la regulación de la contracción y relajación cardíaca. Esta proteína incorpora, en condiciones adecuadas, ³²P induciendo variaciones en la relajación y contracción del músculo cardíaco^(1,2).

Experimentos *in vitro* indican que la proteína kinasa A (PKA) cataliza la fosforilación del fosfolambán mientras que la proteína fosfatasa (PP1) favorece la desfosforilación. Se ha conjeturado que la presencia de la droga estimulante isoproterenol (Iso) aumentaría la actividad k_1 de la PKA como fosforilante al tiempo que disminuiría la actividad k_2 de la fosfatasa PP1 como desfosforilante.

Debido a las dificultades para diseñar experimentos en los cuales las dos actividades estén controladas, consideramos conveniente realizar un modelo matemático simple que permite, mediante un algoritmo adecuado, predecir el comportamiento de las actividades k_1 y k_2 en función de la concentración del isoproterenol, de manera de reproducir los datos experimentales disponibles.

En nuestro modelo, aquellos sitios en el fosfolambán capaces de incorporar ³²P son designados como 1, 2, ...N, donde N es número de tales sitios. Al sitio s (donde s indica genéricamente cualquiera de los sitios 1, 2, ...N) asociamos un número de ocupación $q(s)$ tal que:

$$q(s) = \begin{cases} 1 & \text{si el sitio está fosforilado.} \\ 0 & \text{si el sitio no está fosforilado.} \end{cases}$$

Consideramos que, inicialmente, todos los sitios están vacíos, esto es, $q(s) = 0$ para $s = 1, 2, \dots, N$.

Supongamos, por el momento, que las actividades k_1 y k_2 son funciones conocidas de la concentración de isoproterenol $[Iso]$, es decir, $k_1 = k_1([Iso])$ y $k_2 = k_2([Iso])$. Entonces, para un dado valor de $[Iso]_\alpha$ y por tanto de las correspondientes actividades $k_1([Iso]_\alpha)$ y $k_2([Iso]_\alpha)$, tomamos de a un sitio por vez y procedemos como sigue: elegimos primeramente al azar un número n_s perteneciente al intervalo $[0, 1]$. Luego, si $n_s > k_1([Iso]_\alpha)$, dejamos $q(s) = 0$, pero si $n_s \leq k_1([Iso]_\alpha)$, entonces hacemos $q(s) = 1$. En este último caso elegimos un

segundo número aleatorio n_s' también en el intervalo $[0, 1]$. Ahora, si $n_s' > k_2([Iso]_\alpha)$ entonces dejamos que el sitio siga fosforilado ($q(s) = 1$), pero si $n_s' \leq k_2([Iso]_\alpha)$ entonces lo desfosforilamos ($q(s) = 0$). En la Figura 1 mostramos el diagrama de flujo del algoritmo. Repetimos M veces este proceso y obtenemos un número medio de sitios fosforilados $\langle P([Iso]_\alpha) \rangle$.

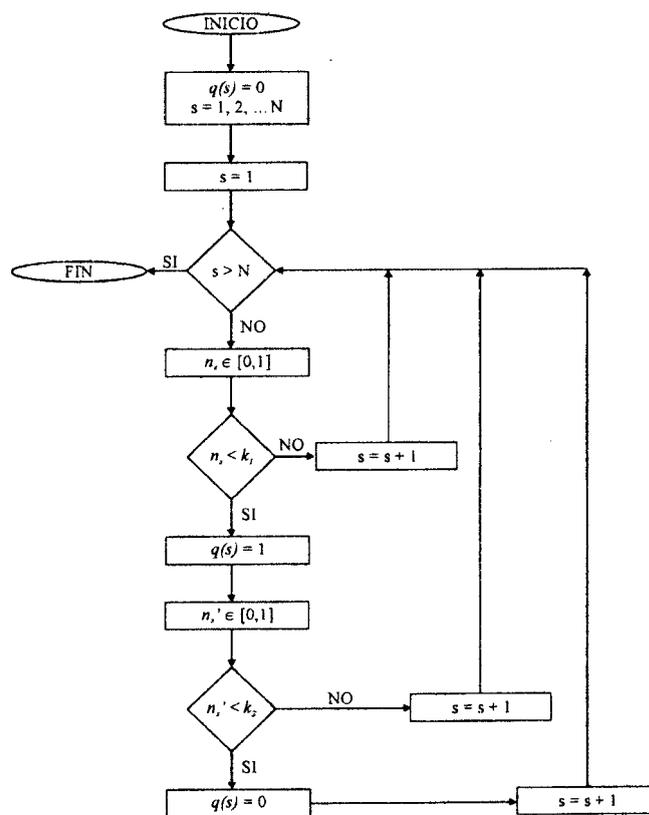


Figura 1: Diagrama de flujo del algoritmo.

El porcentaje total de sitios fosforilados para esa concentración de isoproterenol vendrá dada entonces por la siguiente expresión:

$$\langle P([Iso]_x) \rangle = \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M \left(\frac{100}{N} \sum_{s=1}^N q(s) \right) \quad (1)$$

Repetiendo este procedimiento para diferentes concentraciones de isoproterenol obtenemos una curva que representa la cantidad de sitios que contienen ^{32}P a aquellas concentraciones de isoproterenol.

El problema que resta es determinar $k_1([Iso])$ y $k_2([Iso])$. La determinación de $k_1([Iso])$ se ve facilitada por el hecho de que puede lograrse experimentalmente la inhibición completa de la fosfatasa PP1 como desfosforilante agregando ácido okádico (AO)⁽¹⁾. En nuestro modelo, esta condición se consigue haciendo $k_2([Iso]) \equiv 0$. En ese caso podemos fácilmente encontrar una curva que represente a $k_1([Iso])$ y que ajuste adecuadamente los datos experimentales. El mejor ajuste que encontramos de esta manera fue para una función de la forma:

$$k_1([Iso]) = 1 - 0.42 \exp(-0.11[Iso]) \quad (2)$$

En las Figuras 2 y 3, la línea superior corresponde al porcentaje de ^{32}P incorporado por el fosfolambán en función de la concentración de isoproterenol, como se obtiene del algoritmo descrito anteriormente, cuando usamos para $k_1([Iso])$ la ecuación (2) y $k_2([Iso]) \equiv 0$. Los círculos llenos, por su parte, indican los correspondientes valores experimentales obtenidos cuando está presente el AO.

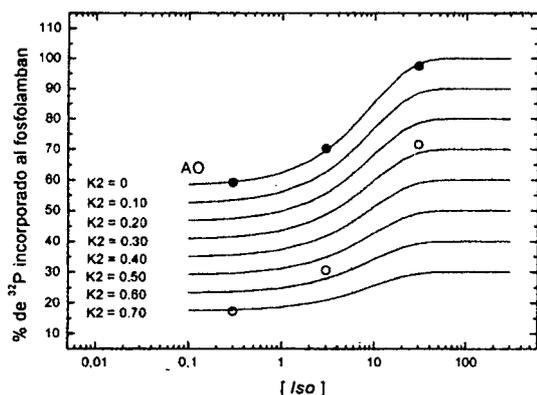


Figura 2: Porcentaje de ^{32}P incorporado al fosfolambán considerando la actividad de la fosfatasa (k_2) constante.

Los círculos vacíos en las Figuras 2 y 3 son los datos experimentales obtenidos en ausencia de ácido okádico. Para analizar la influencia del isoproterenol sobre la actividad k_2 , supusimos primeramente (Figura 2), que ésta no varía con $[Iso]$, esto es, $k_2([Iso]) \equiv \text{constante}$. Podemos apreciar que el ajuste está lejos de poder ser considerado como bueno. Es evidente que debe existir una dependencia de k_2 con $[Iso]$, más aún, k_2 debe ser una función decreciente de $[Iso]$. En este caso, la expresión para la actividad de desfosforilación tiene la forma:

$$k_2([Iso]) = 0.67 \exp(-0.032[Iso]) \quad (3)$$

La Figura 3 muestra las gráficas obtenidas de sitios fosforilados en el fosfolambán, en presencia y en ausencia de AO, en el último caso usamos la ec. (3) para representar la actividad de la fosfatasa.

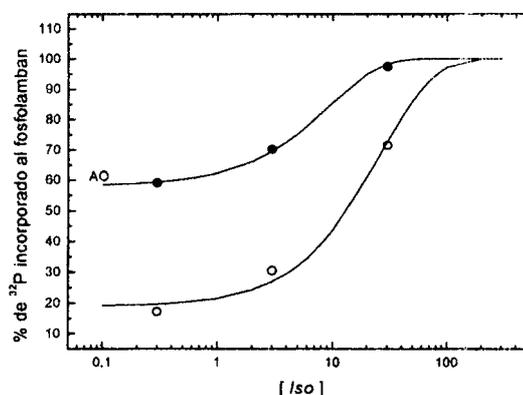


Figura 3: Porcentaje de ^{32}P incorporado al fosfolambán considerando la actividad de la fosfatasa dada por la ec. (3).

Una utilización adecuada de los datos experimentales disponibles (caso en que la fosfatasa PP1 es completamente inhibida por el AO), conjuntamente con un modelo numérico muy simple, nos permitió reproducir los datos experimentales de fosforilación del fosfolambán cuando las dos proteínas están activas.

Finalmente destacamos que, nuestro modelo permitió además proponer una forma funcional para las actividades asociadas a las proteínas encargadas de regular la cantidad de ^{32}P en el fosfolambán y responder favorablemente a la conjetura sobre el efecto que el isoproterenol tendría sobre los mecanismos de fosforilación y desfosforilación.

Deseamos agradecer a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por su apoyo (PICT 03-4517 y PIP 4690). D.G.R es becario FOMEC (UNR); A.M y F.V son investigadores de CONICET.

Referencias

- 1- Cecilia Mundiña-Weilenmann, Leticia Vittone, Manuel Ortale, Gladis Chiappe de Cingolani y Alicia Mattiazzi, *J. Biol. Chem.*, **271**, 33561-33567 (1996).
- 2- Leticia Vittone, Cecilia Mundiña-Weilenmann, Matilde Said y Alicia Mattiazzi, *J. Biol. Chem.*, **273**, 9804-9811 (1998).