

11261
11
29)

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Medicina

"Regulación cinética de los intermediarios fosforilados de la
ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de sarcolema cardíaca por calmodulina"

Tesis que para obtener el título de

Maestra en Ciencias Biomédicas

Presenta

Guadalupe Isabel Oliva Ramírez

México, D.F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La presente Tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Jaime Mas Oliva en el
Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la
U.N.A.M.

A mi madre (1926-1993)
y a Elena (1956-1995)

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Jaime Mas Oliva por su enorme entusiasmo, su invaluable dirección y su gran paciencia en la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Edmundo Chávez Cossio, Dra. Patricia del Arenal, Dr. Heliodoro Celis S., Dr. Diego González Halphen y Dr. Salvador Uribe C. por sus valiosos comentarios y sugerencias a la presente Tesis.

A mis maestros, en especial a los Doctores José Antonio Holguín y Heliodoro Celis por ser los culpables de inducir mi interés académico a la Bioquímica.

Al Dr. Víctor Reyes Acosta por tener la visión y el deseo de superación académica para la Facultad de Medicina de la U.A.T.; y por su apoyo incondicional para realizar mis estudios de Maestría.

A Elena Oliva y Rodolfo Paredes por su asistencia técnica en microscopía electrónica y el trabajo de fotografía.

A Blanca Delgado por su colaboración técnica, su amistad y su excelente sentido del humor.

A Juan Santiago-García por su apoyo, amistad y valiosas opiniones.

A Cuauhtémoc Gómez y Carolina López por su contribución y mi adiestramiento en los programas de computación.

A Rosa Gabriela Castaño y Luis Flores por la edición de este trabajo.

A mi hermana Rosa que sin su respaldo no hubiera sido posible concluir esta etapa.

A mis amigos y compañeros: Irma, Malena, Guillermo (Punk), Alejandro (Ito), Ember, Ileana, Mónica y Rafael.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Universidad Autónoma de Tamaulipas y a la Secretaría de Educación Pública por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca Tesis de Maestría.

A la Universidad Autónoma de Tamaulipas por el permiso otorgado para presentar el examen de grado.

INDICE

Abreviaturas

Resumen

I.	Introducción.	1
	I.1. Características de la ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺) de la membrana plasmática.	5
	I.2. Ciclo catalítico de la ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺) de la membrana plasmática.	14
	I.3. Regulación de la actividad catalítica de la ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺) de la membrana plasmática.	17
II.	Objetivos.	26
III.	Materiales y Métodos.	28
	III.1. Materiales.	28
	III.2. Métodos.	29
	III.2.1. Método preparativo de aislamiento de microsomas cardíacos de bovino deficientes en calmodulina.	29
	III.2.2. Preparación de fantasmas de eritrocito humano deficientes en calmodulina.	31
	III.2.3. Purificación de calmodulina.	32
	III.2.4. Acoplamiento de calmodulina a Sefarosa 4B CNBr.	33
	III.2.5. Purificación de la ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺) de fantasmas de eritrocito humano y de microsomas cardíacos de bovino por cromatografía de afinidad.	34
	III.2.6. Reconstitución de la ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺) soluble en liposomas.	35
	III.2.7. Determinación de la actividad de la ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺).	35
	III.2.8. Determinación de la actividad de la ATPasa-(Na ⁺ /K ⁺).	36
	III.2.9. Determinación de la concentración de proteína.	37
	III.2.10. Transporte de calcio.	37

INDICE

III.2.11. Microscopía electrónica.	38
III.2.12. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.	38
III.2.13. Determinación de la actividad de la succinato deshidrogenasa.	39
III.2.14. Determinación de la actividad de la citocromo oxidasa.	39
III.2.15. Determinación del nivel de fosfoenzima.	39
IV. Resultados y Discusión.	41
IV.1. Aislamiento de la fracción microsomal cardíaca de bovino deficiente en calmodulina.	43
IV.2. Actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺) en microsomas cardíacos y fantasmas de eritrocito.	50
IV.3. Efecto de las concentraciones libres de Ca ²⁺ y Mg ²⁺ sobre la actividad de la ATPasa-(Ca ²⁺ , Mg ²⁺) en microsomas cardíacos.	52
IV.4. Efecto de ouabaina, oligomicina, vanadato y lantano sobre la actividad de la ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺) en microsomas cardíacos.	54
IV.5. Purificación de la ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺) de sarcolema cardíaca.	59
IV.6. Efecto de ouabaina, vanadato, lantano y oligomicina sobre la actividad de la ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺) purificada de sarcolema cardíaca.	66
IV.7. Efecto de calmodulina sobre el nivel de fosfoenzima de la ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺) sarcolemal.	69
V. Conclusiones	77
VI. Bibliografía	79

ABREVIATURAS

ATP [γ P ³²]	trifosfato de adenosina (isótopo radioactivo)
ATPasa	adenosín trifosfatasa
cpm	cuentas por minuto
DCIP	2,3, diclorofenolindofenol
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilen diamino tetra acético
EGTA	ácido etilenglicol bis (amino-etil-éter) N,N'- tetra acético
EP	intermediario fosforilado de la ATPasa-(Ca ²⁺ , Mg ²⁺)
HEPES	ácido N,2-hidroxielilpiperazina-N'-2- etanosulfónico
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FSBA	5', p-fluorofosfonil benzoil adenosina
NEM	N-etilmaleimida
PA	ácido fosfatídico
PC	fosfatidilcolina
PE	fosfatidiletanolamina
PI	fosfato inorgánico
PIP	fosfatidil inositol monofosfato
PIP2	fosfatidil inositol difosfato
PMSF	metasulfato de fenazina
PS	fosfatidilserina
RS	retículo sarcoplásmico
PMCA	isoformas de la ATPasa-(Ca ²⁺ , Mg ²⁺) de membrana plasmática
SDS	dodecil sulfato de sodio
SL	sarcolema
TCA	ácido tricloro acético
Tris	tris hidroximetil amino metano

RESUMEN

La ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de membrana plasmática es una enzima que presenta la capacidad de formar, en presencia de Ca²⁺ y ATP, un intermediario fosforilado durante su ciclo catalítico. La actividad de la enzima es estimulada por una proteína soluble de alta afinidad por Ca²⁺, denominada calmodulina. La estimulación enzimática está dada por una disminución en la Km para el ion calcio, así como por un incremento en la Vmax de la reacción.

Con el propósito de elucidar el nivel al cual la calmodulina ejerce su regulación sobre el intermediario fosforilado de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de sarcolema cardíaca, se desarrolló una modificación al método descrito por Van Alstyne y cols. (1980, BBA 602,131-143) para el aislamiento de una fracción microsomal cardíaca deficiente en calmodulina a partir de músculo cardíaco de bovino. Este procedimiento permite aumentar el rendimiento en la purificación de la enzima sarcolemal utilizando cromatografía de afinidad.

Los resultados obtenidos señalan que la calmodulina disminuye el nivel de fosfoenzima alcanzado en el estado estacionario, tanto durante la fosforilación como en la desfosforilación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺). La velocidad inicial de fosforilación en ausencia de calmodulina es mayor que en presencia de la proteína reguladora. Sin embargo, en presencia de calmodulina, la actividad de la enzima aumenta a más del doble y la k_{op} de fosforilación disminuye. En contraste con estos resultados, el nivel de fosfoenzima en el estado estacionario disminuye. Por otro lado, la calmodulina aparentemente acorta el período de latencia en la liberación de Pi durante los primeros ciclos de la enzima.

Los datos sugieren que el aumento en la actividad de la enzima por calmodulina está asociado a un aumento en la velocidad de recambio de la fosfoenzima y que el efecto de calmodulina está preferentemente asociado a un aumento en la velocidad de desfosforilación de la enzima.

I. INTRODUCCION

El Ca^{2+} libre intracelular juega un papel importante como segundo mensajero en la regulación del metabolismo celular (Berridge, 1984) y se encuentra involucrado en diversos procesos como son la contracción muscular, la regulación enzimática, la síntesis y la liberación de neurotransmisores, la secreción hormonal, la visión y la expresión genética. El nivel de Ca^{2+} libre en el citoplasma de las células aumenta en respuesta a estímulos químicos o eléctricos que llegan a la superficie de la membrana plasmática y este aumento es el evento primario que dispara la maquinaria bioquímica de la célula (Rasmussen, 1970; Rasmussen y Goodman, 1977; Carafoli y Crompton, 1978; Urry, 1978; Martonosi, 1980; Urry y cols., 1982; Reuter, 1983; Berridge, 1984).

En células no excitables, el aumento de Ca^{2+} libre en el citosol se asocia con el estímulo-respuesta, e inicia una serie de eventos bioquímicos y morfológicos diferentes, que dependen del tipo celular: en las células cromafines de la médula adrenal, dispara la secreción de catecolaminas (Geisow y Burgoyne, 1983) y también participa en la agregación plaquetaria (Rink y cols., 1982).

En las células excitables, la despolarización de la membrana plasmática abre los canales de calcio dependientes de voltaje, lo cual permite la entrada rápida de Ca^{2+} extracelular (Linás y cols., 1982), con el consecuente aumento de la concentración de calcio intracelular. Este aumento transitorio se encuentra acoplado a la liberación de neurotransmisores en las células nerviosas (DeLorenzo, 1982) y a la excitación-contracción en las células musculares (Chiesi y Carafoli, 1983).

La regulación del metabolismo de calcio celular se esquematiza en la figura 1. Dependiendo de la célula y del estímulo, la concentración de Ca^{2+} libre en el citoplasma puede aumentar como consecuencia del influjo de Ca^{2+} extracelular a través de difusión pasiva de calcio en favor de su gradiente electroquímico (Fig. 1,1) debido a que la concentración de Ca^{2+} libre extracelular se encuentra en el orden de 10^{-3} M y en el citosol de 10^{-7} M ; o bien, a través de transporte mediado por canales de calcio independientes de voltaje (Fig. 1,2) o dependientes de voltaje (Fig. 1,3), que

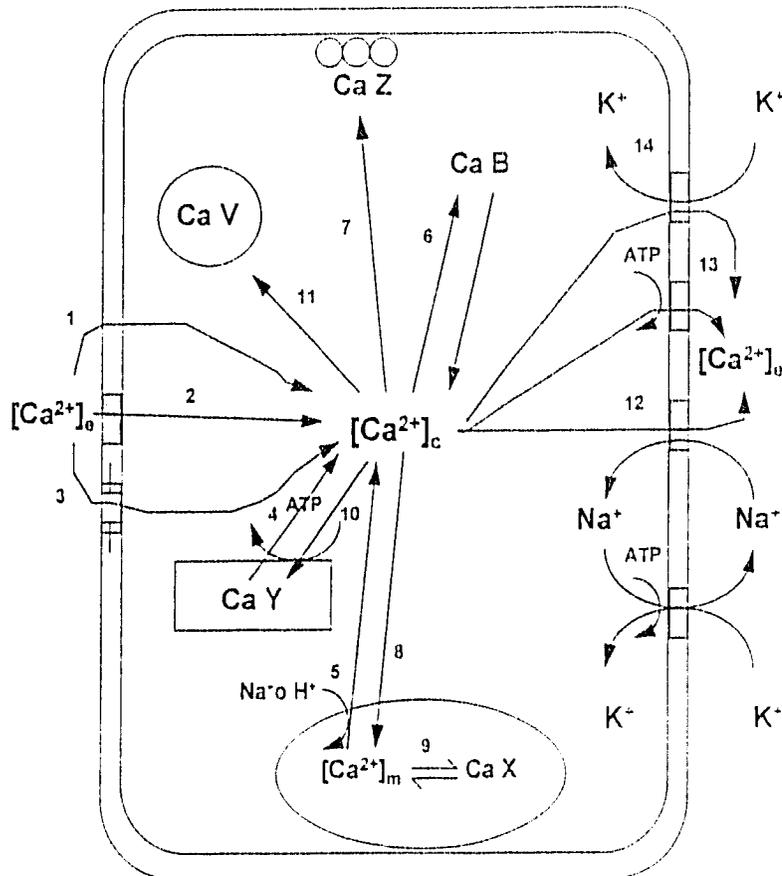


Fig. 1. Representación esquemática de los procesos involucrados en la regulación del metabolismo de calcio celular. Los eventos se llevan a cabo en la membrana plasmática (M.P.), en el retículo endoplásmico (R.E.) y en la mitocondria (M). La regulación de la concentración de Ca^{2+} libre citoplásmica ($[Ca^{2+}]_c$) está dada por: (1) difusión pasiva, (2) canales de Ca^{2+} independientes de voltaje, (3) canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje; liberación de calcio del retículo endoplásmico (4), de la mitocondria (5) y de moléculas citoplásmicas (6); (7) unión pasiva a la membrana plasmática (CaZ), (8) captación activa por la mitocondria y (9) secuestro reversible de calcio en su interior (CaX); (10) captación activa por el retículo endoplásmico, (11) acumulación de calcio por vesículas de secreción (CaV); (12) intercambiador Na^+/Ca^{2+} acoplado a la ATPasa Na^+/K^+ ; (13) ATPasa- (Ca^{2+}, Mg^{2+}) y (14) intercambiador K^+/Ca^{2+} .

son regulados por neurotransmisores y fármacos (Reuter,1983). También mediante la liberación de calcio de depósitos intracelulares como son el retículo endoplásmico (Fig.1,4) y la mitocondria (Fig.1,5) (Kretsinger, 1981; Somlyo,1984).

Dentro de la célula, el control de la concentración de Ca^{2+} citoplásmico depende de varios mecanismos: **a)** la unión reversible a ligandos aniónicos citoplásmicos (Fig.1,6); **b)** unión pasiva de iones de calcio a fosfolípidos de la monocapa interna de la membrana plasmática cargados negativamente (Fig.1,7); **c)** la captación activa de calcio por la mitocondria (Fig.1,8) y el secuestro reversible de calcio en el interior de este organelo (Fig.1,9); **d)** la captación activa y el secuestro de calcio por el retículo endoplásmico (Fig.1,10) y **e)** la acumulación de calcio por vesículas de secreción en algunos tipos celulares (Fig.1,11). Sin embargo, para mantener por un tiempo largo el gradiente de concentración de Ca^{2+} en presencia de un influjo pasivo de este ion, se requiere de sistemas que controlen la salida de Ca^{2+} hacia el espacio extracelular a través de la membrana plasmática. Estos sistemas son dos mecanismos diferentes que dependen de energía. El primer mecanismo es un intercambiador de Na^+/Ca^{2+} (Fig.1,12) que utiliza el gradiente electroquímico del ion sodio, generado por la ATPasa- (Na^+/K^+) para expulsar el calcio de la célula y el segundo mecanismo es la ATPasa- (Ca^{2+},Mg^{2+}) (Fig.1,13) (Caroni y Carafoli, 1980). Ambos mecanismos están presentes en células excitables (Reuter y Seitz,1968; Baker y cols.,1969; Dipolo, 1978; Reeves y cols.,1979; Mas-Oliva y cols., 1979; Caroni y Carafoli, 1980) y no excitables (Schatzmann y Vincenzi, 1969; Gmaj y cols., 1979; Pershadsingh y cols.,1980; Murer y Haldeman, 1981) y trabajan en paralelo, con diferente eficiencia relativa en diferentes células y su papel está dictado por sus propiedades cinéticas específicas. El intercambiador Na^+/Ca^{2+} es un sistema con gran capacidad de transporte y baja afinidad por el ion calcio y la ATPasa- (Ca^{2+},Mg^{2+}) tiene alta afinidad por el ion calcio, pero menor capacidad de transporte que el intercambiador Na^+/Ca^{2+} (Carafoli y Zurini, 1982).

En la célula muscular cardíaca, el proceso de contracción-relajación es regulado a través de cambios en la concentración de calcio en el interior de la célula. Al inicio de la contracción muscular, el potencial de acción generado en la unión neuromuscular se propaga de la sarcolema (SL), a las fibras musculares a través de los túbulos transversos (túbulos-t),

que son invaginaciones de la SL. La despolarización de la SL provoca la apertura de los canales lentos de Ca^{2+} (Reuter, 1983; Lamers, 1985) y el calcio entra del espacio extracelular a la célula (Langer, 1992) e induce un incremento en la permeabilidad iónica de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS) (Rega y Garrahan, 1986), provocando un aumento brusco en la concentración de calcio en el sarcoplasma. El Ca^{2+} activa a los miofilamentos al unirse a la miosina y a la troponina. La troponina es un oligómero formado por tres subunidades diferentes: la troponina T (TnT) que une a la tropomiosina, la troponina I (TnI) que inhibe a la ATPasa del complejo actomiosina y la troponina C (TnC) con afinidad por el ion calcio. La troponina C presenta cuatro sitios de unión a Ca^{2+} y una vez que se une a él, cambia su conformación y se modifica la interacción con las otras subunidades: la TnT relaja su interacción con la tropomiosina, lo cual permite el desplazamiento de ésta y modifica su relación con la actina. De esta forma las cabezas de miosina tienen acceso a los filamentos delgados de actina. Por otro lado, la interacción entre miosina y actina se induce por el aumento en la concentración de Ca^{2+} en el sarcoplasma. La asociación actina-miosina inicia la actividad ATPasa de la miosina, el ATP se hidroliza y la energía bioquímica se convierte en fuerza mecánica que permite el acortamiento del sarcómero (Warber y Potter, 1986; Langer, 1992). Para completar el ciclo excitación-contracción-relajación, se requiere que la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma regrese a su nivel basal. Este proceso se lleva a cabo mediante tres mecanismos: uno localizado en el RS, que es la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$, la cual bombea calcio del citoplasma al lumen de este organelo (Mac Lennan, 1970; Inesi y Scarpa, 1972; de Meis, 1981); y los otros dos localizados en la SL y que son: **a)** el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Reuter y cols., 1968; Baker y cols., 1969; Dipolo, 1978; Reeves y col., 1979) y **b)** la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ (Caroni y Carafoli, 1980 y 1981a; Lamers, 1985; Rega y Garrahan, 1986), que transportan el calcio del citoplasma al espacio extracelular.

I.1. Características de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de la membrana plasmática.

La ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de la membrana plasmática ha sido caracterizada y purificada a partir de células de diferentes tejidos y organismos (Schatzmann y col., 1969; Dipolo, 1978; Gimaj y cols., 1979; Caroni y col., 1980; Pershadsingh y cols., 1980; Murer y col., 1981; Lotersztajn y cols., 1981), lo cual apoya la conclusión de que es una enzima constitutiva de la membrana plasmática de las células eucariontes, cuya característica principal es la de bombear Ca²⁺ hacia el espacio extracelular a expensas de la hidrólisis de ATP.

Las características generales de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de la membrana plasmática son esencialmente similares en una amplia variedad de tipos celulares, sin embargo, en un tipo de membrana plasmática, como por ejemplo en la del hepatocito, las diferencias pueden ser muy significativas (Kessler y cols., 1990), como se indica más adelante, y pueden existir diferentes bombas de Ca²⁺ (Lotersztajn y cols., 1981).

La Tabla 1 resume las propiedades generales de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de la membrana plasmática. La bomba de Ca²⁺ tiene una masa molecular de alrededor de 134,000 Da y presenta la capacidad de formar un intermediario fosforilado en presencia de Ca²⁺ y ATP, en donde el fosfato y del ATP se une covalentemente a un residuo aspartilo de la proteína (Knauf y cols., 1974; Tanford, 1983), y se inhibe por ortovanadato, lo que establece que se clasifique dentro de las ATPasas tipo P. La enzima también se inhibe con La³⁺, esto es común en todas las ATPasas tipo P, pero la inhibición tiene propiedades peculiares en la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de la membrana plasmática, debido a que el nivel de fosfoenzima en el estado estacionario es estimulado por La³⁺, mientras que disminuye grandemente en otras bombas (Schatzmann y Bürgin, 1978; Szász y cols., 1978a; Adamo y cols., 1988).

La estequiometría entre el Ca²⁺ transportado y la hidrólisis de ATP de la enzima se aproxima a 1 en la mayoría de los experimentos realizados *in silu* (Schatzmann, 1982) y en los sistemas reconstituídos (Niggli y cols., 1981). La actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) en función de la concentración de ATP

Tabla 1. Características generales de la ATPasa- (Ca^{2+} , Mg^{2+}) de la membrana plasmática.

Distribución	todas las células
Peso molecular	134,000
Mecanismo	formación de un intermediario fosforilado (aspartil-fosfato)
Inhibición	Vanadato ($K_{0.5}$ alrededor de $3 \mu\text{M}$) La^{3+} ($K_{0.5}$ alrededor de $1 \mu\text{M}$)
Estequiometría $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$	0.5 o 1
K_m (ATP)	sitio de alta afinidad $1 - 2.5 \mu\text{M}$ sitio de baja afinidad $145 - 180 \mu\text{M}$
K_m (Ca)	$>10 \mu\text{M}$ en el estado de reposo $< 0.5 \mu\text{M}$ en el estado activado
Activadores	calmodulina (K_d alrededor de 1 nM) ácidos grasos poliinsaturados, fosfolípidos ácidos, fosforilación por proteína cinasas en por lo menos una isoforma, oligomerización.

muestra una curva bifásica. Los datos sugieren la existencia de dos sitios de unión para el ATP con diferente afinidad aparente, un sitio de alta afinidad con una K_m (ATP) de 1 a $2.5 \mu\text{M}$, que al estar ocupado por el nucleótido muestra baja actividad hidrolítica, y un sitio de baja afinidad con una K_m (ATP) de 145 a $180 \mu\text{M}$ que provoca una actividad alta (Carafoli y Zurini, 1982; Rega y col., 1986; Carafoli, 1992).

La enzima es estimulada directamente por calmodulina (Gopinath y Vincensi, 1977; Jarret y Penniston, 1977). Esto ha sido aprovechado para purificarla, primero de eritrocitos (Niggli y cols., 1979) y después de otras

membranas plasmáticas, usando columnas de afinidad acopladas a calmodulina. La estimulación resulta de un efecto combinado sobre la K_m y la V_{max} , predominando la primera (Niggli y cols., 1981): en presencia de concentraciones óptimas de calmodulina (v.g. 1 nM), la K_m (Ca) de la ATPasa disminuye de alrededor de 20 μM a 0.5 μM (Niggli y cols., 1981; Caroni y cols., 1983). Sin embargo, cuando la concentración de Ca^{2+} aumenta en el orden milimolar, el catión provoca inhibición, observándose un efecto bifásico similar a la actividad enzimática en presencia de diferentes concentraciones de Mg^{2+} , calmodulina o cationes monovalentes, los cuales activan a concentraciones bajas y tienen un efecto inhibitorio a concentraciones altas (Rega y col., 1986).

A pesar de que la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) representa entre el 0.01 y el 0.1% del total de la proteína plasmática en el eritrocito (Knauf y cols., 1974), en donde probablemente está más concentrada que en otras células, la enzima es esencial para el control de la concentración de Ca^{2+} intracelular. En muchas células la bomba de Ca^{2+} constituye el único mecanismo fisiológico importante por el cual el Ca^{2+} es removido de las células; mientras que en otras células, particularmente las de los tejidos excitables, éste se comparte con un intercambiador Na^+/Ca^{2+} (Philipson, 1985). En tejidos en los cuales el Ca^{2+} se mueve a través de capas celulares, como en el riñón (Gmaj y cols., 1979) y en el intestino delgado (Ghijsen y cols., 1979; Wasserman y Fullmer, 1983), la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) con alta afinidad por el ion calcio se localiza principalmente en la membrana plasmática basolateral de las células de la corteza renal y de la célula epitelial intestinal, lo que sugiere que esta bomba de Ca^{2+} juega un papel importante en los movimientos de Ca^{2+} transcelular.

A través de estudios de biología molecular se ha encontrado que la secuencia de aminoácidos de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de la membrana plasmática obtenida de eritrocitos (James y cols., 1988) y de teratoma (Verma y cols., 1988) humanos presenta un alto grado de similitud en la secuencia de aminoácidos de otras ATPasas transportadoras de iones tipo P: la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de RS, la subunidad alfa de la ATPasa- Na^+/K^+ y la H^+ -ATPasa de *Neurospora crassa* (Verma y cols., 1988). Las similitudes que se conservan en estas ATPasas residen en el sitio de fosforilación, el sitio de unión al FITC y el sitio de unión al FSBA (ambos análogos no hidrolizables de ATP), lo que

sugiere la existencia de dos sitios de unión para el ATP (James y cols., 1988; Verma y cols., 1988).

El análisis de varias bibliotecas genómicas de cDNA de rata, bovino y humano ha permitido identificar por lo menos cinco isoformas diferentes de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de membrana plasmática (PMCA) en mamíferos (Gietzen y cols., 1980; Shull y Greeb, 1988; Verma y cols., 1988). La nomenclatura para las isoformas de la PMCA fue propuesta por Shull y Greeb en 1988 y Strehler y cols. en 1990. Esta nomenclatura emplea la letra **r** o **h** para designar a las isoformas de rata o humanas, los números colocados después de PMCA identifican los diferentes productos génicos y la letra minúscula que sigue al número indica las variantes de la edición alterna en las diferentes isoformas. La progresión de las letras (**a** a **h**) se refiere a un patrón histórico de su publicación (Tabla 2).

Los genes que codifican para las isoformas 1 y 4 de la PMCA se localizan en los cromosomas 12 (q21-q32) y 1 (q25-q32) respectivamente, mientras que el gen que codifica para la isoforma humana 2 de la PMCA probablemente se localiza en el cromosoma 3 (Carafoli, 1992). Las isoformas de la PMCA son codificadas por una familia multigen y la variabilidad adicional se produce por la edición alterna del RNA de cada gen transcrito primario (Shull y Greeb, 1988; Grover y Khan, 1992). El tamaño de las isoformas de la PMCA varía entre 1159 y 1258 residuos de aminoácidos, con pesos moleculares calculados entre 127,300 y 138,800 (Verma y cols., 1988; Strehler, 1991), esto se debe a que la edición alterna del RNAm puede ocurrir en cuatro sitios posibles (A,B,C,D en la figura 2), cuya localización dentro de la estructura primaria del gen de la PMCA transcrito coincide con los dominios de la estructura, función y regulación (Strehler, 1991).

La figura 2 muestra una representación lineal de la estructura primaria de la PMCA e indica la localización de los dominios principales (Strehler, 1991; Carafoli, 1992). El modelo correspondiente se muestra en la figura 3, el cual se basa en las predicciones de la estructura secundaria, en los cálculos de hidrofobicidad y en la comparación de la secuencia de aminoácidos con la estructura de proteínas conocidas. Al parecer, la bomba de calcio se encuentra organizada en la membrana de acuerdo a la topografía sugerida para todas las bombas tipo P (Mac Lennan y cols., 1985).

Tabla 2. Isoformas de la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática. Los datos se deducen de el cDNA aislado de bibliotecas genómicas de rata o humano.

Isoforma	Especie	Variante	No. de residuos de aminoácidos ¹	Mr calculado
PMCA 1	Rata, humano	1a	1176	129,500
		1b	1120	134,700
		1c	1249	137,800
		1d	1258	138,800
PMCA 2	Rata, humano	2f	1198	132,600
		2g	1243	136,800
		2h	1212	134,000
PMCA 3	Rata	3a	1159	127,300
PMCA 4	Humano	4a	1170	129,400
		4b	1205	133,900
		4g*	1169	130,300
(PMCA 5)**	Bovino	?	71	7,700

¹ La secuencia completa de cDNA solamente se ha reportado para las isoformas r PMCA 1a, h PMCA 1b, r PMCA 2f, h PMCA 2f, h PMCA 2g, h PMCA 2h, r PMCA 3a y h PMCA 4b. Las otras secuencias son extrapolaciones que se basan en asumir la identidad de las regiones no secuenciadas con las correspondientes secuencias completas conocidas.

* Isoforma que se produce de un RNAm que pierde una secuencia en la edición alterna relacionada con el sitio B.

** La isoforma PMCA 5 (cerebro de bovino) se muestra entre paréntesis debido a que solamente contiene 71 residuos de aminoácidos y aún no existe evidencia de que corresponda a una isoforma separada.

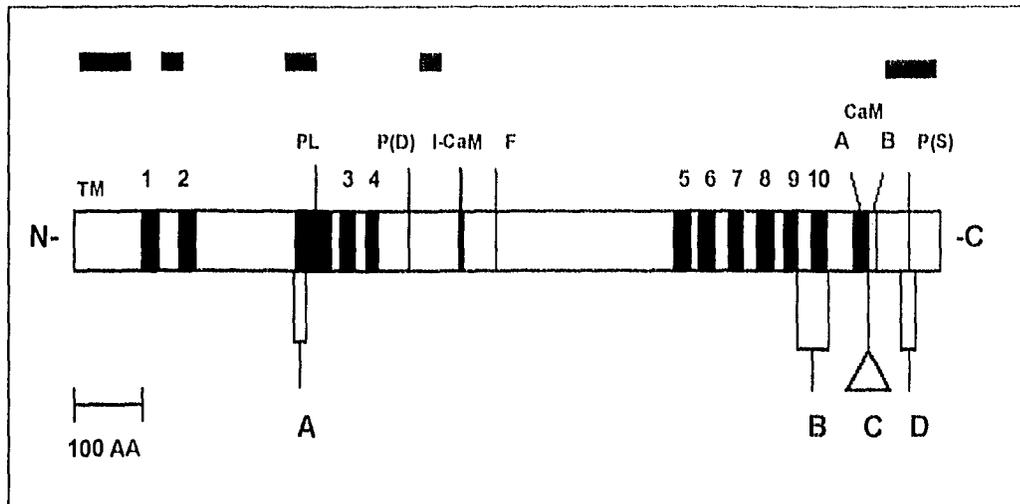


Fig. 2. Dominios asignados en la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática y localización de las regiones variables de las isoformas. Las barras superiores indican las regiones con alta divergencia en la secuencia entre los cuatro productos génicos. **A, B, C** y **D** son los sitios en donde ocurre la edición alternativa. Los números indican los sitios relacionados con los dominios transmembranales. **PL** sitio relacionado a la respuesta a fosfolípidos. El dominio de unión a calmodulina (**CaM**) presenta los subdominios **A** y **B**. **P(D)** es el sitio de formación de el aspartilfosfato. **F** es el sitio de unión a FITC (ATP) . **P(S)** es el sitio de fosforilación por proteína cinasa **A**. **AA** aminoácidos. **I-CaM** región inhibitoria que interactúa con la región que une a calmodulina en ausencia de Ca^{2+} /calmodulina.

La edición alterna del RNAm en el sitio A (Fig. 2) puede codificar isoformas con gran diferencia en su longitud y gran variación en su sensibilidad a fosfolípidos, debido a que ésta región se relaciona con la propiedad de sensibilidad a fosfolípidos en las PMCA. Las isoformas que se producen por la edición alterna del RNAm en el sitio B (Fig. 2) son de gran interés para la topología de la bomba. La isoforma h PMCA 4g cambia el modelo topográfico de la bomba, debido a que esta variante pierde el dominio transmembranal 10 que se predice en el modelo de la figura 3. Esto podría además eliminar otro dominio transmembranal, debido a que es poco probable que la bomba cruce un número impar de veces la

membrana (Strehler, 1991; Carafoli, 1992). En nuestro laboratorio Santiago-García y cols. (1995) han encontrado recientemente una variante de la PMCA 4 humana en corazón fetal, denominada h PMCA 4d, que empieza a expresarse en niveles muy bajos a partir de la semana 12 del desarrollo embrionario, para ir aumentando hasta la etapa adulta. Al igual que la isoforma 4a, la isoforma 4d se expresa de manera específica de tejido, siendo el corazón uno de los órganos en donde se expresa.

El sitio C (Fig. 2) se relaciona con el sitio de unión a calmodulina. La edición alterna del RNAm que se produce en este sitio, involucra un solo exón de 154 pares de bases con múltiples sitios donadores internos (Shull y Greeb, 1988), los cuales pueden originar isoformas en las que se incluyen 29 (PMCA 1c) o 38 (PMCA 1d) residuos de aminoácidos. El inserto de los 29 o 38 residuos ocurre al final del subdominio A localizado en el sitio de unión a calmodulina (Fig. 2) y produce las isoformas **c** y **d** respectivamente; estas isoformas contienen un duplicado de el subdominio B que une a calmodulina, lo cual permite pensar que las isoformas que se producen en el sitio C presentan diferente afinidad por calmodulina y por lo tanto, tener un significado funcional diferente (Strehler, 1991; Carafoli, 1992).

El sitio D (Fig. 2) se relaciona con el sitio de fosforilación por la proteína cinasa A. La edición alterna en este sitio puede producir variantes que pierden la secuencia del sitio de fosforilación dependiente de AMPc como es la isoforma h PMCA 4 que se expresa principalmente en eritrocitos humanos (Strehler, 1991; Carafoli, 1992).

Análisis por Northern e hibridización de RNA aislado de varios tejidos indican que por lo menos una isoforma de la PMCA (PMCA 1) se expresa en todos los tejidos, mientras que otras (PMCA 2 y PMCA 3) se expresan de manera específica de tejido. Los RNAm de PMCA 2 se expresan predominantemente en cerebro y corazón y los de PMCA 3 en cerebro y músculo esquelético (Greeb y Shull, 1989).

Los análisis de hidrofobicidad sugieren la presencia de 10 dominios transmembranales (TM) (Brandl y cols., 1986). Alrededor del 80% de la masa total de la ATPasa protruye hacia el citoplasma y los sectores transmembranales en el lado externo de la membrana se conectan a través de enlaces muy cortos. Tres unidades protruyen entre los dominios

TM 2 y 3, 4 y 5 y el dominio 10 (Fig. 3). El primero corresponde a la unidad "transdutora", similar a otras ATPasas tipo P (Mac Lennan y cols., 1985). La segunda unidad presenta una región en "bisagra" que contiene los sitios del aspartil-fosfato y de unión a FITC, considerados como los sitios de unión al nucleótido; además, contiene un sitio receptor "inhibitorio" que interactúa con el dominio de unión a calmodulina en ausencia de ésta y Ca^{2+} (Enyedi y cols., 1989). La tercera unidad presenta el dominio "regulador" que contiene el sitio de unión a calmodulina con dos subdominios: A y B. El subdominio A comprende una longitud mínima de 20 residuos para unir a calmodulina con alta afinidad e interactúa preferentemente con el C-terminal del lóbulo de calmodulina que une a Ca^{2+} (Vorherr y cols., 1990). Por otro lado, en la porción media N-terminal de esta región se conserva un Trp y un Phe cercanos entre sí, los cuales son necesarios para la óptima interacción con calmodulina. Se ha indicado que la región que une a calmodulina funciona como un dominio "inhibitorio" que previene la unión de Ca^{2+} con alta afinidad en ausencia de calmodulina (Benaim y cols., 1984).

La porción N-terminal de la PMCA, localizada intracelularmente, puede variar considerablemente entre las diferentes isoformas. Esta región contiene una secuencia de 50 residuos involucrados en la sensibilidad a fosfolípidos ácidos y ácidos grasos poliinsaturados (Strehler, 1991; Carafoli, 1992).

Como se mencionó previamente, las isoformas se expresan de manera tejido específica (Greeb y Shull, 1989) y un caso particular corresponde al hepatocito, en donde la isoforma de la PMCA que se expresa predominantemente es insensible a calmodulina y presenta una mayor afinidad por Ca^{2+} . Sorprendentemente, la bomba de Ca^{2+} en el hígado contiene un dominio que une calmodulina con alta afinidad, a pesar de su pérdida de respuesta a calmodulina (Kessler y cols., 1990). Otras propiedades peculiares de la enzima aislada del hígado es su activación por una proteína específica hepática (Lotersztajn, 1981), presenta un peso molecular ligeramente mayor a las otras bombas de Ca^{2+} , alrededor de 140 kDa (Kessler y cols., 1990) y tiene una baja especificidad por el nucleótido (Chan y Junger, 1983).

1.2. Ciclo catalítico de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de la membrana plasmática.

La figura 4 ilustra el esquema de reacciones de el ciclo catalítico de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) propuesta para el eritrocito y aplicable a las ATPasas de Ca²⁺ de la membrana plasmática de otros tipos celulares.

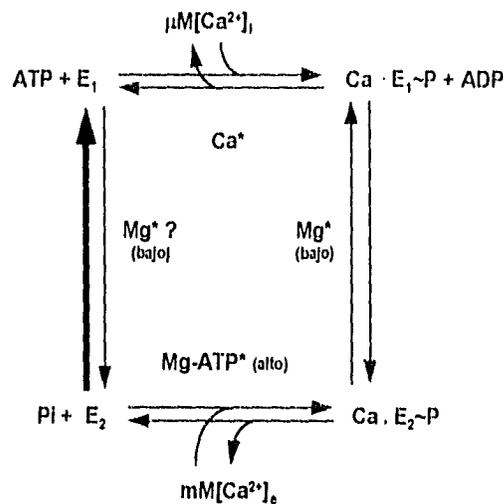


Fig. 4. Ciclo enzimático de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de membrana plasmática. La proteína hidroliza al ATP de manera cíclica a través de dos estados conformacionales (E₁ y E₂) en dirección de las manecillas del reloj. La fosforilación por ATP en un grupo acil de E₁ inicia el ciclo. Este paso requiere Ca²⁺. La transformación de E₁ ~ P → E₂ ~ P requiere Mg²⁺. La desfosforilación requiere concentraciones altas de ATP (o Mg-ATP). El Ca²⁺ interno se une a la proteína antes de la fosforilación. E₁ es la forma que presenta el sitio de unión a Ca²⁺ en la superficie interna de la membrana. El Ca²⁺ que se libera al medio puede ocurrir en la desfosforilación. Los asteriscos indican los requerimientos de las reacciones parciales.

El esquema se basa en experimentos de velocidad de fosforilación y desfosforilación de la enzima, en los efectos de Mg²⁺ y de los inhibidores

La^{3+} y vanadato (Carafoli y cols., 1982; Schatzmann, 1982). La fosforilación de la enzima requiere la presencia de Ca^{2+} . La afinidad por Ca^{2+} es alta aún en ausencia de ATP (Richards y cols., 1977) y el Ca^{2+} no influye en la afinidad por el nucleótido (Schatzmann, 1982). El Mg-ATP es el sustrato, pero en ausencia de Mg^{2+} existe actividad enzimática baja sostenida por ATP libre o Ca-ATP (Muallem y Karlsh, 1981). El intermediario fosforilado puede estar en dos estados conformacionales ($\text{E}_1\sim\text{P}$, $\text{E}_2\sim\text{P}$) y su interconversión se basa en los requerimientos de Mg^{2+} durante el ciclo catalítico. La transición de $\text{E}_1\sim\text{P}$ a $\text{E}_2\sim\text{P}$ se incrementa con el aumento de Mg-ATP, debido a que concentraciones altas de ATP ($\geq 100 \mu\text{M}$) aceleran la desfosforilación, lo que concuerda con el hallazgo de dos sitios de afinidad para el ATP y para el transporte de Ca^{2+} (Muallem y Karlsh, 1981). El La^{3+} bloquea la interconversión de los intermediarios fosforilados. Con 0.2 mM de La^{3+} la desfosforilación hacia adelante es imposible, pero la reacción en reversa (con exceso de ADP) es rápida (Schatzmann y Bürgin, 1978). Si el La^{3+} se añade después de que la fosforilación se ha llevado a cabo en ausencia de Mg^{2+} , la adición de ATP (0.5 mM) y Mg^{2+} (1 mM) inician una caída insignificante de el intermediario fosforilado; pero si el Mg^{2+} esta presente durante la fosforilación, el La^{3+} no detiene la desfosforilación que produce la adición de ATP (+ Mg^{2+}) (Schatzmann, 1983).

La hidrólisis de ATP ocurre vía un intermediario acilfosfato, en donde el fosfato se une covalentemente a un residuo aspartilo de la proteína (Knauf y cols., 1974; Tanford, 1983). La enzima puede existir en dos diferentes estados conformacionales, denominados E_1 y E_2 . Aparentemente estas dos conformaciones tienen diferente afinidad por Ca^{2+} y ATP, así como una orientación diferente en el plano de la membrana; esto es, con un sitio de alta afinidad para Ca^{2+} orientado hacia el interior y otro de baja afinidad orientado hacia el exterior cuando la enzima realiza su función; sin embargo, podría tratarse de un mismo sitio con cambios en la afinidad por Ca^{2+} durante el ciclo catalítico. La forma E_1 posee un sitio catalítico de alta afinidad para el ATP y en E_2 este sitio se convierte en un sitio no catalítico de baja afinidad por el nucleótido. La formación de $\text{E}_1\sim\text{P}$ es endergónica y absolutamente dependiente de Ca^{2+} aunque el Mg^{2+} puede estimularlo; pero la dirección de la reacción se realiza hacia la formación de $\text{E}_2 + \text{P}_i$ debido al carácter fuertemente exergónico del paso $\text{E}_2\sim\text{P} \rightarrow \text{E}_2 + \text{P}_i$, el cual parece acelerarse con Mg^{2+} y ATP. La transición de E_2 a E_1 parece estar favorecida por la presencia de ATP (Carafoli y col., 1982; Rega y col., 1986;

INTRODUCCION

Mas-Oliva, 1987). Mientras que concentraciones bajas de Ca^{2+} favorecen la hidrólisis de ATP, la reacción en reversa es favorecida utilizando concentraciones milimolares de Ca^{2+} , induciendo la síntesis de ATP a partir de P_i y ADP (Mas-Oliva y cols., 1983; Mas-Oliva, 1985).

Estudios realizados en células hepáticas normales, en regeneración y tumorales sobre el acoplamiento entre la actividad de la ATPasa- ($\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$) y el transporte de calcio demuestran que existe un mayor acoplamiento en las células transformadas, debido a que la reacción de intercambio $\text{ATP} \leftrightarrow \text{P}_i$ es similar a la observada en células normales pero la actividad de hidrólisis es mucho menor en las transformadas. Esto sugiere un mecanismo mas eficiente en las células hepáticas tumorales para regular los movimientos de calcio con un gasto menor de energía (Mas-Oliva y cols., 1990).

1.3. Regulación de la actividad catalítica de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de la membrana plasmática.

Diversos estudios sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de la membrana plasmática han demostrado que puede ser modificada por diferentes factores que incluyen calmodulina, lípidos, proteólisis limitada, solventes orgánicos, iones inorgánicos, proteína cinasas, fármacos antagonistas de calmodulina y moléculas que se unen covalentemente a proteínas.

a) Regulación por calmodulina.

Como se mencionó previamente, la proteína soluble de alta afinidad por Ca²⁺, denominada calmodulina, estimula la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de la membrana plasmática en paralelo al transporte de calcio. La estimulación de la actividad enzimática está dada por una disminución en la Km para el Ca²⁺, así como por un incremento en la Vmax de la reacción (Gopinath y col.,1977; Jarrett y col., 1977; Waissman y cols., 1981; Larsen y cols., 1981; Carafoli y col., 1982; Rega y col., 1986; Mas-Oliva, 1987).

La calmodulina es una proteína ubicuita que se considera como un receptor de Ca²⁺ intracelular multifuncional que regula diferentes procesos celulares, entre los cuales se encuentran el metabolismo de nucleótidos cíclicos, la contracción, la motilidad celular, la proliferación y la diferenciación celular (Rega y Garrahan, 1986). La calmodulina de vertebrados presenta la misma secuencia de aminoácidos, mientras que solo presenta el 90% de similitud con la calmodulina procedente de plantas y protozoarios. La calmodulina es una proteína de una sola cadena de 148 aminoácidos que forma dos lóbulos estructuralmente similares conectados por una α -hélice de siete vueltas y cada lóbulo contiene dos sitios de unión a Ca²⁺. Dentro de las calmodulinas de eucariontes, la calmodulina de levadura es la más diferente a la calmodulina de vertebrados, debido a que solamente presenta tres sitios de unión a Ca²⁺. Estudios realizados *in vitro* han demostrado que la mitad de la molécula de calmodulina

(residuos 1 a 77 y 78 a 148 de la calmodulina de vertebrados) es suficiente para la activación de tres enzimas: fosforilasa cinasa, ATPasa de membrana plasmática y adenilato ciclasa bacteriana (Ohya y Anraku, 1992).

Se ha demostrado que la calmodulina es un componente indispensable para el crecimiento celular que se sintetiza durante el ciclo celular en el enlace de las fases G₁/S. En células de mamíferos, un aumento en el nivel de calmodulina acelera la velocidad de proliferación celular y una disminución detiene transitoriamente la progresión del ciclo celular en las fases G₁ y M (Means y Rasmussen, 1988). El nivel de calmodulina puede aumentar en células transformadas por virus oncogénicos, carcinógenos químicos u hormonas (Veigl y cols., 1982; Criss y Kakiuchi, 1982; Means y Rasmussen, 1988). La alteración de los niveles intracelulares de calmodulina puede expresarse a través de alteraciones en los sistemas que son regulados por los niveles de Ca²⁺ intracelular. El Ca²⁺ extracelular también modula la proliferación celular de células normales, como en las del hígado, controlando la síntesis de DNA; sin embargo, en células neoplásicas incluyendo las hepáticas, la síntesis de DNA es independiente del Ca²⁺ extracelular (Mac Manus y cols., 1989).

En la mayoría de los tumores se ha encontrado una proteína con peso molecular de 11,000, relacionada genéticamente con proteínas que unen a Ca²⁺, como son la troponina C, la calmodulina y la parvalbúmina, a la cual se ha denominado oncomodulina. La oncomodulina presenta un 50% de similitud con la parvalbúmina, une Ca²⁺ y se expresa durante el desarrollo prenatal en la placenta pero no en el feto y no se ha detectado en células normales en el adulto humano (Mac Manus, 1980; Mac Manus y cols., 1989). En células de hepatoma se ha encontrado que el calcio total intracelular aumenta, así como la actividad de calmodulina en el citoplasma y se sintetiza oncomodulina (Criss y col., 1982).

b) Regulación por lípidos.

La actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de la membrana plasmática, al igual que otra serie de proteínas y enzimas de diversas membranas está regulada por la composición lipídica de la bicapa. El tratamiento de las membranas con fosfolipasas suprime la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), sin embargo, la actividad se restablece con la adición de lípidos exógenos (Richards y cols., 1977; Roelofsen y Schatzmann, 1977; Ronner y cols., 1977). La solubilización de la membrana con detergentes inactiva irreversiblemente a la enzima, pero al añadir fosfolípidos al medio de solubilización, se previene la inactivación (Niggli y cols., 1971; Gietzen y cols., 1980). La disponibilidad de preparaciones de ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) purificada, junto con el desarrollo de procedimientos para reconstituir a la enzima en vesículas de composición controlada, facilitan los estudios de interacción de la enzima con su ambiente lipídico. Estos estudios han permitido establecer que para preservar la integridad estructural y funcional de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) no se requiere de una clase específica de lípido de membrana, pero que los efectos de calmodulina son altamente dependientes de la composición del ambiente lipídico (Rega y col., 1986). De manera que cuando la enzima se reconstituye con fosfolípidos ácidos como fosfatidilserina (PS) o ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (18 C), la ATPasa actúa como si hubiera calmodulina, adquiriendo las características de alta afinidad por Ca²⁺ y alta actividad hidrolítica, pero pierde la capacidad de ser estimulada por calmodulina; mientras que esta estimulación es máxima cuando la enzima se reconstituye en fosfolípidos neutros como fosfatidilcolina (PC) (Niggli y cols., 1981; Carafoli y col., 1982). Además, se ha encontrado que los polifosfoinosítidos son activadores potentes de la ATPasa -(Ca²⁺,Mg²⁺) reconstituída, los cuales aumentan la Vmax, la afinidad por el ion calcio y ligeramente la cooperatividad por Ca²⁺ de la enzima (Carafoli y col., 1982; Penniston, 1982).

La potencia relativa de los fosfolípidos ácidos en la estimulación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) es la siguiente: fosfatidilinositol-difosfato (PIP2) > fosfatidilinositol-monofosfato (PIP) > ácido fosfatídico (PA) > fosfatidilinositol (PI) = PS > PC. El PIP, PIP2 y el PA tienen un efecto bifásico, produciendo estimulación a bajas concentraciones y un efecto inhibitorio a concentraciones altas; mientras que PS y PI tienen un

efecto estimulador que depende de la concentración (Missiaen y cols., 1989). Al parecer, el efecto estimulador de calmodulina se pierde en presencia de lípidos ácidos pero no su unión, ya que la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de la membrana plasmática solubilizada en presencia de PS es retenida en columnas de calmodulina-sefarosa con la misma eficiencia que al ser solubilizada en presencia de PC (Niggli y cols., 1979; Gietzen y cols., 1980).

Por otro lado, en nuestro laboratorio hemos encontrado que los niveles de colesterol de la membrana plasmática pueden modular la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) (Ortega y Mas-Oliva, 1984; Mas-Oliva y Santiago-García, 1990). Se ha demostrado que la actividad hidrolítica de la enzima es inversamente proporcional a la concentración de colesterol en la sarcolema cardíaca; observándose una actividad hidrolítica baja asociada a un contenido alto de colesterol, en contraste con una actividad hidrolítica alta en presencia de concentraciones bajas de colesterol (Ortega y Mas-Oliva, 1984 y 1986). Recientemente se ha demostrado una relación directa entre la concentración de colesterol de la sarcolema cardíaca y el fenómeno de termoestabilidad en la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺). Se ha observado que al aumentar la concentración de colesterol en el sistema membranar, la ATPasa es más termoestable, aunque presenta una actividad hidrolítica baja; sin embargo, este fenómeno no se presenta en el caso de membranas desprovistas de colesterol, en donde se observa una alta sensibilidad a la temperatura. Las diferentes concentraciones de colesterol en la membrana plasmática únicamente afectan la V_{max} de la reacción de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sin observarse cambios aparentes en la K_m de la enzima por el ATP (Mas-Oliva y Santiago-García, 1990). Una propuesta para explicar los diferentes resultados de termoestabilidad enzimática, ha sido el relacionar este fenómeno con el desdoblamiento de las proteínas, el cual resultaría en una disminución en las fuerzas que mantienen la conformación nativa de las proteínas (Cheng y cols., 1987). Más aún, existen evidencias que permiten proponer al agua como responsable de muchas interacciones no covalentes en diferentes sistemas enzimáticos. Con base en estas observaciones y a la propuesta de que el colesterol es capaz de reducir la hidratación de la bicapa lipídica (Simon y cols., 1982), se ha planteado la posibilidad de que el arreglo normal de uniones de hidrógeno entre el agua y los diferentes fosfolípidos sea alterada al introducir colesterol al sistema. Este tipo de observaciones han auxiliado en el diseño de experimentos en donde

enzimas de la membrana interna mitocondrial (H^+ -ATPasa y citocromo oxidasa) han sido estudiadas en presencia de solventes orgánicos, encontrándose que la termoestabilidad enzimática aumenta varias órdenes de magnitud y se modifica importantemente por el contenido de agua en el solvente (Ayala y cols., 1986). El estudio de la actividad catalítica de la F_1 de la ATPasa mitocondrial en solventes orgánicos, demuestra que la enzima adquiere un estado catalítico progresivo en paralelo con una rápida desnaturalización térmica (Garza-Ramos y cols., 1989). Por otro lado, se ha reportado que los solventes orgánicos mimetizan los efectos estimuladores de calmodulina y de fosfolípidos ácidos sobre la ATPasa- (Ca^{2+}, Mg^{2+}) de membrana plasmática. Los solventes orgánicos aumentan la afinidad por Ca^{2+} y el número de recambio de la enzima. El incremento en la afinidad por Ca^{2+} es superior a la obtenida con calmodulina. La cooperatividad por calcio observada en presencia de calmodulina desaparece después de la adición de dimetilsulfóxido al medio de ensayo (Simon y cols., 1982; Benaim y de Meis, 1989). Los efectos de solventes orgánicos sobre la ATPasa- (Ca^{2+}, Mg^{2+}) de membrana plasmática difieren de los que se observan en la ATPasa- (Ca^{2+}, Mg^{2+}) del RS, debido a que en la última no modifica la afinidad por Ca^{2+} y la actividad catalítica se inhibe con concentraciones de dimetilsulfóxido que activan al máximo a la enzima de membrana plasmática (The y Hasselbach, 1977).

c) Regulación por proteólisis controlada.

La actividad de la ATPasa- (Ca^{2+}, Mg^{2+}) de la membrana plasmática puede ser estimulada por tratamiento controlado con tripsina (Taverna y Hanahan, 1980; Sarkadi y cols., 1980). Se ha observado que la máxima activación resulta de la liberación de un fragmento triptico de alrededor de Mr 30 kDa de la ATPasa. El tratamiento controlado con tripsina reproduce los efectos de calmodulina sobre los parámetros cinéticos de la enzima, pero se pierde la sensibilidad a la calmodulina (Sarkadi y cols., 1980; Carafoli y Zurini., 1982; Benaim y cols., 1984; Missiaen y cols., 1989).

La exposición de la ATPasa- (Ca^{2+}, Mg^{2+}) a tripsina en presencia de diferentes efectores de la actividad, modifica el patrón proteolítico de la

enzima, encontrándose la acumulación de un polipéptido de Mr 85 kDa cuando la enzima ha sido tratada con altas concentraciones de Ca^{2+} y calmodulina y otro polipéptido de Mr 81 kDa cuando ha sido tratada con VO_3^- y Mg^{2+} . Ambos fragmentos provienen de intermediario de Mr 90 kDa que presenta actividad hidrolítica dependiente de Ca^{2+} y calmodulina y que mantiene su capacidad de transporte de calcio en liposomas reconstituídos de PC. Los fragmentos de 85 y 81 kDa reconstituídos en liposomas presentan diferencias en su actividad hidrolítica y de transporte de calcio. El primero mantiene su capacidad de unión a calmodulina pero presenta una menor capacidad hidrolítica y de transporte de calcio que no es estimulada por calmodulina y el segundo fragmento pierde su capacidad de unión a calmodulina pero presenta una mayor capacidad hidrolítica y de transporte de calcio (Carafoli y Zurini., 1982; Caroni y cols., 1983; Benaim y cols., 1984 y 1986).

d) Regulación por proteína cinasas.

La ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ de la membrana plasmática es regulada por fosforilación a través de proteína cinasas. El sitio de fosforilación se localiza entre el C-terminal y el dominio de unión a calmodulina. La proteína cinasa A estimula a la bomba tanto *in situ* (Sarkadi y cols., 1980), como en el estado purificado (Smallwood y cols., 1988). La proteína cinasa C también fosforila a la bomba de Ca^{2+} , pero no es claro si la fosforilación está ligada a su activación (Caroni y Carafoli, 1981b; Wang y cols., 1991).

e) Regulación por oligomerización de la enzima.

Recientemente se ha establecido que la asociación de monómeros de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de la membrana plasmática del eritrocito en una estructura oligomérica (dímero) es una característica importante para la activación de la enzima (Kosk-Kosicka y Bzdega, 1988, 1990; Kosk-Kosicka y cols., 1989; Coelho-Sampaio y cols., 1991). Como se mencionó previamente, la enzima alterna entre dos estados conformacionales E₁ y E₂ durante su ciclo catalítico. La unión de Ca²⁺ cambia el equilibrio hacia E₁ (Adamo y cols., 1988), mientras que el vanadato estabiliza el estado E₂ (Barrabin y cols., 1980). La predominancia de un estado de la enzima sobre el otro afecta el equilibrio monómero/ dímero (Coelho-Sampaio y cols., 1991). En presencia de Ca²⁺ la interacción entre unidades de la enzima es más fuerte en E₁ que en E₂. La calmodulina en presencia de Ca²⁺ no tiene efecto adicional en el equilibrio de asociación de la ATPasa (Kosk-Kosicka y Bzdega, 1990; Coelho-Sampaio y cols., 1991). Para explicar esto, se propone que la calmodulina acelera la interconversión entre E₁ y E₂ en ambas direcciones, en lugar de favorecer el equilibrio hacia E₁, como fue propuesto por Adamo y cols. en 1988; o bien, que el equilibrio entre los dos estados conformacionales se cambia hacia E₁ por la adición de calcio y por esta razón no existe efecto de calmodulina sobre la disociación de la ATPasa (Coelho-Sampaio y cols., 1991). Sin embargo, Carafoli (1992) manifiesta que si la oligomerización ocurre *in vivo*, probablemente refleje solamente la asociación de monómeros al azar.

f) Inhibidores de la ATPasa -(Ca²⁺, Mg²⁺).

Aunque no se conoce un inhibidor específico de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), como los glucósidos cardiotónicos en el caso de la ATPasa-(Na⁺/K⁺), existen muy diferentes tipos de sustancias que inhiben a la bomba de Ca²⁺, lo que ha permitido conocer acerca del mecanismo de transporte activo de la reacción. Las sustancias inhibitoras de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) comprenden iones inorgánicos, fármacos antagonistas de calmodulina y compuestos que reaccionan con grupos funcionales de las proteínas (Schatzmann, 1982; Rega y col, 1986).

Los lantánidos inhiben la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) en menor grado que el transporte activo de Ca²⁺, probablemente debido a que estos cationes son capaces de combinarse con el sitio de unión para Ca²⁺. La inhibición por La³⁺ ha permitido conocer el mecanismo de reacción de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), debido a que se ha encontrado que durante la inhibición, el nivel de la fosfoenzima en el estado estacionario aumenta, lo cual ha permitido concluir que la formación de un intermediario fosforilado precede al transporte de Ca²⁺ (Szász y cols., 1978b; Schatzmann, 1982).

El vanadato (VO₃⁻) inhibe a la mayoría de las ATPasas tipo P y es uno de los inhibidores más comúnmente empleados para estudiar a la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de membrana plasmática. El VO₃⁻ inhibe con alta afinidad (K_i = 3 μM) la actividad hidrolítica y el transporte de Ca²⁺ de la enzima, y disminuye el nivel de fosfoenzima en el estado estacionario. La eficiencia del VO₃⁻ como inhibidor depende de la fuerza iónica del medio y de la concentración de ATP. En ausencia de Mg²⁺, el VO₃⁻ no produce inhibición y el K⁺ en presencia de Mg²⁺ aumenta el efecto inhibitor del anión. Las concentraciones bajas de Ca²⁺ que se requieren para la activación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) no afectan la afinidad aparente para la inhibición por VO₃⁻, pero concentraciones altas de Ca²⁺ suprimen progresivamente la inhibición por VO₃⁻ (Barrabin y cols., 1980; Schatzmann, 1982).

Las fenotiacinas, en particular la trifluoperacina y las butirofenonas, han sido las drogas más comúnmente usadas como antagonistas de calmodulina e inhiben la actividad estimulada por calmodulina de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de RS y de membrana plasmática. La mayoría de los antagonistas de calmodulina son cationes anfifílicos que se unen a la región hidrofóbica expuesta por Ca²⁺ en la calmodulina y bloquean competitivamente su interacción con las enzimas blanco. Uno de los efectos colaterales de los antagonistas de calmodulina es la inhibición de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) en ausencia de calmodulina y la inhibición de los efectos estimuladores de los lípidos ácidos y de la proteólisis limitada. Además, estos antagonistas inhiben otras ATPasas de membrana independientes de calmodulina y otros sistemas transportadores de calcio. Los antagonistas de calmodulina más utilizados en el estudio de la ATPasa-

(Ca^{2+} , Mg^{2+}) son el calmidazolium y el compuesto 48/80 que al parecer son más selectivos, debido a que no actúan sobre otras ATPasas y no presentan efectos sobre lípidos ácidos o actividad proteolítica (Schatzmann, 1982; Rega y col., 1986).

Otro agente inhibidor de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) es la N-etilmaleimida (NEM), que actúa de diferente manera en presencia o ausencia de los ligandos fisiológicos. El ATP, Na^+ y K^+ protegen parcialmente contra la inhibición de este compuesto. El Ca^{2+} aumenta la sensibilidad de la enzima a NEM (Schatzmann, 1982; Rega y col., 1986).

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es un ligando que se une covalentemente a los sitios de unión de ATP en las ATPasas transportadoras de cationes. El FITC inhibe irreversiblemente la actividad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) y el transporte de Ca^{2+} . La curva de inhibición del FITC es bifásica, indicando la presencia de dos sitios de unión para el ATP, uno de alta afinidad y otro de baja afinidad. La inhibición se previene completamente con ATP (Schatzmann, 1982; Muallem y Karlsh, 1983; Rega y col., 1986).

II. OBJETIVOS.

Diferentes trabajos han demostrado que la calmodulina estimula la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) y el transporte de calcio. Así también, estudios sobre la formación del intermediario fosforilado de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), indican que la calmodulina estimula la velocidad de fosforilación de la enzima sin cambiar el nivel de EP en el estado estacionario (Muallem y col., 1981; Allen y cols., 1987), lo cual ha sugerido que la calmodulina ejerce su efecto regulador en las reacciones de fosforilación y de desfosforilación de la enzima durante su ciclo catalítico. La mayoría de los estudios de la regulación de calmodulina sobre el intermediario fosforilado de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) se han realizado en la enzima procedente de fantasmas de eritrocito y es poco lo que se conoce acerca de este efecto en la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de sarcolema cardíaca.

Los datos obtenidos de los estudios de fosforilación de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de eritrocitos, plantean la posibilidad de que si la calmodulina estimula la velocidad de fosforilación sin cambiar el nivel de EP en el estado estacionario, el efecto regulador de la proteína podría efectuarse antes de que la enzima alcance el estado estacionario. Por este motivo y con el propósito de estudiar los mecanismos de regulación de calmodulina sobre el intermediario fosforilado de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de la sarcolema cardíaca durante su ciclo catalítico se plantearon los siguientes objetivos:

- 1) Diseñar y aislar a nivel preparativo una fracción microsomal cardíaca de bovino deficientes en calmodulina para aumentar el rendimiento en la purificación de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) sarcolemal.
 - 2) Caracterizar la fracción microsomal cardíaca de bovino en su contenido enzimático.
 - 3) Purificar a la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de sarcolema cardíaca mediante técnicas de cromatografía de afinidad, haciendo un
-

OBJETIVOS

estudio comparativo con la enzima purificada de fantasmas de eritrocito.

- 4) Determinar el sitio de acción de la calmodulina dentro del ciclo catalítico de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) y definir su efecto sobre el intermediario fosforilado de la enzima.

III. MATERIALES Y METODOS.

III.1. MATERIALES.

Todos los reactivos químicos empleados en el presente trabajo fueron de alto grado de pureza, disponibles comercialmente. El ATP, el DTT, el Trizma base, el HEPES, la azida de sodio, el EDTA, el EGTA, el SDS, el citrato de sodio, el ácido málico, la ouabaína, la oligomicina, el vanadato, el lantano, el Triton X-100, la fosfatidilcolina tipo IV-S de frijol de soya, la sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno, la acrilamida y los marcadores de peso molecular fueron obtenidos de Sigma Chemicals (St. Louis, MO.) y el TCA de Merck (México). La fenil-sefarosa de Pharmacia.

La fosfatidilcolina empleada se lavó previamente con acetona-éter para eliminar los ácidos grasos libres y lípidos peroxidados, siguiendo el procedimiento de Kagawa y Racker (1971).

El Arsenazo III purificado fue amablemente donado por el Dr. Edmundo Chávez, Instituto Nacional de Cardiología.

Las unidades de sangre total fueron proporcionadas por los Bancos de Sangre de el Instituto Nacional de Cardiología y de el Hospital General de la S.S.

III. 2. METODOS.

III.2.1. Método preparativo de aislamiento de microsomas cardíacos de bovino deficientes en calmodulina.

Después de extraer el corazón de la res, se coloca en hielo y se lava con una solución que contiene NaHCO_3 10 mM y azida de sodio 0.5 mM, pH 7.0 (solución **A**). Todo el procedimiento se lleva a cabo a 4 °C. El tejido muscular se disecciona de grasa, grandes vasos, pericardio y cuerdas tendinosas, y se corta en pedazos pequeños de aproximadamente 1 a 2 cm^3 , que se emplean inmediatamente o se guardan a -80 °C para su posterior utilización.

La figura 5 esquematiza el procedimiento de nuestra modificación al método de Van Alstyne y cols. descrito en 1980 para el aislamiento de microsomas cardíacos de perro. El tejido cardíaco de bovino se homogeniza con 2 volúmenes de la solución **A** en una licuadora a velocidad máxima durante 2 minutos (dos veces). Se añaden 5 volúmenes de solución **A** y se rehomogeniza el tejido en un Ultra-Turrax T-25 a velocidad máxima con 5 pulsos de 5 segundos cada uno. Este segundo homogenizado se licúa nuevamente con 2 pulsos de 2 minutos y se filtra a través de gasa de algodón y el filtrado se centrifuga a 8,700 x g x 30 minutos para obtener la pastilla 1 y el sobrenadante 1 que se separa y almacena. La pastilla 1 presenta dos porciones, una superior de color café, que se extrae con una cucharilla (se descarta) y otra inferior de color rosa pálido, la cual se resuspende en 5 a 6 volúmenes de solución **A**, para homogenizarse nuevamente en licuadora a velocidad máxima con 2 pulsos de 2 minutos. La suspensión se centrifuga a 8,700 x g x 30 minutos para obtener el sobrenadante 2, el cual se mezcla con el sobrenadante 1, mientras que la pastilla 2 se descarta. La mezcla de los sobrenadantes 1 y 2 se centrifuga a 22,000 x g x 60 minutos para obtener la pastilla 3 que se resuspende en 5 a 6 volúmenes de solución **B** que contiene Tris-malato 20 mM, KCl 0.6 M, pH 6.8 y se homogeniza en un homogenizador de vidrio, pasando 5 veces el vástago de teflón. La suspensión se centrifuga a 33,000 x g x 60 minutos para obtener la pastilla 4, la cual se resuspende en 5 a 6 volúmenes de solución **C** que contiene Hepes 10 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4 y se homogeniza 5 veces en el homogenizador de vidrio-teflón. Este homogenizado se coloca sobre hielo en un agitador magnético a baja

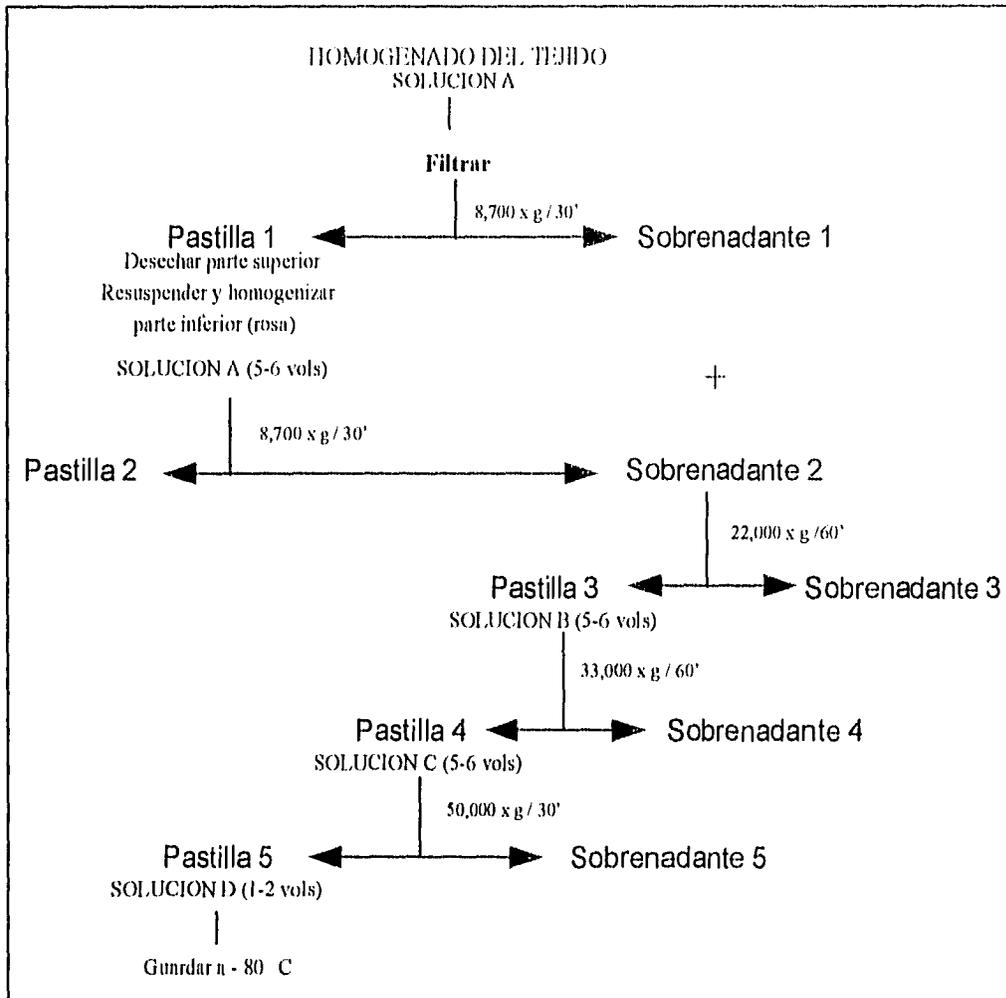


Fig. 5. Diagrama de flujo. Esquema de aislamiento de una fracción microsomal cardíaca de bovino deficiente en calmodulina. Los detalles se señalan en la sección de Métodos. Todo el procedimiento se lleva a cabo a 4°C. **Solución A:** NaHCO₃ 10 mM, NaN₃ 0.5 mM, (pH, 7). **Solución B:** Tris-malato 20 mM (pH, 6.8), KCl 0.6 M. **Solución C:** Hepes 10 mM (pH, 7.4), EDTA 2 mM, . **Solución D:** Tris-malato 50 mM (pH, 7.4), MgCl₂ 0.5 mM, CaCl₂ 50 μM.

velocidad durante 20 minutos. Posteriormente, se centrifuga a 50,000 x g x 30 minutos para obtener la pastilla 5 que se resuspende en 1 a 2 volúmenes de solución **D** que contiene Tris-malato 50 mM, MgCl₂ 0.5 mM, CaCl₂ 50 μM, DTT 2 mM, pH 7.4, y se homogeniza en el homogenizador de vidrio-teflón. Se mide el volumen obtenido y se guarda en alícuotas a -80 °C hasta su utilización.

III.2.2. Preparación de membranas de eritrocito humano deficientes en calmodulina.

Los fantasmas de eritrocito humano se preparan siguiendo la metodología de Waisman y cols. (1981) en relación a los pasos de centrifugación, pero para llevar a cabo la hemólisis y la extracción de calmodulina, se emplean las soluciones utilizadas por Niggli y cols. (1979), debido a que en el primer método se utilizan soluciones que contienen fosfato, lo cual interfiere en nuestras determinaciones de actividad enzimática.

Cada unidad de paquete globular se pesa y se considera como peso húmedo. El peso de cada unidad es de aproximadamente 200 g. El procedimiento se lleva a cabo a 4 °C. El paquete globular se resuspende en 5 volúmenes de solución **A** (isotónica), que contiene KCl 130 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7.4 y se centrifuga a 1,475 x g x 10 minutos. Se decanta suavemente el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 5 volúmenes de solución **A** para repetir el procedimiento. Las células lavadas se hemolizan resuspendiendo 2 ml de células por 35 ml de solución **B** (hipotónica) que contiene Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4 y se centrifuga a 29,000 x g x 10 minutos. El sobrenadante se aspira con una bomba de vacío y se repite el procedimiento 5 a 6 veces o hasta que la pastilla adquiere un color blanco. Se realizan 2 lavados con solución **C** que contiene Hepes 10 mM, pH 7.4. Los fantasmas libres de hemoglobina y calmodulina se resuspenden en 1 a 2 volúmenes de solución **D** que contiene Tris-malato 50 mM, CaCl₂ 50 μM, MgCl₂ 0.5 mM, DTT 2 mM, pH 7.4, se mide el volumen y se guardan en alícuotas a -80 °C.

III.2.3. Purificación de calmodulina.

La obtención de calmodulina se lleva a cabo siguiendo el método de Gopalakrishna y Anderson (1982), utilizando tejido testicular de bovino.

El tejido (250 g) se homogeniza a 4 °C con 5 pulsos de 30 segundos cada uno en una licuadora (esperando 3 minutos entre cada pulso), en 500 ml de una solución que contiene Tris-HCl 40 mM, EDTA 4 mM, NaCl 100 mM (pH 7.4) y 0.5 ml de beta-mercaptoetanol por litro de solución (solución **A**). El homogenizado se centrifuga a 10,000 rpm durante 30 minutos en un rotor GSA a 4 °C. El sobrenadante resultante se filtra a través de gasa de algodón y se colecta en hielo. Las pastillas se resuspenden en un volumen igual con solución **A**, se centrifugan y filtran en las condiciones antes mencionadas. El sobrenadante filtrado se calienta de 3 a 5 minutos en agua hirviendo en fracciones de 100 a 150 ml (hasta que el sobrenadante cambia de color y se observan grumos). Inmediatamente se enfría en una mezcla de acetona-hielo seco para centrifugarse a 10,000 rpm x 30 minutos en un rotor GSA a 4 °C. El sobrenadante resultante se dializa durante toda la noche a 4 °C con 18 litros de Tris-HCl 40 mM (pH 7.4), NaCl 100 mM y beta-mercaptoetanol (0.5 ml/ litro) (solución **B**). Posteriormente este sobrenadante se dializa 4 horas a temperatura ambiente con 4 litros de la solución **B**. El dializado se centrifuga a 8,700 rpm durante 60 minutos en un rotor GSA a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le añade CaCl_2 a una concentración final de 2 mM y se aplica a una columna de fenil-sefarosa de 50 ml (a temperatura ambiente, al igual que los siguientes pasos) . La columna se equilibra previamente con 500 ml de una solución que contiene Tris-HCl 40 mM (pH 7.4), NaCl 100 mM y CaCl_2 2 mM (solución **C**). Después de eluir la muestra, la columna se lava en primer lugar con un litro de Tris-HCl 40 mM (pH 7.4), NaCl 500 mM, CaCl_2 2 mM (solución **D**), posteriormente se lava con un litro de solución **C**. Las proteínas retenidas por la columna se eluyen con 300 a 500 ml de una solución que contiene Tris-HCl 40 mM (pH 7.4), NaCl 75 mM, EDTA 4 mM (solución **E**) y se colectan fracciones de 2 a 3 ml. Finalmente se determina la densidad óptica de las fracciones a 280 nm. Las muestras que presentan una densidad óptica mayor de 0.1 se mezclan y mantienen en refrigeración hasta su uso. La concentración de proteína se determina de acuerdo a la siguiente relación:

$$\text{valor D.O.} \cdot \frac{x}{0.221} = \text{mg / ml}$$

donde 0.221 es el coeficiente de extinción específico de calmodulina.

La proteína eluída con la solución **E** en presencia de Ca^{2+} 5 mM y en presencia de EGTA 5 mM se somete a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12% de acuerdo al método de Laemmli (1970) y se tiñen con azul de Coomassie según el método descrito por Oakley y cols. (1980), observándose una banda polipeptídica con un peso molecular cercano a los 17 kD y cuya movilidad electroforética se modifica en presencia de calcio (resultado no mostrado).

Para regenerar la resina de fenil-sefarosa, la columna se lava con 200 ml de solución **E** a la cual se le añade urea 6 M. Posteriormente con 200 ml de agua destilada (desionizada), en seguida con 200 ml de etanol al 50% y finalmente con 200 ml de la solución **C**.

III.2.4. Acoplamiento de calmodulina a Sefarosa 4B CNBr.

La calmodulina que se obtiene por el método de Gopalakrishna y col. (1982) se acopla a Sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno siguiendo el método descrito por Niggli y cols. (1979).

III.2.5. Purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de fantasmas de eritrocito humano y de microsomas cardíacos de bovino por cromatografía de afinidad.

La purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) se lleva a cabo utilizando el método descrito por Benaim y cols. (1984). Todo el procedimiento se lleva a cabo a 4 °C. Los fantasmas de eritrocito o los microsomas cardíacos se llevan a una concentración final de 5 mg de proteína/ ml con una **solución de solubilización**, la cual contiene KCl 130 mM, Hepes-KOH 10 mM (pH 7.4), MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 50 μM, DTT 2 mM. Se añade Triton X-100 al 10 % (p/v) para llevar a una concentración final de 0.4 % y se colocan sobre hielo en un agitador magnético a baja velocidad durante 10 minutos, si se trata de los fantasmas de eritrocito, o durante 20 minutos en caso de los microsomas cardíacos. El material no solubilizado se retira centrifugando a 100,000 x g durante 35 minutos. Al sobrenadante que se obtiene se añade fosfatidilcolina sonicada en Hepes-KOH 10 mM, (pH 7.4) para obtener una concentración final de 0.5 mg de PC/ ml y CaCl₂ a una concentración final de 100 μM. El solubilizado se aplica a una columna de Sefarosa 4B CNBr acoplada a calmodulina, la cual se equilibra con 2 a 3 volúmenes de solución **A** que contiene KCl 130 mM, Hepes-KOH 20 mM (pH 7.4), MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 100 μM, DTT 2 mM, fosfatidilcolina 0.5 mg/ml y Triton X-100 0.4 %. Las columnas se cargan con un flujo de 40 ml/h. Después de eluir el solubilizado, la columna se lava con 10 volúmenes de solución **A** al mismo flujo y después con 10 volúmenes de solución **B**, que contiene Triton X-100 0.05 % en lugar de 0.4 %. Posteriormente la ATPasa-(Ca²⁺·Mg²⁺) se eluye con solución **C** que contiene KCl 130 mM, Hepes-KOH (pH 7.4), MgCl₂ 1 mM, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, glicerol 10 % (v/v), fosfatidilcolina 0.5 mg/ml y Triton X-100 0.05 % a un flujo de 20 a 25 ml/h, colectándose fracciones de 0.5 a 0.6 ml. Las soluciones **B** y **C** se sonicán sobre hielo hasta clarificar, generalmente 2 a 3 veces durante 2 minutos en un sonicador de vástago Branson 250 antes de ser utilizadas en las columnas.

A las fracciones obtenidas de la última elución, se les determina la concentración de proteína y la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺). Las fracciones con mayor actividad se reúnen y se les añade MgCl₂ y CaCl₂ a concentraciones finales de 1 mM y 50 μM respectivamente, antes de guardarse en alícuotas de 0.5 ml en nitrógeno líquido.

III.2.6. Reconstitución de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) soluble en liposomas.

La ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) soluble, procedente de fantasmas de eritrocito o de microsomas cardiacos se reconstituye en liposomas de fosfatidilcolina siguiendo la metodología de Kagawa y Racker (1971) y como describen Niggli y cols. (1982). Este método consiste en añadir 100 µl de la solución que contiene la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) soluble a 50 µl de una mezcla de lípido-colato que contiene 25 mg de asoleclina, 100 µl de colato de sodio 400 mM (pH 7.4) y 400 µl de una solución compuesta de KCl 120 mM, Hepes-NaOH 20 mM (pH 7.4), MgCl₂ 1.5 mM y CaCl₂ 60 µM. Antes de añadir la enzima, la mezcla se sonica hasta claridad, generalmente 2 a 3 veces de 2 minutos a 4 °C en un sonicador de vástago Branson 250. Posteriormente, la mezcla lípido-colato con la enzima se dializa durante 18 a 24 horas a 4 °C contra 1000 volúmenes de una solución que contiene KCl 130 mM, Hepes-NaOH 20 mM (pH 7.4), DTT 1 mM, CaCl₂ 50 µM y MgCl₂ 1 mM. Después de dializar las muestras se emplean inmediatamente para medir transporte de calcio o para llevar a cabo los experimentos de fosforilación de la enzima.

III.2.7. Determinación de la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺).

La actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) se determina cuantificando el Pi liberado en la reacción hidrolítica a 37 °C. Se utilizan 50 µg de proteína microsomal o de fantasmas de eritrocito en un volumen final de 400 µl de un medio de ensayo que contiene básicamente Tris-malato 50 mM (pH 7.4), MgCl₂, CaCl₂ y ATP. Las concentraciones y las condiciones del medio de reacción se especifican en los pies de figura de los resultados.

Cuando el ensayo se realiza en presencia de calmodulina, la proteína se preincuba media hora a 0 °C antes de iniciar la reacción. La reacción se inicia al añadir la mezcla de reacción a la proteína y se incuba 10 minutos a 37 °C en un baño de temperatura constante. La reacción se detiene al añadir TCA a concentración final de 7.5 %. Se centrifugan las muestras a 3,000 rpm en una centrifuga clínica durante 5 minutos y al sobrenadante desproteinizado se le determina el Pi liberado en la reacción, siguiendo la metodología de Fiske y Subbarow (1925).

Para determinar la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) soluble, así como la incorporada a liposomas, se utiliza el método de Lanzetta y cols. (1979) que cuantifica el Pi liberado en la reacción. El reactivo de Lanzetta se prepara mezclando durante 20 minutos las soluciones **A:B** en una proporción 3:1, se filtra a través de papel filtro Whatman 1 y se añade 0.8 ml de Triton X-100 al 10 % por cada 100 ml de la mezcla. La solución **A** es una solución de verde de malaquita al 0.045% y la solución **B** es de molibdato de amonio al 4.2% en HCl 4N. Después de un minuto de haber añadido el reactivo de Lanzetta a la mezcla de reacción, se añaden 200 µl de citrato de sodio al 34% (p/v) y se lee a 600 nm en el espectrofotómetro después de 30 minutos.

Las concentraciones libres de los cationes se calculan con el programa de cómputo de A. Fabiato (1988). Las constantes de asociación se tomaron de la publicación de Martell y Sillén (1971).

III.2.8. Determinación de la actividad de la ATPasa-(Na⁺/K⁺).

La actividad de la ATPasa-(Na⁺/K⁺) se determina como la liberación de Pi a partir de ATP a 37 °C en presencia de Na⁺ y K⁺. Se emplean 50 µg de proteína microsomal o de fantasmas de eritrocito en un volumen final de 400 µl en un medio de ensayo que contiene: MgCl₂ 4 mM, ATP 3 mM, EGTA 500 µM (pH 7.4), NaCl 100 mM, KCl 200 mM a 37 °C en un baño de temperatura constante durante 10 minutos. La reacción se inicia añadiendo NaCl y KCl, y se detiene con TCA a concentración final de 7.5 %. El Pi liberado por la reacción enzimática se determina siguiendo la metodología de Fiske y Subbarow (1925).

Para determinar el efecto de ouabaina sobre la actividad enzimática de las ATPasa de (Na⁺/K⁺) y de (Ca²⁺,Mg²⁺), las membranas se preincuban a 37°C durante 10 minutos en presencia de MgCl₂ y ATP. La reacción se inicia con la adición de NaCl y KCl o CaCl₂ respectivamente. Las concentraciones se indican en los pies de figura de los resultados.

Cuando se emplean diferentes concentraciones de oligomicina en la determinación de las actividades de las ATPasas de (Na⁺/K⁺) y (Ca²⁺,Mg²⁺) de microsomas cardíacos, las membranas se preincuban

durante 30 minutos con oligomicina a 0 °C, y la reacción se inicia con la adición de la mezcla de reacción correspondiente.

III.2.9. Determinación de la concentración de proteína.

La concentración de proteína de los fantasmas de eritrocito y de los microsomas cardíacos se determina por el método de Lowry y cols. (1951), utilizando albúmina sérica de bovino como estándar.

La concentración de proteína en las fracciones purificadas, así como las incorporadas a liposomas, se determina por el método de Bensadoun y Weinstein (1976). Este procedimiento consiste en añadir 25 μ l de desoxicolato de sodio al 2% a un volumen de 3 ml de la muestra y precipitar la proteína con TCA al 24 % (1 ml), para evitar la interferencia del Triton X-100 y del Hepes. Se centrifuga a 3,000 rpm en una centrífuga clínica durante 30 minutos y se retira el sobrenadante por medio de una bomba de vacío y con la pastilla obtenida se sigue el procedimiento de Lowry y cols. (1951).

III.2.10. Transporte de calcio.

El transporte de calcio llevado a cabo por la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de microsomas cardíacos, de fantasmas de eritrocito y de la enzima reconstituída en liposomas se determina colorimétricamente empleando Arsenazo III (50 μ M) como indicador de Ca^{2+} en un volumen final de 1 ml a temperatura ambiente por medio de un espectrofotómetro de doble rayo Aminco DW-2 y utilizando como par de longitud de onda 675 y 685 nm, siguiendo la metodología descrita por Benaim y cols. (1986). El medio de ensayo contiene KCl 130 mM, Hepes-KOH 20 mM, pH 7.4, MgCl_2 0.5 mM, DTT 1 mM, 10 μ M de Ca^{2+} libre y 50 μ g de proteína de membranas de eritrocito o de microsomas cardíacos. En el caso de utilizar enzima reconstituída en liposomas, se emplean 3 a 4 μ g de proteína. La reacción se inicia al añadir ATP 50 μ M.

III.2.11. Microscopía electrónica.

Las membranas de la fracción microsomal cardíaca se fijan en una solución de glutaraldehído al 2.5 % y cacodilato de sodio 0.1 M a pH 7.4, se postfijan en una solución de tetraóxido de osmio al 1 % y cacodilato de sodio 0.1 M durante 60 minutos, se deshidratan en etanol absoluto y posteriormente se embeben en resina Epon 812.

Los cortes finos de las membranas se tiñen con acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo. Los liposomas se tiñen a través de tinción negativa, con ácido fosfotúngstico (pH, 6.2). Posteriormente se observan al microscopio electrónico (Zeiss EM-10).

III.2.12. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Las muestras se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% y al 12 % con dodecilsulfato de sodio de acuerdo al método de Laemmli (1970) y se tiñen con plata, como describen Oakley y col. (1980).

La incorporación de [P^{32}] del ATP [γ P^{32}] a la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) aislada de sarcolema cardíaca se observa en placas de autorradiografía de geles de poliacrilamida-SDS al 7.5 % de la enzima purificada expuesta a ATP [γ P^{32}]. La fosforilación de la enzima soluble se lleva a cabo incubando a la proteína en un medio que contiene Tris-malato 20 mM, pH 7.0, KCl 80 mM, $MgCl_2$ 10 mM y $CaCl_2$ 100 μ M a 0 °C. La reacción se inicia con la adición de ATP [γ P^{32}] 100 μ M y se detiene a los 3 segundos con TCA al 10 % (concentración final). La proteína se lava 3 veces en un medio ácido que contiene TCA 10 %, $Na_4P_2O_7$ 10 mM y H_3PO_4 20 mM, centrifugando a 1,300 x g a 4 °C durante 5 minutos en cada lavado y se resuspende en una solución que contiene NaH_2PO_4 70 mM, Na_2HPO_4 30 mM, pH 6.3, SDS 0.1 %, glicerol 10 % y azul de bromofenol 0.005 %. La desfosforilación de la enzima se lleva a cabo siguiendo el procedimiento anterior, excepto que antes de detener la reacción con TCA al 10 %, se añade ATP frío 5 mM y se espera 10 segundos antes de detener la reacción. De las mezclas anteriores se toman 20 μ g de proteína y se someten a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 7.5 %. Después de la electroforesis los geles se secan y se exponen en una película Kodak X-OMAT AR a -70 °C.

III.2.13. Determinación de la actividad de la succinato deshidrogenasa.

La actividad de la enzima succinato deshidrogenasa en los microsomas cardíacos se determina a temperatura ambiente, siguiendo el método descrito por Green y cols. (1955). Se emplean 37.5 μg de proteína en un volumen final de 2 ml de una solución amortiguadora de fosfatos que contiene (KH_2PO_4 / K_2HPO_4) 0.1 M, succinato de sodio 20 mM, EDTA 0.1 mM, albúmina sérica de bovino 0.05 %, metasulfato de fenanzina (PMSF) 0.81 mM, 2-3-diclorofenolindofenol (DCIP) 0.04 mM, pH 7.4. La actividad de la enzima se determina colorimétricamente empleando un espectrofotómetro de doble rayo Aminco DW-2 a 660 nm de longitud de onda.

III.2.14. Determinación de la actividad de la citocromo oxidasa.

La actividad de la citocromo oxidasa se determina a temperatura ambiente, siguiendo el método descrito por Di Mauro y cols. (1987). El método consiste en medir la velocidad de oxidación enzimática del citocromo c reducido por la citocromo oxidasa del tejido cardíaco en un volumen final de 1 ml de una solución que contiene KH_2PO_4 / K_2HPO_4 0.01 M, pH 7.4 y citocromo c reducido al 1%, se añaden 20 μg de proteína y la actividad enzimática se determina como la velocidad en la disminución de la extinción a 550 nm de longitud de onda durante 3 minutos en un espectrofotómetro Lambda 2S Perkin Elmer.

III.2.15. Determinación del nivel de fosfoenzima.

La fosforilación de la enzima se lleva a cabo siguiendo el método descrito por Mas-Oliva (1992). El método consiste en medir la incorporación de fosfato [P^{32}] de el ATP [γ P^{32}] a la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}). La enzima se incuba en una solución (A) que contiene 100 μg de proteína / ml, tris-malato 20 mM (pH, 7), KCl 80 mM, CaCl_2 100 μM y MgCl_2 a las concentraciones que se indican en las tablas y figuras de los resultados. Posteriormente, se mezcla con un volumen igual de solución (B) que contiene los mismos componentes que la solución A, excepto que en lugar

de la enzima contiene ATP . La reacción se detiene con una solución ácida (**C**) que contiene TCA al 30%, PPI 30 mM y Pi 60 mM. La mezcla rápida de las soluciones se realiza con la ayuda de un aparato Froehlich-Buerger de tres jeringas, las cuales contienen las soluciones **A,B** y **C**. Alícuotas de la mezcla anterior se filtran a través de filtros Millipore de 0.45 μm y la proteína que se obtiene se lava ocho veces con 5 ml de una solución que contiene TCA 10%, PPI 10 mM y Pi 20 mM. Los filtros se secan, se colocan en miniviales y se disuelven en 0.5 ml de dimetilformamida. La radioactividad se mide en un contador de centelleo Beckman LS 100C después de agregar líquido de centelleo. La enzima se preincuba en la solución **A** en ausencia o en presencia de calmodulina (10 mg/ml) durante dos horas en hielo antes de iniciar la reacción.

La desfosforilación de la enzima se lleva a cabo siguiendo los pasos anteriores pero antes de detener la reacción se añade ATP 10 mM no radioactivo y CaCl_2 1 mM, la reacción se detiene a los 3 segundos.

El Pi [P^{32}] liberado durante la reacción con ATP [γP^{32}] se determina utilizando el primer filtrado del procedimiento anterior. Se extrae en una fase orgánica de n-butilacetato como complejo de fosfomolibdato, siguiendo el método descrito por Carvalho y cols. (1976).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

La calmodulina estimula la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de la sarcolema cardíaca, al aumentar la afinidad por el ion calcio e incrementar la velocidad máxima de la bomba de calcio (Gopinath y col., 1977; Jarrett y col., 1977; Larsen y col., 1981; Waisman y cols., 1981; Carafoli y col., 1982; Rega y col., 1986; Mas-Oliva, 1987); sin embargo, el nivel al cual la calmodulina ejerce su regulación durante el ciclo catalítico de la enzima ha sido poco estudiado. Con base en lo anterior, decidimos investigar la regulación de calmodulina sobre los intermediarios fosforilados de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de sarcolema cardíaca.

Una de nuestras limitantes consistió en obtener suficiente cantidad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) soluble, para poder llevar a cabo los estudios, por lo cual, fue necesario diseñar el aislamiento de una fracción enriquecida de sarcolema cardíaca para escalar a nivel preparativo su purificación. Para este fin, desarrollamos una modificación al método descrito por Van Alstyne y cols. en 1980 para el aislamiento de una fracción microsomal cardíaca deficiente en calmodulina a partir de músculo cardíaco de bovino. En nuestro laboratorio, el procedimiento habitual de aislamiento de la sarcolema cardíaca (Mas-Oliva y cols., 1979) fue adaptado al que describen St. Louis y Sulake (1976), utilizando tejido ventricular cardíaco de conejos adultos machos de la raza Nueva Zelanda. Sin embargo, a pesar de que esta metodología produce una fracción altamente enriquecida de la sarcolema, su desventaja es el bajo rendimiento en proteína sarcolemal (alrededor de 2 mg/ 100 g de tejido).

La Tabla 3 muestra la cantidad de proteína sarcolemal obtenida a partir de tejido cardíaco de varias especies aislada por diferentes métodos y las actividades de las ATPasas de (Na^+/K^+), ($\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$) y (Ca^{2+} , Mg^{2+}) (St. Louis y col., 1976; Jones y cols., 1979; Mas-Oliva y cols., 1979; Morcos y Drummond, 1980; Van Alstyne y cols., 1980.). Sin embargo, la fracción sarcolemal aislada con estas metodologías no está libre de contaminación de otras membranas. A pesar de que estos autores cuantifican una variedad de actividades enzimáticas para caracterizar a las membranas obtenidas, todos están de acuerdo en tomar a la actividad de la ATPasa-(Na^+/K^+) como uno de los marcadores de la sarcolema. No todos cuantifican la actividad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) y ninguno de ellos la actividad de esta enzima

Tabla 3. Cantidad de proteína y actividades de ATPasa-(Na⁺/K⁺), ATPasa-(K⁺/Ca²⁺) y ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de sarcolema cardíaca aislada por diferentes métodos.

Espece y método	Tejido g	Proteína sarcolemal mg	ATPasa(Na ⁺ /K ⁺) μ molas Pi/mg/hr	ATPasa(K ⁺ /Ca ²⁺) ^a μ molas Pi/mg/hr	ATPasa-(Ca ²⁺ /Mg ²⁺) ^b μ molas Pi/mg/hr
hamster					
St. Louis y Suiakhe (1976)	0.53 homogenado	34 - 56	2.27 - 3.15		
perro					
Jones y cols. (1979)	150 - 200	30 - 40	36.9 ± 2.2	8.3 ± 2.2	
Morcos y Drummond (1980)	10 - 25	31 - 77.5	13.9		9.78
Van Alstyne y cols. (1980)	100	10.6	99.9 ± 3.2	2.7 ± 1.0	
conejo					
Mas-Oliva y cols. (1979)	100	2	9.76 ± 2.3		6.21

a) como marcador de RS

b) en ausencia de calmodulina

estimulada por calmodulina, a excepción del método descrito por Mas-Oliva y cols. en 1979.

De los métodos que se muestran en la Tabla 3, tomamos la metodología descrita por Van Alstyne y cols. (1980) como fundamento para establecer una modificación que nos permitiera aumentar el rendimiento en la purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de membrana plasmática, con base en su alto rendimiento en proteína sarcolemal (10.6 mg/ 100 g de tejido) y su mayor actividad de ATPasa-(Na⁺/K⁺) (99.9 ± 3.2 μmolas Pi/ mg/ h).

IV.1. Aislamiento de la fracción microsomal cardíaca de bovino deficiente en calmodulina.

Cuando llevamos a cabo las condiciones de homogenización del tejido ventricular desarrolladas en otras metodologías (St. Louis y col., 1976; Jones y cols., 1979; Morcos y Drummond, 1980; Van Alstyne y cols., 1980), los análisis de microscopía electrónica mostraron fibras contráctiles completas (Fig. 6a). Por lo cual, decidimos aumentar el tiempo de homogenización inicial del tejido en un volumen mayor de solución amortiguadora (7-8 vols.) para favorecer la ruptura de la sarcolema y disminuir la agregación del material fragmentado. El tejido conectivo, las proteínas contráctiles y algunas mitocondrias se remueven por filtración del homogenado a través de gasa de algodón y por centrifugación a baja velocidad (8,700 x g).

La Tabla 4 muestra la concentración de proteína y las actividades enzimáticas obtenidas en los diferentes pasos del procedimiento. El sobrenadante 1 que se obtiene de centrifugar el homogenado crudo del tejido, mantiene más del 65% de la actividad de las ATPasas de (Na⁺/K⁺) y de (Ca²⁺,Mg²⁺), el 50% de la actividad de la succinato deshidrogenasa y el 38 % de la actividad de la citocromo oxidasa. La pastilla 1 presenta dos porciones, una superior de color café y una inferior de color rosa. En ambas porciones el incremento en las actividades de las ATPasas de (Na⁺/K⁺) y de (Ca²⁺,Mg²⁺) es similar; sin embargo, la porción superior presenta un aumento de 1.5 veces en la actividad de la succinato deshidrogenasa que la que se presenta en la porción inferior, así como un aumento de mas de 3 veces en la actividad de la citocromo oxidasa. Por este motivo y con

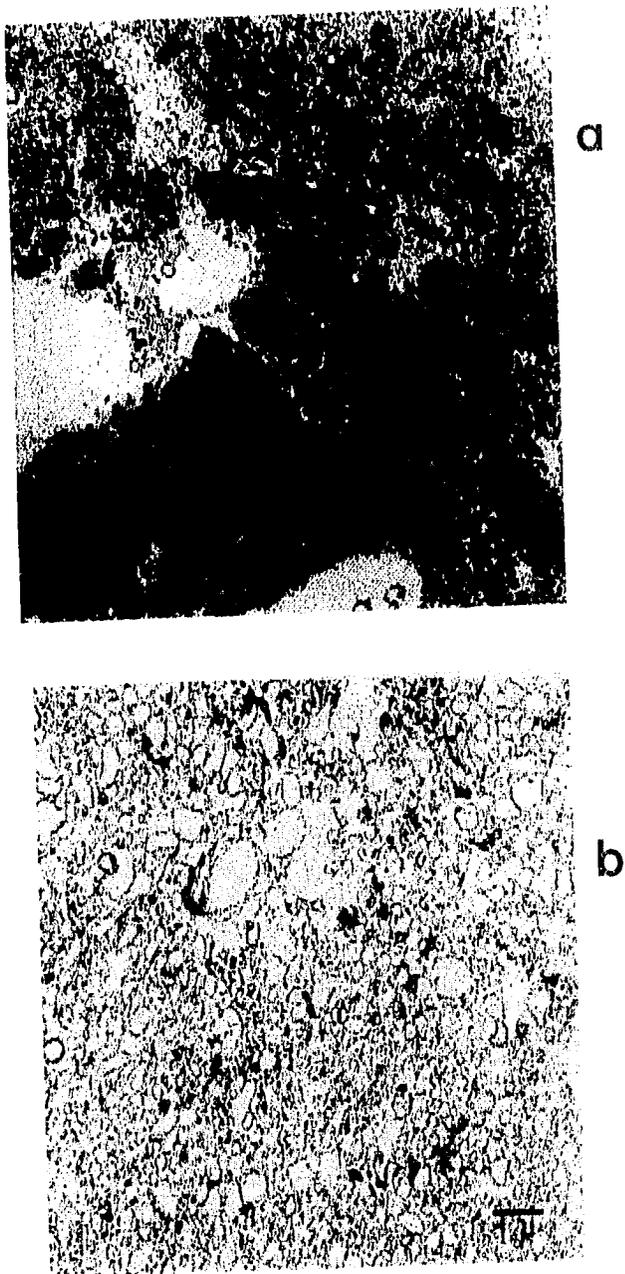


Fig.6. Micrografías electrónicas. a) Fracción celular obtenida siguiendo la metodología de Van Alstyne y cols. (1980). b) Morfología vesicular de la fracción microsomal cardíaca obtenida por el método de aislamiento modificado.

Tabla 4. Actividades enzimáticas y cantidad de proteína obtenidas en cada fracción por el método modificado de aislamiento de microsomas cardíacos de bovino.

Tejido 200g	Proteína total g	Proteína mg/ml	ATPasa-(Na ⁺ /K ⁺) nmolas Pi/mg/min	ATPasa-(Ca ²⁺ /Mg ²⁺) nmolas Pi/mg/min	Citocromo oxidasa nmolas/mg/min	Succinato deshidrogenasa μ molas/mg/min
Filtrado del homogenado	42.30	22.50	31.20	42.24	0.61	1.52
Sobrenadante 1	6.99	6.36	21.30	28.96	0.23	0.76
Pastilla 1						
café (descartada)	9.30	19.60	49.14	47.70	0.43	4.26
rosa	8.90	13.00	49.30	45.30	0.13	2.74
Sobrenadante 2	1.37	2.66	41.00	66.74	0.19	1.14
Pastilla 2 (descartada)	0.88	6.36	20.80	89.40	0.14	0.76
Pastilla 3	0.73	3.19	51.40	133.48	0.27	2.28
Pastilla 4	0.65	16.80	65.90	129.06	0.67	3.04
Pastilla 5	0.50	7.22	213.70	234.10	1.10	3.80

el fin de disminuir la contaminación de membranas mitocondriales, la porción superior (café) se descarta. La porción inferior (rosa) de la pastilla 1 se rehomoniza y centrifuga a baja velocidad para obtener el sobrenadante 2, el cual mantiene la actividad de la ATPasa-(Na⁺/K⁺), incrementa la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) y de la citocromo oxidasa y disminuye la actividad de la succinato deshidrogenasa.

En el método descrito por Van Alstyne y cols. (1980) los sobrenadantes 1 y 2 que se obtienen a través de centrifugación a baja velocidad se descartan, y la pastilla 2 la emplean para continuar el procedimiento, debido a que el incremento en la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) lo atribuyen a membranas de retículo sarcoplásmico. Sin embargo en nuestro procedimiento la pastilla 2 se descarta porque a pesar de presentar un incremento en la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), la actividad de la ATPasa-(Na⁺/K⁺) es baja. Por lo anterior, se mezclan ambos sobrenadantes (1 y 2) y se centrifugan para obtener la pastilla 3. Esta pastilla presenta un enriquecimiento en las actividades enzimáticas, pero sobre todo en la de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺). Para solubilizar las proteínas miofibrilares (Jones y cols., 1979) y extraerlas en la siguiente centrifugación, la pastilla 3 se resuspende en una solución que contiene 0.6 M de KCl. Se ha comprobado que esta concentración de cloruro de potasio no inactiva a las enzimas sarcolemales (St. Louis y Sulakhe, 1976). La pastilla 4 que se obtiene se resuspende en una solución que contiene 2 mM de EDTA y se mezcla en un agitador magnético como describen Niggli y cols. (1979) para extraer la calmodulina de los fantasmas de eritrocito; sin embargo, en la fracción microsomal cardíaca fue necesario aumentar el tiempo de agitación a 20 minutos para favorecer la extracción de calmodulina. La pastilla 5 presenta las siguientes actividades específicas de las ATPasas de (Na⁺/K⁺), de (Ca²⁺,Mg²⁺), de la succinato deshidrogenasa y de la citocromo oxidasa con valores de 213.7 nmolas Pi/mg/ min, 234.1 nmolas Pi/ mg / min , 3.8 μ molas/ mg/ min y 1.1 nmolas/mg/min respectivamente.

Como se muestra en la Tabla 4, la fracción microsomal cardíaca obtenida por la modificación al método de Van Alstyne y cols. (1980), encontramos un enriquecimiento en la actividad de la ATPasa-(Na⁺/K⁺) de 6.9 veces, lo cual es similar a lo reportado previamente (St. Louis y col., 1976; Jones y cols., 1979; Morcos y col., 1980; Van Alstyne y cols., 1980). Otro parámetro

que nos indica la presencia de sarcolema, es el enriquecimiento en la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sensible a calmodulina en estas membranas de 5.5 veces con respecto al homogenado. Si bien no fue posible alcanzar el enriquecimiento de 20 veces que obtienen Morcos y Drummond (1980) en esta actividad enzimática, el enriquecimiento de marcadores de membrana plasmática alcanzado por nuestra metodología es muy superior al de 0.25 y 0.5 que se alcanza con otros métodos (St. Louis y col., 1976; Jones y cols., 1979; Van Alstyne y cols., 1980).

La fracción microsomal cardíaca obtenida por nuestra modificación al método de Van Alstyne y cols. (1980), presenta un enriquecimiento en las actividades de las ATPasas de (Na⁺/K⁺) y de (Ca²⁺,Mg²⁺), pero no está exenta de contaminación de otras membranas. Esto se deduce con base en que también se presenta un enriquecimiento en la actividad de la succinato deshidrogenasa de 1.5 veces, que va de 1.52 μmolas/mg/min en el filtrado del homogenado a 3.8 μmolas/mg/min en la última fracción. De igual manera, la actividad de la citocromo oxidasa aumenta de 0.61 nmolas/mg/min en el filtrado del homogenado a 1.1 nmolas/mg/min en la pastilla 5, lo cual es un enriquecimiento de 1.8 veces en esta actividad durante el proceso.

Tomando en cuenta el grado de enriquecimiento en los marcadores de la sarcolema cardíaca, se decidió no emplear la centrifugación en gradientes de sacarosa que se utilizan en otras metodologías para producir fracciones más puras de sarcolema cardíaca (St. Louis y col., 1976; Jones y cols., 1979; Mas-Oliva y cols., 1979; Morcos y Drummond, 1980; Van Alstyne y cols., 1980; Kuwayama y Kanazawa, 1982). La disminución en el tiempo del procedimiento fue un punto a tomar en cuenta, pero la decisión de concluir el proceso sin llevar a cabo la centrifugación en gradientes de sacarosa fue tomada con base en la relación entre el material obtenido y el rendimiento en la purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de la fracción microsomal (Tabla 5), lo cual es similar a lo reportado en la literatura (Niggli y cols., 1979; Caroni y col., 1981a; Benaim y cols., 1984). Esta relación fue sumamente importante cuando fue necesario obtener a la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) soluble.

Tabla 5. Rendimiento en la purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sensible a calmodulina de sarcolema cardíaco de bovino y de fantasmas de eritrocito humano.

	Proteína	ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺) nmolas Pi/mg/min	
		- calmodulina	+ calmodulina
Tejido ventricular cardíaco			
200g de tejido			
Proteína microsomal	500 - 600 mg	200 - 210	320 - 340
ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺) microsomal soluble	400 - 500 µg	507 - 515	730 - 845
Fantasmas de eritrocito	800 - 825 mg	25 - 30	55 - 60
ATPasa-(Ca ²⁺ ,Mg ²⁺) de fantasmas soluble	200 - 225 µg	900 - 1000	2000 - 2100

Nuestra metodología permite partir de 200 g de tejido cardíaco de bovino y recuperar entre 500 y 600 mg de proteína microsomal . El análisis de microscopía electrónica verifica su morfología vesicular (Fig. 6b) con diámetros de entre 0.05 y 0.15 µm y el análisis enzimático asociado a éstas demuestra actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) estimulada por calmodulina (Tabla 5), acoplada al transporte de calcio , lo cual será analizado más adelante.

El aislamiento de la membrana plasmática de músculo cardíaco con un alto grado de pureza y libre de contaminación de otras membranas, como son las de retículo sarcoplásmico y las de mitocondria, ha representado muchas dificultades. De los numerosos métodos descritos en la literatura, varios involucran el tratamiento con sales de potasio (St. Louis y

col., 1976; Jones y cols., 1979; Morcos y col., 1980; Kuwayama y col., 1982) en altas concentraciones para extraer las proteínas contráctiles en combinación con centrifugación diferencial y/o separación por centrifugación en gradientes de sacarosa. Las complicaciones que pueden presentarse con la extracción prolongada de sales son remover a las proteínas extrínsecas de la membrana o la inactivación de las proteínas intrínsecas (St. Loius y col., 1976).

En este trabajo desarrollamos una modificación al método descrito por Van Alstyne y cols. en 1980, para aislar una fracción microsomal cardíaca deficiente en calmodulina que nos permite aumentar el rendimiento ulterior en la purificación de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) sarcolemal a través de cromatografía de afinidad para llevar cabo los estudios de fosforilación de la enzima.

La modificación consiste en aumentar el tiempo de homogenización del tejido en un volumen mayor de la solución amortiguadora para favorecer la ruptura de la sarcolema y disminuir la agregación del material fragmentado. Las soluciones de aislamiento fueron básicamente las mismas que emplean Van Alstyne y cols. (1980) antes de la centrifugación en gradientes de sacarosa, excepto que se incluye en el proceso una homogenización suave con KCl 0.6 M como describen Jones y cols. (1979) para solubilizar a las proteínas miofibrilares y liberar a la sarcolema y a los túbulos T adheridos a ellas y a los fragmentos celulares, lo cual produce un mayor contenido sarcolemal. En lugar de desechar los sobrenadantes 1 y 2 que se obtienen por el método original y continuar el proceso con la pastilla 2, nosotros utilizamos los sobrenadantes para continuar el procedimiento debido a su alto contenido en las actividades de la ATPasa-(Na⁺, K⁺) y de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) y desechamos la pastilla 2 por su baja actividad en ATPasa-(Na⁺/K⁺) y alta actividad en succinato deshidrogenasa (Tabla 4). Por último, se incluyó en el proceso una homogenización con EDTA 2 mM como describen Niggli y cols. (1979) para extraer la calmodulina de las membranas y producir una fracción microsomal cardíaca deficiente en calmodulina. El total de la proteína recuperada fue de 25 a 30 veces más (500-600 mg/ 200 g de tejido ventricular) que en el procedimiento original.

Las actividades enzimáticas específicas analizadas durante el proceso fueron las de ATPasa-(Na⁺/K⁺), ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sensible a calmodulina, citocromo oxidasa y succinato deshidrogenasa. El aumento en las actividades de las ATPasas de (Na⁺/K⁺) y de (Ca²⁺, Mg²⁺) de 6.9 y 5.5 veces respectivamente en la fracción microsomal con respecto al homogenado, sugieren que el procedimiento modificado de Van Alstyne y cols. (1980) produce una fracción de membranas relativamente enriquecida de sarcolema cardíaca. Sin embargo, el enriquecimiento en la actividad de la citocromo oxidasa de 1.8 veces y de la succinato deshidrogenasa de 1.5 veces reflejan la contaminación de marcadores mitocondriales. Sin embargo, a pesar de que la fracción microsomal cardíaca presenta gran contaminación de otras membranas, nos permite aumentar el rendimiento en la purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sarcolemal a través de cromatografía de afinidad, que produce del 0.08 % al 0.1 % de enzima del total de la proteína del solubilizado aplicado a la columna de afinidad (Tabla 5).

IV.2. Actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) en microsomas cardíacos y fantasmas de eritrocito.

Para tener un parámetro comparativo en la actividad y en la purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de sarcolema cardíaca de bovino, decidimos llevar a cabo en paralelo el aislamiento de fantasmas de eritrocito y la purificación de la enzima a partir de ambos tipos de membranas. La Tabla 5 muestra el rendimiento en la purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sensible a calmodulina procedente de sarcolema cardíaca de bovino y de fantasmas de eritrocito humano, donde se observa que la fracción purificada de ambas membranas presenta un enriquecimiento en la actividad enzimática que es estimulada por calmodulina.

Con el fin de establecer la relación óptima calmodulina/ ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) tanto en la fracción microsomal cardíaca como en los fantasmas de eritrocito, se determinó la actividad hidrolítica de la enzima en ambos tipos membranales bajo las condiciones de ensayo que se señalan al pie de la figura 7. Durante la máxima estimulación en la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) en los fantasmas de eritrocito, la

relación es de 10 μg de calmodulina por 100 μg de proteína membranal, lo cual está de acuerdo a lo reportado previamente por Schatzman y Vincenzi (1969), así como por Carafoli y Zurini (1982). En la fracción microsomal cardíaca, la concentración óptima corresponde a 30 μg de calmodulina por 100 μg de proteína microsomal. Sin embargo, cuando la enzima sarcolemal se encuentra soluble, la relación es de un mol de calmodulina por mol de enzima.

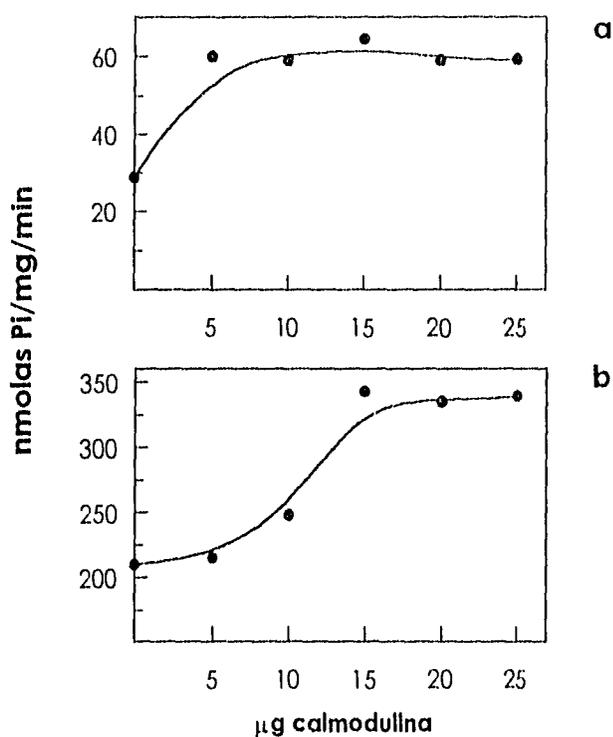


Fig. 7. Efecto de calmodulina sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) en fantasmas de eritrocito (a) y en microsomas cardíacos (b). El medio de ensayo contiene 50 μg de proteína, Tris -malato 50 mM (pH,7.4), MgCl_2 10 mM, CaCl_2 100 μM y ATP 6 mM. La reacción se lleva a cabo a 37 °C. Los resultados son representativos de 4 preparaciones diferentes por duplicado.

IV.3. Efecto de las concentraciones libres de Ca^{2+} y Mg^{2+} sobre la actividad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) en microsomas cardíacos.

En la figura 8 se muestra la actividad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de microsomas cardíacos deficientes en calmodulina. En ausencia de Ca^{2+} , la concentración de Mg^{2+} libre en el orden micromolar incrementa la actividad hidrolítica de 21.93 a 452.7 nmolas Pi/ mg/ min y se inhibe a concentraciones mayores de Mg^{2+} libre (Fig. 8a). La actividad bajo estas condiciones de ensayo sugiere la presencia de una ATPasa- Mg^{2+} de membrana plasmática, la cual se ha reportado como una enzima separada de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) en fantasmas de eritrocito (Niggli y cols., 1979 y 1981; Auland y cols., 1994); o bien, podría ser la manifestación de la actividad de la ATPasa- Mg^{2+} de retículo sarcoplásmico de músculo cardíaco, que se ha reportado como un estado funcional de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) en éste organelo (de Meis y cols., 1980; Taffet y Tate, 1992). En ausencia de Mg^{2+} , la actividad de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) aumenta de 5.1 a 84.2 nmolas Pi/ mg/ min en el orden micromolar de Ca^{2+} libre y concentraciones mayores de 100 μM inhiben la actividad (Fig. 8b). La baja actividad enzimática en estas condiciones de ensayo sugiere la presencia de una ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) sarcolemal, debido a que la actividad puede ser sostenida por ATP libre o Ca-ATP como se reporta en el eritrocito (Muallem y Karlsh, 1981) y en la sarcolema cardíaca (Caroni y col., 1981a).

La actividad enzimática a diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre, manteniendo fija la concentración de Mg^{2+} (Fig. 8c), muestra un aumento en la actividad de 194 a 269.8 nmolas Pi/ mg/ min en el intervalo de 1 a 10 μM de Ca^{2+} libre, la cual se inhibe por arriba de esta concentración y presenta un ligero incremento con 1 mM de Ca^{2+} libre para inhibirse hasta el 70 % de la actividad inicial con concentraciones mayores de 1 mM. Estos datos sugieren la presencia de una ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) activada por concentraciones milimolares de este catión como reportan Niggli y cols. (1981) y Caroni y col. (1981). La estimulación de la actividad a concentración de 1 mM de Ca^{2+} libre sugiere la presencia de una ATPasa mitocondrial que es activada por concentraciones milimolares de Ca^{2+} o Mg^{2+} (Penefsky y cols., 1960; Pullman y cols., 1960). Con base en los resultados anteriores se decidió investigar el efecto de diferentes inhibidores sobre la actividad enzimática en microsomas cardíacos deficientes en calmodulina.

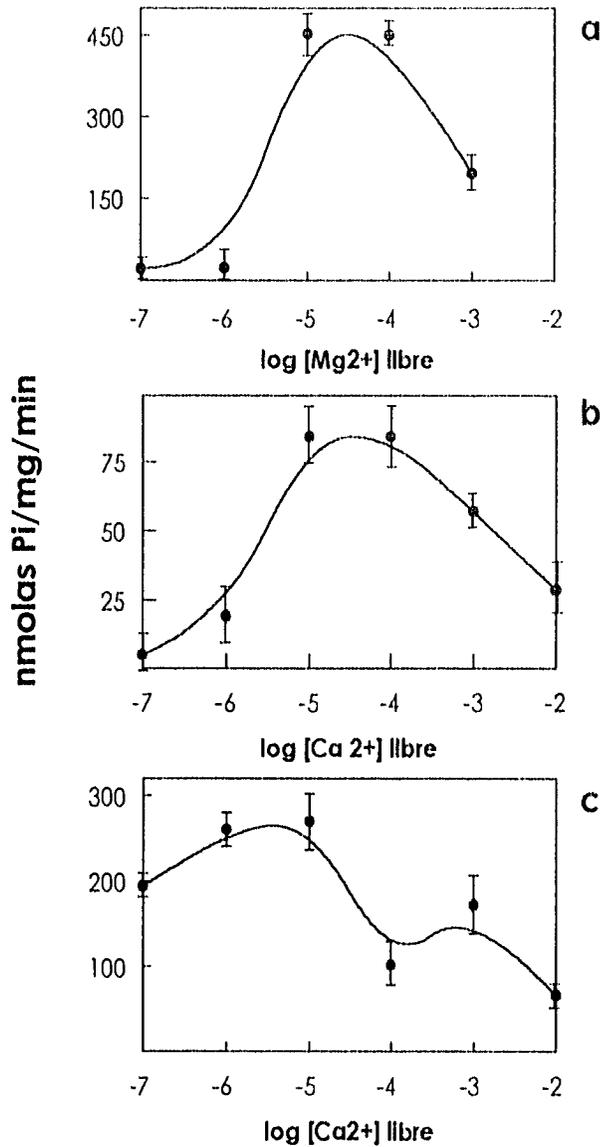


Fig. 8. Efecto de las concentraciones libres de cationes sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de microsomas cardíacos deficientes en calmodulina. a) Efecto de la concentración de Mg²⁺ libre en ausencia de Ca²⁺, b) Efecto de la concentración de Ca²⁺ libre en ausencia de Mg²⁺, c) Efecto de Ca²⁺ libre en presencia de 4 mM de Mg²⁺ libre. El medio de reacción contiene 50 µg de proteína, Tris-malato 50 mM (pH, 7.4), ATP 6 mM y EGTA 0.1 mM. Los resultados muestran la media ± e.e. de 10 diferentes preparaciones microsomales por duplicado.

IV.4. Efecto de ouabaina, oligomicina, vanadato y lantano sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) en microsomas cardíacos.

Con el fin de caracterizar la fracción microsomal cardíaca en su contenido sarcolemal, se cuantificó la actividad de la ATPasa-(Na⁺/K⁺) en esta preparación (Fig.9). La actividad de esta enzima preincubada con Mg²⁺ y ATP es de 344.4 nmolas de Pi / mg / min. En presencia de ouabaina 1 μM, la actividad enzimática se inhibe, hasta en un 30 %. Esta inhibición es similar a la reportada por otros autores (Schatzmann y Rossi, 1971; Rega y col., 1986). El efecto de ouabaina sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sensible a calmodulina en la fracción microsomal cardíaca, bajo las condiciones de ensayo que se indican al pie de la figura 9, no modifica la actividad de ésta enzima.

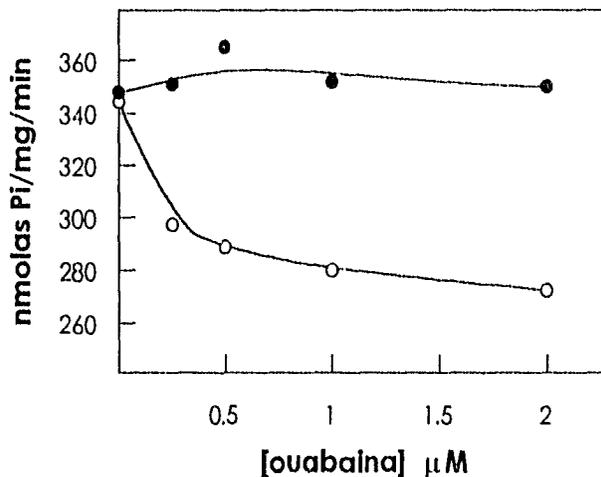


Fig. 9. Efecto de ouabaina sobre la actividad de la ATPasa de (Ca²⁺,Mg²⁺) (●—●) y de la ATPasa-(Na⁺/K⁺) (○—○) de microsomas cardíacos. La actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) se determina después de preincubar con ouabaina durante 10 minutos a 37 °C en un medio que contiene: 50 μg de proteína, Tris-malato 50 mM (pH,7.4), MgCl₂ 10 mM, ATP 6 mM, EGTA 0.1 mM. La reacción se inicia al añadir CaCl₂ 100 μM y se incuba durante 10 minutos a 37 °C antes de detener la reacción. La actividad de la ATPasa-(Na⁺/K⁺) se determina después de preincubar con ouabaina durante 10 minutos a 37 °C en un medio que contiene: MgCl₂ 4 mM, ATP 3 mM, EGTA 0.5 mM (pH, 7.4). La reacción se inicia al añadir NaCl 100 mM y KCl 200 mM y se incuba durante 10 minutos a 37 °C antes de detener la reacción. Los resultados son representativos de 4 diferentes preparaciones microsomales por duplicado.

Con el propósito de inhibir la actividad mitocondrial en la fracción microsomal cardíaca, se emplearon diferentes concentraciones de oligomicina en la determinación de la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) (Fig.10). El efecto de oligomicina sobre esta actividad es de inhibición hasta de un 62% a una concentración de 1 µg de oligomicina/ ml de la mezcla de reacción. Además, cuando se determinó el efecto de oligomicina sobre la actividad de la ATPasa-(Na⁺/K⁺) en los microsomas cardíacos (Fig.10), también se observó una inhibición del 65% con 1 µg de oligomicina/ ml. Los datos sugieren la contaminación de membranas mitocondriales; sin embargo, diferentes trabajos (Pratap y col., 1991; Esmann, 1991; Taniguchi y col., 1993) han demostrado que la oligomicina inhibe a la ATPasa-(Na⁺/K⁺) en concentraciones que varían entre 2 y 10 µg de oligomicina / ml, alcanzándose el 90 % de inhibición. Por lo anterior, se decidió investigar si realmente la oligomicina tiene un efecto sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sarcolemal y se procedió a probar el efecto de oligomicina sobre la enzima purificada (datos que se muestran más adelante).

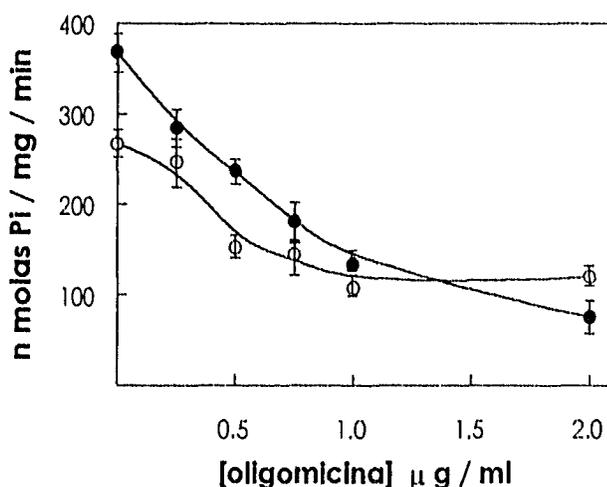


Fig. 10. Efecto de oligomicina sobre la actividad de la ATPasa-(Na⁺/K⁺) (○—○) y de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) (●—●) de microsomas cardíacos deficientes en calmodulina. Los microsomas se preincubaban con oligomicina durante 30 minutos en hielo. El medio de reacción para determinar la actividad de la ATPasa-(Na⁺/K⁺) contiene: NaCl 100 mM, KCl 200 mM, MgCl₂ 4 mM, ATP 3 mM, EGTA 0.5 mM (pH, 7.4). El medio de reacción para determinar la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) contiene: Tris-malato 50 mM (pH, 7.4), MgCl₂ 10 mM, ATP 6 mM, CaCl₂ 100 µM, EGTA 0.1 mM. La actividad se determina después de incubar las membranas durante 10 minutos a 37 °C. Los resultados muestran la media ± e.e. de 6 diferentes preparaciones microsomales por duplicado.

La figura 11 muestra el porcentaje de inhibición de la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de la fracción microsomal cardíaca por vanadato, lantano y oligomicina. Antes de preincubar a las membranas con los inhibidores, se les agregó Triton X-100 a concentración final de 0.05 % como indican Barrabin y cols. (1980) para la determinación de la inhibición de la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) por vanadato en fantasmas de eritrocito. Los valores del 100 % de actividad en las curvas de inhibición corresponden a 424.58, 389.12 y 469.27 nmolas Pi/mg/min para vanadato, lantano y oligomicina, respectivamente. En la curva de inhibición con vanadato (Fig.11a) se observa que la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) disminuye hasta 60 % con 50 μ M de vanadato y aumenta hasta 80 % con la adición de 2.5 μ g/ml de oligomicina. La actividad enzimática con diferentes concentraciones de lantano (Fig.11b) disminuye hasta 55 % con 15 μ M de lantano y la inhibición aumenta 10 % mas con la adición de oligomicina (2.5 μ g/ml). La inhibición con diferentes concentraciones de oligomicina (Fig.11c) alcanza hasta el 80 % con 2 μ g/ml del antibiótico y aumenta hasta 85 % con la adición de 50 μ M de vanadato. Estos datos sugieren que la preparación microsomal cardíaca presenta un alto contenido de membranas de RS y mitocondriales; sin embargo, cuando se determinó el efecto de estos inhibidores sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) soluble, se observó un efecto inhibitorio directo sobre esta enzima, lo cual se muestra más adelante.

La actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de la fracción microsomal cardíaca tratada con los diferentes inhibidores se determinó en ausencia y en presencia de calmodulina (30 μ g/ 100 μ g de proteína) (Fig. 12). En las vesículas tratadas con ouabaina (2.5 μ M) la calmodulina incrementa un poco más del 50 % la actividad enzimática, que es el mismo porcentaje de incremento en la actividad de la enzima en ausencia de inhibidores. En los microsomas tratados con oligomicina (2.5 μ g/ml) y vanadato (50 μ M) el incremento en la actividad enzimática con calmodulina es de 14.2 % y 13.6 % respectivamente. En presencia de 15 μ M de lantano la calmodulina solo aumenta la actividad en un 6 %. Lo anterior nos muestra que aún en presencia de oligomicina, vanadato y lantano la calmodulina estimula ligeramente la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), sin llegar a alcanzar el porcentaje de estimulación que se observa en ausencia de los inhibidores.

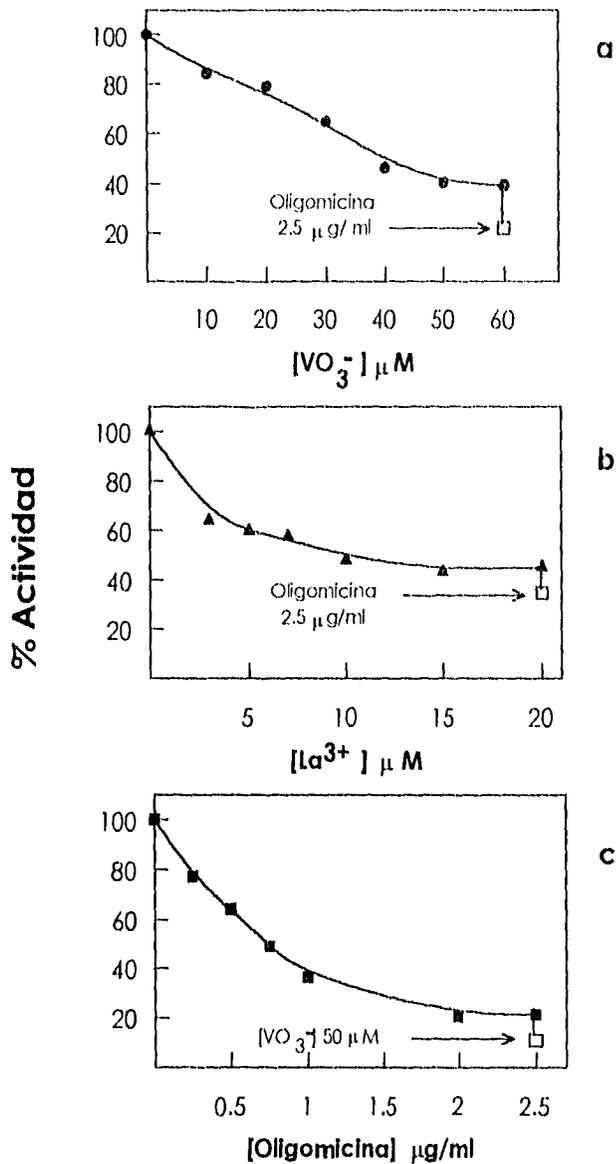


Fig.11. Efecto de vanadato (a), lantano (b) y oligomicina (c) sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de microsomas cardíacos. Los microsomas se solubilizan con Triton X-100 a concentración final de 0.05 % antes de preincubarlos durante 5 minutos a 37 °C con vanadato, 10 minutos en hielo con lantano y 30 minutos en hielo con oligomicina. El medio de ensayo contiene 50 μg de proteína, Tris-malato 50 mM (pH.7.4), MgCl₂ 10 mM, ATP 6 mM, CaCl₂ 100 μM, EGTA 0.1 mM. La actividad se determina después de incubar las membranas durante 10 minutos a 37 °C. Los resultados son representativos de 3 preparaciones microsomales diferentes por duplicado.

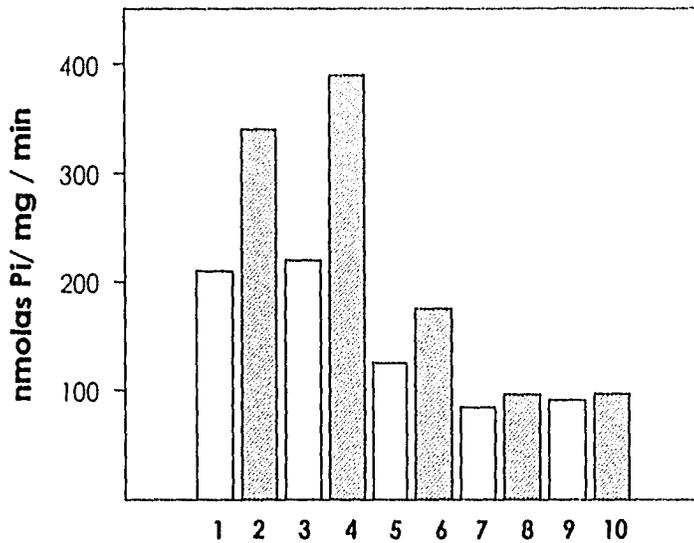


Fig. 12. Actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) en microsomas cardíacos en ausencia y presencia de calmodulina e inhibidores. Los microsomas se preincubaban en ausencia de inhibidores (1,2); en presencia de ouabaina 2.5 μ M (3,4), oligomicina 1 μ g/ml (5,6), vanadato 50 μ M (7,8) y lantano 15 μ M (9,10). La reacción se lleva a cabo como se indica al pie de las figuras 10 y 11 en ausencia (\square) y presencia (\blacksquare) de calmodulina 30 μ g/ 100 μ g de proteína.

IV.5. Purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de sarcolema cardíaca.

Con la fracción microsomal cardíaca deficiente en calmodulina obtenida por la modificación al método de Van Alstyne y cols. (1980), se procedió a purificar a la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sarcolemal mediante cromatografía de afinidad en columnas de sefarosa-calmodulina. En la figura 13 se muestra el perfil de elución y de actividad de la enzima solubilizada con Triton X-100. La Tabla 6 resume los resultados obtenidos en la elución. El sobrenadante de los microsomas cardíacos solubilizados contiene del 18 al 20% del total de la proteína microsomal y el 153% de la actividad hidrolítica de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de los microsomas cardíacos sin solubilizar, debido a la activación de la enzima por el Triton X-100. Después de cargar la columna de afinidad con el solubilizado, el 90 al 92% de la proteína aplicada a la columna se eluye por las soluciones (A y B) que contienen 100 μ M de Ca²⁺. Es importante hacer notar que estos porcentajes no dependen de la cantidad de material aplicado a la columna. Cuando se reemplaza el Ca²⁺ por 2 mM de EDTA en la solución de elución, se eluye una pequeña fracción de material que absorbe a 280 nm y que corresponde con el 0.08 al 0.1% de la proteína microsomal usada para cargar la columna. La actividad específica más alta es de 507 a 515 nmolas Pi/ mg/ min a 37°C en presencia de 50 μ M de Ca²⁺. La ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de fantasmas de eritrocito se purifica siguiendo la misma metodología empleada para purificar a la enzima de los microsomas cardíacos (Benaim y cols., 1984) y se observa un patrón de elución similar para ambas membranas (resultados no mostrados).

Las fracciones con actividad de ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) se concentraron y analizaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, observándose un componente principal de aproximadamente 140 kDa que corresponde a la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de sarcolema cardíaca y tres componentes menores de aproximadamente 100, 84 y 72 kDa, que podrían corresponder a productos de protéolisis de la banda principal de 140 kDa, descrito previamente por Caroni y Carafoli (1981a). Por lo cual, se llevó a cabo el proceso de purificación con metasulfato de fenazina (PMSF) para inhibir la actividad de las proteasas y las fracciones con actividad de ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (Fig.14.A.a) en donde se observa que la banda de 84 kDa desaparece y las bandas de 140, 100 y 72 kDa permanecen. El

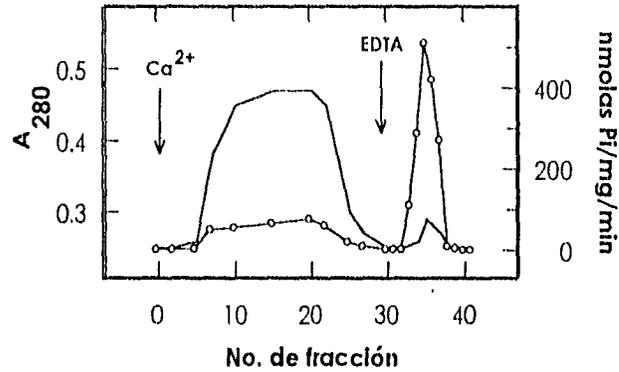


Fig. 13. Purificación de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de sarcolema cardíaca por cromatografía de afinidad en columnas de sefarsa-calmodulina. La actividad de la enzima (o—o) se determina como se indica en la sección de Métodos, utilizando 20 μ l de cada fracción eluída. La Absorbancia (—) se determina a 280 nm. La columna se lava con soluciones A y B que contienen 100 μ M de Ca²⁺. Posteriormente con una solución que contiene 2 mM de EDTA.

Tabla 6. Hoja de balance. Resultados en la obtención de ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de microsomas cardíacos a través de cromatografía de afinidad.

Fracción	Proteína mg	Proteína %	Actividad de la ATPasa-(Ca ²⁺ , Mg ²⁺) nmolas Pi/mg/min
Microsomas cardíacos	500	100	200 - 210
Microsomas cardíacos solubilizados con Triton X-100	90 - 100	18 - 20	305
Cromatografía de Afinidad			
Fracción eluída con Ca ²⁺	87 - 89	17 - 19	75
Fracción eluída con EDTA	0.4 - 0.5	0.08 - 0.10	507 - 515

componente de 100 kDa podría corresponder a una ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de retículo sarcoplásmico cardíaco sensible a calmodulina, descrita en 1992 por Mas-Oliva. O bien, corresponder a contaminación de otras proteínas junto con la banda de 72 kDa. La figura 14.A.b muestra un gel de poliacrilamida al 12% con SDS con 15 µg de proteína aislada de sarcolema cardíaca y fantasmas de eritrocito humano teñidos con plata. En ambos casos se observa una banda de aproximadamente 140 kDa. En el carril correspondiente a los fantasmas de eritrocito se observa un componente principal de aproximadamente 148 kDa, lo que ha sido descrito por Niggli y cols. en 1979.

Con el propósito de identificar el componente proteico responsable de la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) en la fracción eluída de la columna con EDTA, se tomaron 2 muestras de la proteína eluída con el quelante y se incubaron con [γ P³²] ATP 100 µM en presencia de Ca²⁺ y Mg²⁺. A una de las muestras se le añadió ATP frío 5 mM para favorecer el paso de desfosforilación en la reacción catalítica como se indica en la sección de Métodos. La radioactividad incorporada a la proteína se determinó por autorradiografía después de someter las muestras a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y se comparó con un control teñido con plata. Los resultados se muestran en la figura 14.B, en donde se observa que la incorporación de la radioactividad se presenta solamente durante la fosforilación en el componente de 140 kDa (Fig. 14.B.b, carril 1), lo que sugiere que la proteína fosforilada por [γ P³²] ATP en presencia de Ca²⁺ (µM) es una forma fosforilada ácido estable de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sarcolemal. Los componentes proteicos de 100 y 72 kDa invariablemente se encuentran en la fracción eluída con EDTA y no se fosforilan bajo las condiciones antes mencionadas. Estas proteínas interactúan con la calmodulina unida a la columna de sefarosa, o bien, se asocian a la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) durante el proceso de purificación; sin embargo, por el momento no conocemos su identidad. En presencia de concentraciones milimolares de Ca²⁺ y ATP, no se detectó fosfoenzima (Fig. 14.B.b, carril 2).

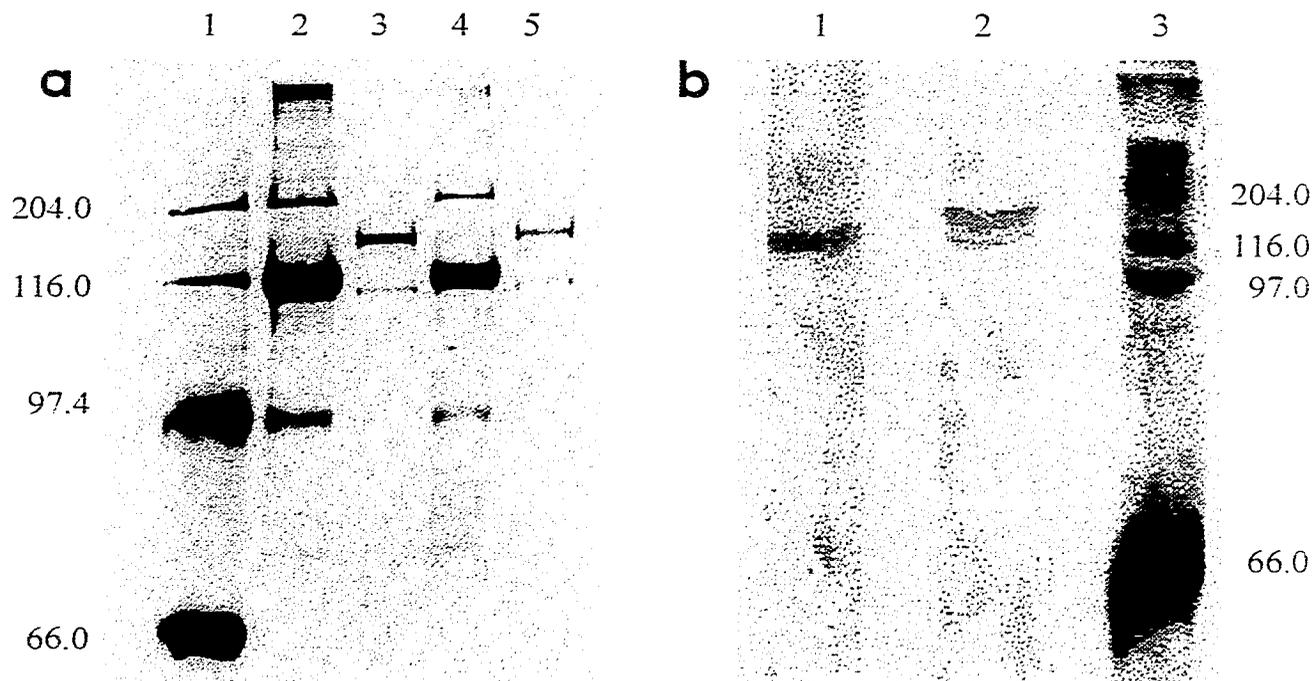


Fig. 14.A. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. Tinción de plata. a) Gel de poliacrilamida-SDS al 7.5 %. Marcadores de peso molecular (1). 25 μ g (2) y 20 μ g (4) de proteína del solubilizado de microsomas cardíacos que se aplica a la columna de afinidad. 20 μ g (3) y 15 μ g (5) de proteína eluida de la columna de afinidad con EDTA 2 mM. **b) Gel de poliacrilamida al 12 %.** 15 μ g de proteína eluida de la columna de afinidad con EDTA 2 mM procedente de sarcolema cardíaca (1) y de fantasmas de eritrocito (2). Marcadores de peso molecular (3).

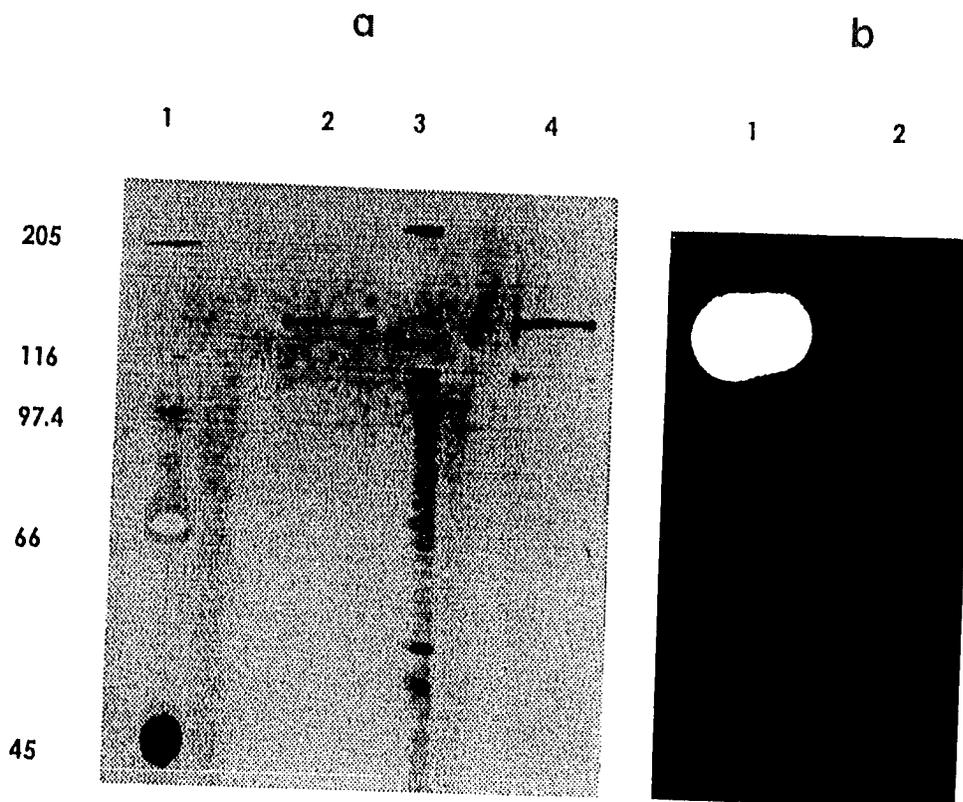


Fig. 14.B. Fosforilación dependiente de Ca^{2+} y Mg^{2+} de la fracción eluída de la columna con EDTA. a) Gel de poliacrilamida-SDS al 7.5 % teñido con plata. Marcadores de peso molecular (1), 15 μ g (2) y 20 μ g (4) de proteína eluída con EDTA. 15 μ g (3) de proteína del solubilizado de microsomas cardíacos que se aplica a la columna de afinidad. b) Autorradiografía de gel de poliacrilamida-SDS al 7.5 %. Fosforilación con (γ P^{32}) ATP de 20 μ g (1) de la proteína eluída con EDTA. Desfosforilación con ATP frío 5 mM de 20 μ g (2) de la proteína eluída con EDTA. Las condiciones de ensayo se describen en la sección de Métodos.

Para comprobar el acoplamiento de la hidrólisis de ATP al transporte de Ca^{2+} por la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ purificada de la fracción microsomal cardíaca, se reconstituyó a la enzima en liposomas de fosfatidilcolina (PC), utilizando el método de Kagawa y Racker (1971) descrito en la sección de Métodos. La Tabla 7 muestra los valores de el transporte de Ca^{2+} por la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ en fantasmas de eritrocito, microsomas cardíacos y de la enzima reconstituída en liposomas de PC, en donde se observa una mayor capacidad de transporte de la enzima en las preparaciones reconstituídas que en las membranas y que es estimulado por calmodulina. El transporte de Ca^{2+} de la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ purificada de eritrocitos y reconstituída en liposomas, presenta un incremento de 2 veces comparado con el transporte de Ca^{2+} realizado por la enzima en los fantasmas, tanto en ausencia como en presencia de calmodulina. Estos resultados corresponden a los obtenidos por otros autores (Niggli y cols., 1981; Caroni y cols., 1983). Sin embargo, el transporte de Ca^{2+} realizado por la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ de sarcolema cardíaca reconstituída en liposomas, presenta un aumento de 9 veces comparado con el transporte del ion que se lleva a cabo por la enzima en los microsomas cardíacos. Estos datos nos indican que a pesar de que la preparación microsomal cardíaca presenta diferentes tipos de membranas, el proceso de purificación por cromatografía de afinidad nos permite obtener a la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ sarcolemal manteniendo su actividad hidrolítica acoplada al transporte de calcio y su sensibilidad a calmodulina.

Tabla 7. Transporte de Ca^{2+} por la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) en fantasmas de eritrocito humano, microsomas cardíacos y reconstituida en liposomas de fosfalidil-colina (PC). El medio de ensayo contiene KCl 130 mM, Hepes-KOH 20 mM (pH,7.4), MgCl_2 0.5 mM, DTT 1 mM, $[\text{Ca}^{2+}]$ libre 10 μM , Arsenazo III 50 μM , ATP 50 μM y 50 μg de proteína membranal o 3-4 μg de proteína reconstituida en liposomas. Los resultados son la media \pm e.e. de 6 preparaciones diferentes por duplicado.

Preparación	Transporte de Ca^{2+} nmolas Ca^{2+} /mg/min	
	- calmodulina	+ calmodulina
Fanlasmás de eritrocito	18.22 \pm 3.06	28.10 \pm 2.1
ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) de eritrocitos reconstituida en PC	38.00 \pm 2.1	56.80 \pm 3.0
Microsomas cardíacos	52.51 \pm 11	80.12 \pm 10
ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) sarcolemal reconstituida en PC	462.05 \pm 25.8	786.40 \pm 15

IV.6. Efecto de ouabaina, vanadato, lantano y oligomicina sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) purificada de sarcolema cardíaca.

La actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) purificada de sarcolema cardíaca se determinó a diferentes concentraciones de ouabaina, como se muestra en la figura 15.A, donde se observa que el glucósido no modifica la actividad de esta enzima.

La figura 15.B muestra el efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de vanadato, lantano y oligomicina sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) solubilizada. En presencia de vanadato, la actividad enzimática alcanza el 70 % de inhibición con 6 μM de vanadato (Fig.15a) y no aumenta con la adición de 2 μg/ml de oligomicina. En presencia de 1.5 μM de lantano (Fig.15b), se observa que la actividad disminuye hasta 80 % y no se modifica con la adición de oligomicina (2 μg/ml). La actividad enzimática en presencia de 1.5 μg/ml de oligomicina disminuye hasta 80 % y la inhibición no aumenta con la adición de vanadato 6 μM (Fig.15c). Los resultados sugieren que la oligomicina inhibe directamente a la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sensible a vanadato y lantano. Sin embargo, en la literatura no se ha reportado a la oligomicina como inhibidor de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) pero sí de la ATPasa-(Na⁺/K⁺), lo que ha permitido caracterizar a los intermediarios fosforilados de esta enzima. La oligomicina (10 μg/ml) inhibe hasta el 90 % la actividad de la ATPasa-(Na⁺/K⁺) de riñón de perro (Pratap y cols., 1991) y hasta el 80 % de la actividad de la ATPasa-(Na⁺/K⁺) purificada de riñón de cerdo con 2 μg/ml de oligomicina (Taniguchi y col., 1993). Esmann (1991) y Taniguchi y col. (1991) han demostrado que la oligomicina aumenta la afinidad de la ATPasa-(Na⁺/K⁺) por Na⁺ e inhibe a la enzima durante su ciclo catalítico actuando sobre el estado no fosforilado (E₁) de la ATPasa-(Na⁺/K⁺). Esto sugiere que la oligomicina podría tener un efecto similar en la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) debido a que la enzima presenta la misma característica de la ATPasa-(Na⁺/K⁺) de formar un intermediario fosforilado durante su ciclo catalítico. Sin embargo, es necesario investigar con más detalle el efecto de oligomicina sobre la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) para determinar si el antibiótico podría ser de utilidad para estudiar al intermediario fosforilado de esta enzima.

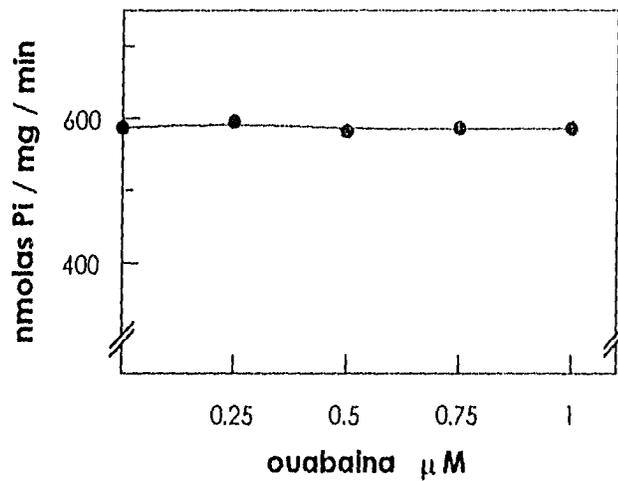


Fig. 15.A. Efecto de ouabaina sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) purificada de sarcolema cardíaca. La enzima se preincuba durante 10 minutos con ouabaina a 37 °C en un medio de ensayo que contiene: Tris-malato 50 mM (pH,7.4), MgCl₂ 10 mM, ATP 6 mM, EGTA 0.1 mM. La reacción se inicia al añadir CaCl₂ 100 μM y se incuba 10 minutos a 37 °C antes de detener la reacción. Los resultados son representativos de 3 preparaciones diferentes.

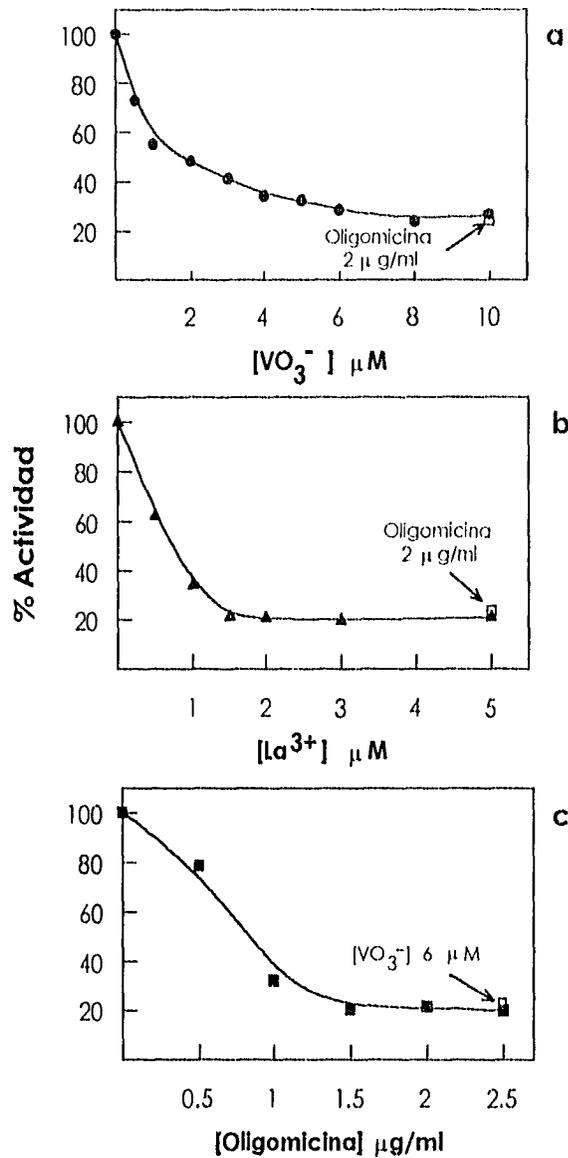


Fig.15.B. Efecto de vanadato (a), lantano (b) y oligomicina (c) sobre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) purificada de sarcolema cardíaca. La enzima se preincuba 5 minutos a 37 °C con vanadato, 10 minutos en hielo con lantano y 30 minutos en hielo con oligomicina. El medio de ensayo contiene Tris-malato 50 mM (pH,7.4), MgCl₂ 10 mM, ATP 6 mM, CaCl₂ 100 µM, EGTA 0.1 mM. La actividad se determina después de incubar a la enzima durante 10 minutos a 37 °C. Los resultados son representativos de 3 preparaciones diferentes por duplicado.

IV.7. Efecto de calmodulina sobre el nivel de fosfoenzima de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sarcolemal.

La figura 16 muestra el curso temporal de formación del intermediario fosforilado (EP) de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sarcolemal. En esta gráfica se observa que en ausencia de calmodulina, la concentración de EP aumenta rápidamente hasta un nivel máximo alrededor de los 90 mseg y posteriormente disminuye a un nivel estacionario similar al alcanzado en presencia de calmodulina. La concentración de Pi en presencia de calmodulina aumenta antes de que la fosfoenzima llegue al nivel estacionario y alcanza valores mayores que en ausencia de calmodulina. Estos datos están de acuerdo con lo reportado por Muallem y col. (1981) y Adamo y cols. (1988) para el eritrocito humano, en donde indican que la calmodulina estimula la velocidad de fosforilación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sin cambiar el nivel del estado estacionario de EP y sugieren que la calmodulina cambia el equilibrio de la reacción catalítica hacia E_i. Sin embargo, los tiempos utilizados en estos experimentos no permiten observar los cambios que se producen en EP y en la liberación de Pi antes de que la enzima alcance el estado estacionario, por lo cual se decidió llevar a cabo la determinación de estos compuestos a tiempos menores de un segundo.

Como se muestra en la figura 17, el primer evento medido después de la adición de ATP a la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) preincubada con Ca²⁺ es la formación de EP. En ausencia de calmodulina (Fig.17a), la concentración de EP presenta un aumento pronunciado hasta llegar a un valor máximo alrededor de los 10 mseg y posteriormente disminuye al mismo nivel del estado estacionario que se presenta cuando la enzima se preincuba con calmodulina (Fig.17b). En la figura 17c se observa que la calmodulina inicialmente aumenta la concentración de EP; sin embargo, esta formación es más lenta que en ausencia de calmodulina. En contraste, la liberación de Pi en ausencia de calmodulina muestra un mayor retraso seguido a la formación de EP con respecto a la liberación de Pi que se produce en presencia de calmodulina. Este comportamiento que se observa antes de que la fosfoenzima alcance el estado estacionario demuestra que la formación de EP es un paso obligatorio en el ciclo

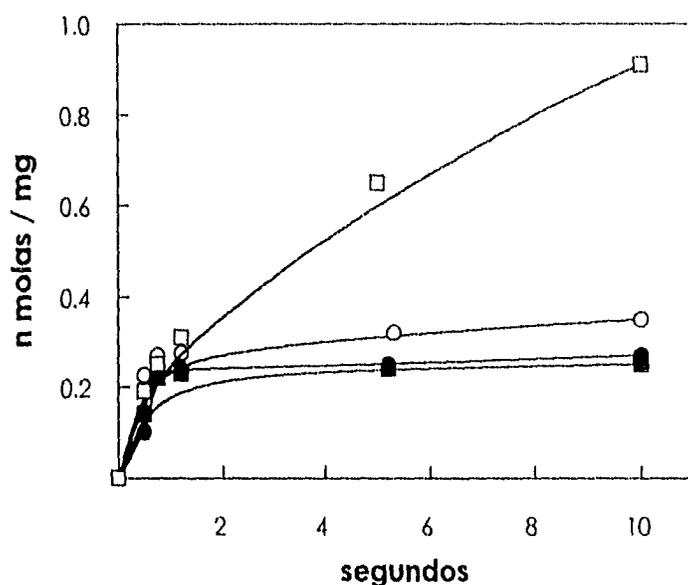


Fig. 16. Formación de fosfoenzima y producción de fosfato inorgánico. Los experimentos se realizan con la ayuda de un aparato de mezcla rápida. La enzima se preincuba en ausencia (●-○) o en presencia (■-□) de calmodulina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante dos horas. La solución A contiene la enzima purificada (0.1 mg/ml), Tris-malato 20 mM ($\text{pH}, 7.0$), KCl 80 mM , MgCl_2 10 mM y CaCl_2 100 μM . Se mezcla con un volumen de solución B con los mismos componentes de la solución A, excepto que en lugar de la enzima contiene ATP [γ P^{32}]. La concentración final de ATP en el medio de reacción (A+B) es de 200 μM . La reacción se lleva a cabo a 4°C y se detiene automáticamente a los tiempos indicados en la figura. La fosfoenzima (símbolos cerrados) y el fósforo inorgánico (símbolos abiertos), se miden como se describe en Métodos.

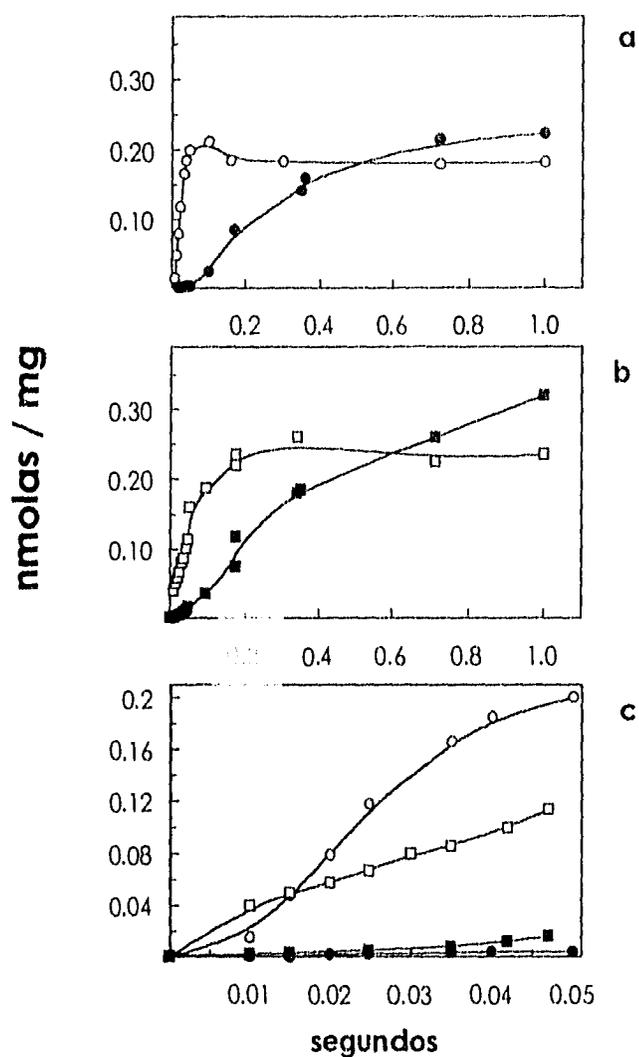


Fig.17. Curso temporal de formación de fosfoenzima (símbolos abiertos) y liberación de PI (símbolos cerrados). La reacción se lleva a cabo como se indica al pie de la figura 16. **a)** Fosfoenzima (o) y PI (•) en ausencia de calmodulina. **b)** Fosfoenzima (□) y PI (■) en presencia de calmodulina. **c)** Datos de la parte inicial de las figuras a y b.

catalítico de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) y que la actividad hidrolítica de la enzima es mayor en presencia de la proteína reguladora.

La Tabla 8 resume el efecto de calmodulina sobre los parámetros cinéticos de la reacción de fosforilación que se obtienen de las figuras 16 y 17. La velocidad inicial (v_o) de fosforilación es mayor en ausencia que en presencia de calmodulina, con valores de v_o de 5.6 y 2.1 nmolas/mg/seg respectivamente. Los valores de la constante de velocidad aparente de la fosforilación (k_{ap}) se calculan de la relación de v_o entre la concentración de EP en el estado estacionario. La k_{ap} para la fosforilación es menor (k_{ap} = 8.75 seg⁻¹) cuando la enzima se preincuba con calmodulina que cuando la calmodulina esta ausente (k_{ap} = 22.4 seg⁻¹). Sin embargo, la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) aumenta de 507 a 730 nmolas/mg/min cuando la calmodulina esta presente en el medio de incubación. Por otro lado, el nivel de EP en el estado estacionario es similar en ambos casos

Tabla 8. Parámetros cinéticos de la fosforilación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺). Los valores de v_o, k_{ap} y [EP] en ausencia y presencia de calmodulina se obtuvieron de las figuras 16 y 17, respectivamente. El número de recambio se calculó de la relación Actividad de la enzima / [EP] en el estado estacionario en cada serie de experimentos (fig. 16). El valor de k_{ap} se calculó de la relación v_o / [EP].

	- calmodulina	+ calmodulina
v_o nmolas / mg / seg	5.60	2.10
[EP] nmolas / mg	0.25	0.24
k_{ap} seg ⁻¹	22.40	8.75
Actividad nmolas / mg / min	507	730
Recambio min ⁻¹	2028	3042

El número de recambio se obtiene de la relación entre la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) y la concentración de EP en el estado estacionario. El valor en el número de recambio de EP en ausencia de calmodulina es menor (2028 min⁻¹) que en presencia de calmodulina (3042 min⁻¹). Adamo y cols. en 1988 reportaron los valores en el número de recambio para las ATPasas de (Na⁺/K⁺) y de (Ca²⁺,Mg²⁺) de retículo sarcoplásmico, los cuales se encuentran en el intervalo de 5,000 a 10,000 min⁻¹ y 400 a 1,000 min⁻¹ respectivamente. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que en términos de recambio, la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sarcolemal está más cercana a la ATPasa-(Na⁺/K⁺) que a la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de RS.

La calmodulina modifica los parámetros cinéticos de la fosforilación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) disminuyendo la v_o y la k_{ap} de fosforilación y aumentando la actividad de la enzima y el número de recambio. Los datos sugieren que aparentemente, la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) en presencia de calmodulina esta asociada a un aumento en el número de recambio de la fosfoenzima.

Diferentes trabajos (Muallem y col., 1981; Schatzmann, 1982; Rega y col., 1986; Adamo y cols., 1988) han demostrado que en el ciclo de reacción de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), la fosforilación depende de Ca²⁺ y no requiere Mg²⁺ y el Mg²⁺ y la calmodulina aceleran la fosforilación en presencia de Ca²⁺. Sin embargo, no se ha reportado el efecto de calmodulina durante la desfosforilación hacia adelante en el ciclo de reacción de la enzima. Por este motivo, decidimos investigar el efecto de calmodulina durante este proceso. La desfosforilación en dirección hacia adelante de la reacción se lleva a cabo mediante la adición de ATP y Mg²⁺ a concentraciones milimolares como se indica al pie de la figura 18. En esta figura se observa que el nivel de EP disminuye hasta el 40 % en presencia de calmodulina, tanto en la fosforilación como en la desfosforilación. Estos datos sugieren que el efecto de calmodulina se asocia preferentemente a un aumento en la velocidad de desfosforilación de la enzima. Sin embargo, este aumento en la velocidad de desfosforilación podría estar dado por el aumento en la concentración de Mg²⁺, debido a que se ha demostrado (Schatzmann, 1982; Rega y col., 1986) que concentraciones milimolares de este ion aceleran la desfosforilación y que concentraciones micromolares de Mg²⁺ no afectan la desfosforilación de EP formado en presencia de Ca²⁺, a

menos que se añada una concentración alta de ATP (1 mM). Con base en esto último, se decidió investigar el efecto de Mg^{2+} sobre el nivel de fosfoenzima en ausencia y en presencia de calmodulina.

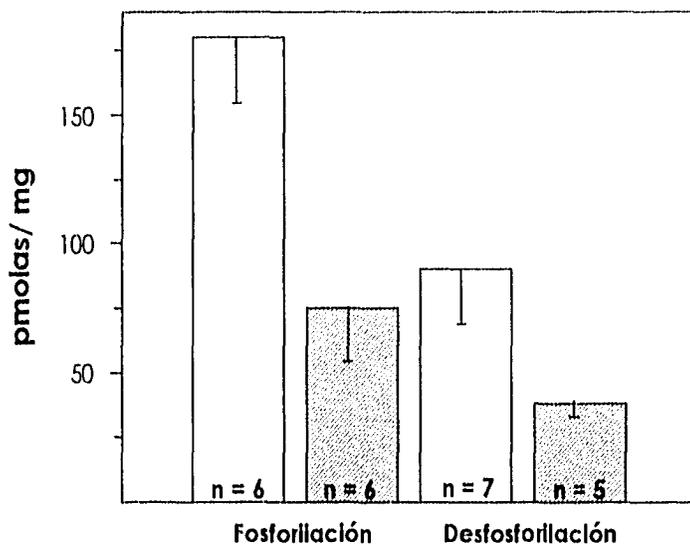


Fig. 18. Nivel de fosfoenzima de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) durante la fosforilación y la desfosforilación, en ausencia y presencia de calmodulina. Para la reacción de fosforilación la enzima incorporada en liposomas de PC se incubaba en una solución A que contiene: Tris-malato 50 mM (pH,7.0), $MgCl_2$ 1 mM y $CaCl_2$ 100 μ M. Posteriormente se mezcla con un volumen igual de solución B con los mismos componentes que la solución A, excepto que en lugar de la enzima, contiene ATP [γ P^{32}]. La concentración final de ATP en la mezcla de reacción (A+B) es de 5 μ M. Para la reacción de desfosforilación se sigue el procedimiento anterior pero antes de detener la reacción se añade $CaCl_2$ 1 mM y ATP 10 mM. La enzima se preincuba en la solución A en ausencia (□) o en presencia (▨) de calmodulina (10 μ g/ml) durante dos horas a 0° antes de iniciar la reacción. Los resultados son la media \pm e.e. del número (n) de experimentos por duplicado marcados en cada columna.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados en la Tabla 9 muestran que en ausencia de Mg^{2+} , la calmodulina aumenta la actividad de la ATPasa- (Ca^{2+}, Mg^{2+}) de 730 a 1980 pmolas/mg/min (2.7 veces), el nivel de EP aumenta de 21.4 a 32.2 pmolas/mg (1.5 veces) y el número de recambio se incrementa de 34.11 a 61.4 min^{-1} . En presencia de Mg^{2+} , la calmodulina incrementa la actividad de 1490 a 4930 pmolas/mg/min (3.3 veces), mientras que el nivel de EP

Tabla 9. Efecto de la preincubación con calmodulina sobre el nivel de fosfoenzima de la ATPasa- (Ca^{2+}, Mg^{2+}) sarcolemal en ausencia y presencia de $MgCl_2$. La enzima incorporada a liposomas de PC se incubó en una solución A que contiene Tris-malato 50 mM (pH, 7.0), $CaCl_2$ 100 μ M, en ausencia o en presencia de $MgCl_2$. Se mezcla con un volumen igual de solución B que contiene los mismos componentes que la solución A, excepto que contiene ATP [γ P^{32}] 10 μ M en lugar de la enzima. La concentración final de ATP en la mezcla de reacción A+B es de 5 μ M. La enzima se preincubó en la solución A en ausencia o en presencia de calmodulina (10 μ g/ml) durante 2 horas a 0 °C antes de iniciar la reacción.

	- calmodulina	+ calmodulina
Actividad de la ATPasa-(Ca^{2+}, Mg^{2+}) pmolas/mg/min		
MgCl ₂ 0	730	1980
MgCl ₂ 1 mM	1490	4930
Fosfoenzima (EP) pmolas/mg		
MgCl ₂ 0	21.4	32.2
MgCl ₂ 1 mM	69.01	34.7
Recambio min⁻¹		
MgCl ₂ 0	34.11	61.4
MgCl ₂ 1 mM	21.59	142

disminuye casi 2 veces, de 69.01 a 34.7 pmolas/mg y el número de recambio se incrementa 6.5 veces de 21.59 a 142 min⁻¹. Los resultados anteriores nos indican que la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) es mayor en un medio que contiene Mg²⁺ y que este ion no es esencial para la activación de la enzima, pero modifica la respuesta de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) a calmodulina, produciendo un aumento en la desfosforilación de EP, debido a que el nivel de EP alcanzado en presencia de calmodulina es similar en ausencia y en presencia de Mg²⁺ (32.2 y 34.7 pmolas/mg respectivamente). Además, el incremento en la actividad enzimática producida por calmodulina en ausencia de Mg²⁺ resulta de un aumento en el nivel y en el recambio de EP.

Adamo y cols. (1988) han demostrado que el Mg²⁺ aumenta la velocidad de desfosforilación de EP dependiente de Ca²⁺ de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) en fantasmas de eritrocito humano. Estos autores sugieren que el Mg²⁺ acelera la conversión de la enzima fosforilada de la forma E₁P a la forma E₂P y que esta última se desfosforila a una mayor velocidad que E₁P, dado probablemente por un cambio conformacional del intermediario fosforilado, por lo cual el nivel de EP disminuye. En el presente trabajo se muestra que la calmodulina en presencia de Mg²⁺ disminuye el nivel de EP, lo que sugiere que el efecto de la proteína reguladora sobre la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) es aumentar la velocidad de desfosforilación de EP y el incremento en la actividad hidrolítica de la enzima esta dado principalmente por un aumento en la velocidad de recambio de la fosfoenzima, indicando que bajo estas condiciones de ensayo, la calmodulina podría acelerar la descomposición de E₂P, por lo cual el nivel de EP disminuye.

V. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo permiten concluir:

- 1) Contamos con un método de aislamiento de una fracción microsomal cardíaca de bovino deficiente en calmodulina, que permite aumentar el rendimiento en la purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sarcolemal (225 µg de enzima/ 500 mg de proteína microsomal), mediante cromatografía de afinidad.
- 2) La actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sarcolemal sensible a vanadato y lantano se inhibe 80 % con oligomicina 1.5 µg/ml. Este efecto inhibitorio no ha sido reportado para la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), pero sí para la ATPasa-(Na⁺,K⁺) (Pratap y cols., 1991; Esmann, 1991; Taniguchi y col., 1993) y ha permitido caracterizar a los intermediarios fosforilados de esta enzima. La inhibición de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) por oligomicina hace interesante estudiar con más detalle este efecto, para determinar si el antibiótico podría ser de utilidad para estudiar a los intermediarios fosforilados de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺).
- 3) En el estado estacionario de el ciclo catalítico de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), la calmodulina disminuye el nivel del intermediario fosforilado tanto en la fosforilación como en la desfosforilación de la enzima.
- 4) La velocidad inicial (v_o) de fosforilación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) en ausencia de calmodulina es mayor que en presencia de esta proteína reguladora; sin embargo, en presencia de calmodulina la actividad de la enzima aumenta a más del doble, la k_{ap} de fosforilación disminuye y aparentemente disminuye el período de latencia en la liberación de P_i durante los primeros ciclos de la enzima.

- 5) El aumento en la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) por calmodulina está asociado a un aumento en el recambio de la fosfoenzima y a un aumento en la velocidad de desfosforilación de la fosfoenzima.

V. BIBLIOGRAFIA

- Adamo, H., Rega, A. and Garrahan, P. (1988). Pre-steady-state phosphorylation of the human red cell Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem* 263, 17548-17554.
- Allen, B., Katz, S. and Roufogalis, B. (1987). Effects of Ca^{2+} , Mg^{2+} and calmodulin on the formation and decomposition of the phosphorylated intermediate of the erythrocyte Ca^{2+} -stimulated ATPase. *Biochem J* 244, 617-623.
- Auland, M., Morris, M. and Roufogalis, B. (1994). Separation and characterization of two Mg^{2+} -ATPase activities from human erythrocyte membrane. *Arch Biochem Biophys* 312, 272-277.
- Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. and Darzon, A. (1986). Thermostability of membrane enzymes in organic solvents. *FEBS Lett* 203, 41-43.
- Baker, P., Blaustein, M., Hodgkin, A. and Steinhardt, R. (1969). The influence of calcium on sodium efflux in squid axons. *J Physiol* 200, 431-458.
- Barrabin, H., Garrahan, P. and Rega, A. (1980). Vanadate inhibition of the Ca^{2+} -ATPase from human red cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 600, 796-804.
- Benaim, G., Zurini, M. and Carafoli, E. (1984). Different conformational states of the purified Ca^{2+} -ATPase of the erythrocyte plasma membrane revealed by controlled trypsin proteolysis. *J Biol Chem* 259, 8471-8477.
- Benaim, G. and de Meis, L. (1989). Activation of purified erythrocyte plasma membrane Ca^{2+} ATPase by organic solvents. *FEBS Lett* 244, 484-486.
- Benaim, G., Clark, A. and Carafoli, E. (1986). ATPase activity and Ca^{2+} transport by reconstituted tryptic fragments of the Ca^{2+} pump of the erythrocyte plasma membrane. *Cell Calcium* 7, 175-186.
- Bensadoun, A. and Weinstein, D. (1976). Assay of proteins in the presence of interfering materials. *Anal Biochem* 70, 241-250.
- Berridge, M. (1984). Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* 220, 345-360.
- Brandl, C., Green, N., Korczak, B. and MacLennan, D. (1986). Two Ca^{2+} ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* 44, 597-607.
- Carafoli, E. and Crompton, M. (1978). The regulation of intracellular calcium. *Curr Top Memb Transp* 10, 151-216.
- Carafoli, E. and Zurini, M. (1982). The Ca^{2+} -pumping ATPase of plasma membranes. Purification, reconstitution and properties. *Biochim Biophys Acta* 683, 279-301.
- Carafoli, E. (1992). The Ca^{2+} pump of the plasma membrane. *J Biol Chem* 267, 2115-2118.

- Caroni, P. and Carafoli, E. (1980). An ATP-dependent Ca^{2+} -pumping system in dog heart sarcolemma. *Nature* 283, 765-767.
- Caroni, P. and Carafoli, E. (1981a). The Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma. *J Biol Chem* 256, 3263-3270.
- Caroni, P. and Carafoli, E. (1981b). Regulation of Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma by a phosphorylation-dephosphorylation process. *J Biol Chem* 256, 9371-9373.
- Caroni, P., Zurini, M., Clark, A. and Carafoli, E. (1983). Further characterization and reconstitution of the purified Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma. *J Biol Chem* 258, 7305-7310.
- Caroni, P., Reinlib, L. and Carafoli, E. (1980). Charge movements during the Na^+ - Ca^{2+} exchange in heart sarcolemmal vesicles. *Proc Nat Acad Sci USA* 77, 6354-6358.
- Carvalho, M., Souza, D. and de Meis, L. (1976). On a possible mechanism of energy conservation in sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 251, 3629-3636.
- Chan, K. and Junger, K. (1983). Calcium transport and phosphorylated intermediate of $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPase in plasma membranes of rat liver. *J Biol Chem* 258, 4404-4410.
- Cheng, K., Hui, S. and Lepock, J. (1987). Protection of the membrane calcium adenosine triphosphatase by cholesterol from thermal inactivation. *Cancer Res* 47, 1255-1262.
- Chiesi, M., and Carafoli, E. (1983). Role of calmodulin in skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 22, 985-993.
- Coelho-Sampaio, T., Ferreira, S., Benaim, G. and Vieyra, A. (1991). Dissociation of purified erythrocyte Ca^{2+} -ATPase by hydrostatic pressure. *J Biol Chem* 266, 22266-22272.
- Criss, W., and Kakiuchi, S. (1982). Calcium: calmodulin and cancer. *Fed Proc* 41, 2289-2291.
- de Meis, L. (1981). The sarcoplasmic reticulum. Transport and energy transduccion. in *Transport in the Life Sciences*. Vol 2, Bittar, E. Ed. John Wiley and Sons, New York.
- de Meis, L., Martins, O. and Alves, E. (1980). Role of water, hydrogen ion, and temperature on the synthesis of adenosine triphosphate by the sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase in absence of a calcium ion gradient. *Biochemistry* 19, 4252-4261.
- DeLorenzo, R. (1982). Calmodulin in neurotransmitter release and synaptic function. *Fed Proc Am Soc Exp Biol* 41, 2265-2272.
- Di Mauro, S., Servidei, S. and Zeviani, M. (1987) *Ann Neurol* 22,498-506.
- Dipolo, R. (1978). Ca pumps driven by ATP in squid axons. *Nature* 274, 390-392.
- Enyedi, A., Vorherr, T., James, P., Mc Cormick, D., Filoteo, A., Carafoli, E. and Penniston, J. (1989). The calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca^{2+} pumps interacts both with calmodulin and with another part of the pump. *J Biol Chem* 264, 12313-12321.

BIBLIOGRAFIA

- Esmann, M. (1991). Oligomycin interactions with Na,K-ATPase: oligomycin binding and dissociation are slow processes. *Biochim Biophys Acta* 1064, 31-36.
- Fabiato, A. (1988). Computer programs for calculating total from specified free or free specified total ionic in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzimol* 157, 378-416.
- Fiske, C. and Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66, 375-400.
- Garza-Ramos, G., Darzon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. and Gómez-Puyou, A. (1989). Catalysis and thermostability of mitochondrial F₁-ATPase in toluene-phospholipid-low-water systems. *Biochemistry* 28, 3177-3182.
- Geisow, M. and Burgoyne, R. (1983). Recruitment of cytosolic proteins to a secretory granule membrane depends on Ca²⁺-calmodulin. *Nature* 301, 432-434.
- Ghijzen, W., De Jong, M. and Van Os, C. (1979). Dissociation between Ca²⁺-ATPase and alkaline phosphatase activities in plasma membranes of rat duodenum. *Biochim Biophys Acta* 599, 538-551.
- Gietzen, K., Tejcka, M. and Wolf, V. (1980). Calmodulin affinity chromatography yields a functional purified erythrocyte (Ca²⁺+Mg²⁺)- dependent adenosine triphosphatase. *Biol J* 189, 81-88.
- Gmaj, P., Murer, H. and Kinne, R. (1979) Calcium ion transport across plasma membranes isolated from rat kidney cortex. *Biochem J* 178, 549-557.
- Gopalakrishna, R. and Anderson, W. (1982). Ca²⁺-induced hydrophobic site on calmodulin: application for purification of calmodulin by phenyl-sepharose affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* 104, 830-836.
- Gopinath, R. and Vincenzi, F. (1977). Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmatic activator of the (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun* 77, 1203-1209.
- Greeb, J. and Shull, G. (1989). Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J Biol Chem* 269, 18569 -18576.
- Green, D., Mii, S. and Kohout, P. (1955). Studies on the terminal electron transport system. I. Succinic dehydrogenase. *J Biol Chem* 217, 551-567.
- Grover, A. and Khan, I. (1992). Calcium pump isoforms: diversity, selectivity and plasticity. *Cell Calcium* 13, 9-17.
- Inesi, G. and Scarpa, A. (1972). Fast kinetics of adenosine triphosphate dependent Ca²⁺ uptake by fragmented sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 11, 356-359.
- James, P., Maeda, M., Fischer, R., Verma, A., Krebs, J., Penniston, J. and Carafoli, E. (1988). Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump of human erythrocytes. *J Biol Chem* 263, 2905-2910.
-

-
- Jarrett, H. and Penniston, J. (1977). Partial purification of the Ca^{2+} - Mg^{2+} ATPase activator from human erythrocytes: its similarity to the activator of 3':5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 77, 1210-1216.
- Jeffery, D., Roufogalis, B. and Katz, S. (1981). The effect of calmodulin on the phosphoprotein intermediate of Mg^{2+} -dependent Ca^{2+} -stimulated adenosine triphosphatase in human erythrocyte membranes. *Biochem J* 194, 481-486.
- Jones, L., Besch, H., Fleming, J., McConnaughey, M. and Watanabe, A. (1979). Separation of vesicles of cardiac sarcolemma from vesicles of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 254, 530-539.
- Kagawa, Y. and Racker, E. (1971). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. XXV. Reconstitution of vesicles catalyzing ^{32}P -adenosine triphosphate exchange. *J Biol Chem* 246, 5477-5487.
- Kessler, F., Bennardini, F., Bachs, O., Serratos, J., James, P., Caride, A., Gazzotti, P., Penniston, J. and Carafoli, E. (1990). Partial purification and characterization of the Ca^{2+} pumping ATPase of the liver plasma membrane. *J Biol Chem* 265, 16012-16019.
- Knauf, P., Proverbio, F. and Hoffman, J. (1974). Electrophoretic separation of different phosphoproteins associated with Ca-ATPase and Na, K-ATPase in human red cell ghosts. II. Interaction of calcium with subcellular organelles. *J Gen Physiol* 63, 324-336.
- Kosk-Kosicka, D. and Bzdega, T. (1988). Activation of the erythrocyte Ca^{2+} -ATPase by either self-association or interaction with calmodulin. *J Biol Chem* 263, 18184-18189.
- Kosk-Kosicka, D., Bzdega, T. and Wawrzynow, A. (1989). Fluorescence energy transfer studies of purified erythrocyte Ca^{2+} -ATPase. Ca^{2+} regulated activation by oligomerization. *J Biol Chem* 264, 19495-19499.
- Kosk-Kosicka, D. and Bzdega, T. (1990). Effects of calmodulin on erythrocyte Ca^{2+} -ATPase activation and oligomerization. *Biochemistry* 29, 3772-3777.
- Kretsinger, R. (1981). Mechanism of selective signaling by calcium. *Neurosci Res Program Bull* 19, 297-302.
- Kuwayama, H. and Kanazawa, T. (1982). Purification of cardiac sarcolemmal vesicles: high sodium pump content and ATP-dependent, calmodulin-activated calcium uptake. *J Biochem* 91, 1419-1426.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamers, J. (1985). Calcium transport systems in cardiac sarcolemma and their regulation by second messengers cyclic AMP and calcium-calmodulin. *Gen Physiol Biophys* 4, 143-154.
- Lamers, J. and Stinis, J. (1981). An electrogenic $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter in addition to the Ca^{2+} pumps in cardiac sarcolemma. *Biochim Biophys Acta* 640, 521-534.
-

- Langer, G. (1992). Calcium and the heart: exchange at the tissue, cell and organelle levels. *FASEB J* 6, 893-902.
- Lanzetta, P., Alvarez, L., Reinnach, P. and Candia, O. (1979). An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 100, 95-97.
- Larsen, F., Katz, S. and Roufogalis, B. (1981). Calmodulin regulation of Ca^{2+} transport in human erythrocytes. *Biochem J* 200, 185-191.
- Llinás, R., Sugimori, M. and Simon, S. (1982). Transmission by presynaptic spike-like depolarization in the squid giant synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 2415-2419.
- Lotersztajn, S., Hanoune, J. and Pecker, F. (1981). A high affinity calcium-stimulated magnesium-dependent ATPase in rat liver plasma membranes. *J Biol Chem* 256, 11209-11215.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Mac Lennan, D. (1970). Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 245, 4508-4518.
- Mac Lennan, D., Brandl, C., Korczak, B. and Green, N. (1985). Amino-acid sequence of a $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 316, 696-700.
- Mac Manus, J. (1980). The purification of a unique calcium binding protein from Morris hepatoma 5123 tc. *Biochim Biophys Acta* 621, 296-304.
- Mac Manus, J., Hutnik, C., Sykes, B., Szabo, A., Williams, T. and Banville, D. (1989). Characterization and site-specific mutagenesis of the calcium-binding protein oncomodulin produced by recombinant bacteria. *J Biol Chem* 264, 3470-3477.
- Martell, A. and Sillen, L. (1971) Stability constants of metal ion complexes. Supplement No.1. Special Publication No. 25. The Chemical Society, London.
- Martonosi, A. (1980). Calcium pumps. *Fed Proc* 39, 2401-2402.
- Mas-Oliva, J. (1985). Synthesis of ATP catalyzed by the $(\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+})$ -ATPase from erythrocyte ghosts. Energy conservation in plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 812, 163-167.
- Mas-Oliva, J. (1987). Perspectivas en el estudio de la regulación de la bomba de calcio de membrana plasmática. *Ciencia* 38, 29-38.
- Mas-Oliva, J., Williams, A. and Nayler, W. (1979). ATP-induced stimulation of calcium binding to cardiac sarcolemma. *Biochem Biophys Res Commun* 87, 441-447.
- Mas-Oliva, J., de Meis, L. and Inesi, G. (1983). Calmodulin stimulates both adenosine 5'-triphosphate hydrolysis and synthesis catalyzed by a cardiac calcium ion dependent adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* 22, 5822-5825.

- Mas-Oliva, J., Pérez-Montfort, R., Cárdenas-García, M. and Rivas-Duro, M. (1990). Altered coupling states between calcium transport and (Ca^{2+},Mg^{2+}) -ATPase in the AS-30D Ascites hepatocarcinoma plasma membrane. *Mol Cell Biochem* 100, 39-50.
- Mas-Oliva, J. and Santiago-García, J. (1990). Cholesterol effect on thermostability of the (Ca^{2+},Mg^{2+}) -ATPase from cardiac muscle sarcolemma. *Bioch Int* 21, 233-241.
- Mas-Oliva, J. (1992). Effect of calmodulin on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase isolated from cardiac muscle. *Cardioscience* 3, 107-115.
- Means, A. and Rasmussen, C. (1988). Calcium, calmodulin and cell proliferation. *Cell Calcium* 9, 313-319.
- Missiaen, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F., Vralix, M., De Smedt, H. and Casteels, R. (1989). Phospholipid-protein interactions of the plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase. *Biochem J* 263, 687-694.
- Morcos, N. and Drummond, G. (1980). (Ca^{2+},Mg^{2+}) -ATPase in enriched sarcolemma from dog heart. *Biochim Biophys Acta* 598, 27-39.
- Muallem, S. and Karlish, S. (1983). Catalytic and regulatory ATP-binding sites of the red cell Ca^{2+} pump studied by irreversible modification with fluorescein isothiocyanate. *J Biol Chem* 258, 169-175.
- Muallem, S. and Karlish, S. (1981). Studies on the mechanism of regulation of the red-cell Ca^{2+} pump by calmodulin and ATP. *Biochim Biophys Acta* 647, 73-86.
- Murer, H. and Haldemann, B. (1981). Transcellular transport of calcium and inorganic phosphate in the small intestine epithelium. *Am J Physiol* 240, G409-416.
- Niggli, V., Adunyah, E., Penniston, J. and Carafoli, E. (1981). Purified (Ca^{2+},Mg^{2+}) -ATPase of the erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 256,395-401.
- Niggli, V., Penniston, J., and Carafoli, E. (1979). Purification of the (Ca^{2+},Mg^{2+}) -ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J Biol Chem* 254, 9955-9958.
- Niggli, V., Sigel, E. and Carafoli, E. (1982). The purified Ca^{2+} -pump of human erythrocyte membranes catalyzed an electroneutral Ca^{2+} - H^+ exchange in reconstituted liposomal systems. *J Biol Chem* 257, 2350-2356.
- Oakley, R., Kirsch, R. and Morris, R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 105, 361-363.
- Ohya, Y. and Anraku, Y. (1992) Yeast calmodulin: structural and functional elements essential for the cell cycle. *Cell Calcium* 13, 445-455.
- Ortega, A. and Mas-Oliva, J. (1984). Cholesterol effect on enzyme activity of the sarcolemmal (Ca^{2+},Mg^{2+}) -ATPase from cardiac muscle. *Biochim Biophys Acta* 773, 231-236.
- Ortega, A. and Mas-Oliva, J. (1986). Direct regulatory effect of cholesterol on the calmodulin stimulated calcium pump of cardiac sarcolemma. *Biochem Res Commun* 139, 868-874.

- Penefsky, H., Pullman, M., Datta, A. and Racker, E. (1960). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. II. Participation of a soluble adenosine triphosphatase in oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 235, 3330-3336.
- Penniston, J. (1982). Plasma membrane Ca^{2+} -pumping ATPases. *Ann N. Y. Acad Sci* 402, 296-303.
- Pershadsingh, H., Landt, M. and McDonald, J. (1980). Calmodulin-sensitive ATP-dependent Ca^{2+} transport across adipocyte plasma membranes. *J Biol Chem* 255, 8983-8986.
- Philipson, K. (1985). Sodium-calcium exchange in plasma membrane vesicles. *Ann Rev Physiol* 47, 561-571.
- Pratap, P., Robinson, J. and Steinberg, M. (1991). The reaction sequence of the Na^+/K^+ ATPase: rapid kinetics measurements distinguish between alternative schemes. *Biochim Biophys Acta* 1069, 288-298.
- Pullman, M., Penefsky, H., Datta, A. and Racker, E. (1960). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 235, 3322-3329.
- Rasmussen, H. (1970). Cell communication, calcium ion and cyclic adenosine monophosphate. *Science* 170, 404-412.
- Rasmussen, H. and Goodman, D. (1977). Relationships between calcium and cyclic nucleotides in cell activation. *Physiol Review* 57, 421-509.
- Reeves, J. and Sutko, J. (1979). Sodium-calcium ion exchange in cardiac membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 590-594.
- Reeves, J. and Sutko, J. (1980). Sodium-calcium exchange activity generates a current in cardiac membrane vesicles. *Science* 208, 1461-1464.
- Rega, A. and Garrahan, P. (1986). in *The Ca^{2+} pump of plasma membranes*, CRC Press, Florida, pp. 173.
- Rega, A. and Garrahan, P. (1980). Effects of calmodulin on the phosphoenzyme of the Ca^{2+} -ATPase of human red cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 596, 487-489.
- Reuter, H. (1983). Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* 301, 569-571.
- Reuter, H. and Seitz, N. (1968). The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol* 195, 451-470.
- Richards, D., Vidal, J., Garrahan, P. and Rega, A. (1977). ATPase and phosphatase activities from human red cell membranes. II. The effects of phospholipases on Ca^{2+} -dependent enzymic activities. *J Membr Biol* 35, 125-136.
- Richards, D., Rega, A., Garrahan, P. (1978). Two classes of site for ATP in the Ca^{2+} -ATPase from human red blood cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 511, 194-205.

- Rink, T., Smith, S. and Tsien, R. (1982). Cytoplasmic free Ca^{2+} in human platelets: Ca^{2+} thresholds and Ca-independent activation for shape-change and secretion. *FEBS Lett* 148, 21-26.
- Roelofsen, B. and Schatzmann, H. (1977). The lipid requirement of the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -ATPase in the human erythrocyte membrane, as studied by various highly purified phospholipases. *Biochim Biophys Acta* 464, 17-36.
- Ronner, P., Gazzotti, P. and Carafoli, E. (1977). A lipid requirement for the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -activated ATPase of erythrocyte membranes. *Arch Biochim Biophys* 179, 578-583.
- Santiago-García, J., Mas-Oliva, J., Saavedra, D. and Zarain-Herzberg, A. (1996). Analysis of mRNA expression and cloning of a novel plasma membrane Ca^{2+} -ATPase splice variant in human heart. *Mol Cell Biochem* (en prensa).
- Sarkadi, B., Enyedi, A. and Gárdos, G. (1980). Molecular properties of the red cell calcium pump. I. Effects of calmodulin, proteolytic digestion and drugs on kinetics of active calcium uptake in inside-out red cell membrane vesicles. *Cell Calcium* 1, 287-297.
- Schatzmann, H. and Vincenzi, F. (1969). Calcium movements across the membrane of human red cells. *J Physiol* 201, 369-395.
- Schatzmann, H. and Bürgin, H. (1978). Calcium in human red blood cells. *Ann N. Y. Acad Sci* 307, 125-147.
- Schatzmann, H. and Rossi, G. (1971). $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -activated membrane ATPases in human red cells and their possible relations to cation transport. *Biochim Biophys Acta* 241, 379-392.
- Schatzmann, H. (1982). The plasma membrane calcium pump of erythrocyte and other animal cells. in *Membrane Transport of Calcium*. Acad Press. London. pp. 41-108.
- Schatzmann, H. (1983). The red cell calcium pump. *Ann Rev Physiol* 45, 303-312.
- Shull, G. and Greeb, J. (1988). Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase from rat brain. *J Biol Chem* 263, 8646-8657.
- Simon, S., McIntosh, T. and Latorre, R. (1982). Influence of cholesterol on water penetration into bilayers. *Science* 216, 65-66.
- Smallwood, J., Gügi, B. and Rasmussen, H. (1988). Regulation of erythrocyte Ca^{2+} -pump activity by protein kinase C. *J Biol Chem* 263, 2195-2202.
- Somlyo, A. (1984). Cellular site of calcium regulation. *Nature* 309, 516-517.
- St. Louis, P. and Suiakhe, P. (1976). Isolation of sarcolemmal membranes from cardiac muscle. *Int J Biochem* 7, 547-558.
- Strehler, E. (1991). Recent advances in the molecular characterization of plasma membrane Ca^{2+} pumps. *J Memb Biol* 120, 1-15.

- Strehler, E., James, P., Fischer, R., Heim, R., Vorherr, T., Filoleo, A., Penniston, J. and Carafoli, E. (1990). Peptide sequence analysis and molecular cloning reveal two calcium pump isoforms in the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 265, 2835-2842.
- Szász, I., Sarkadi, B., Schubert, A. and Gárdos, G. (1978a). Effects of lanthanum on calcium-dependent phenomena in human red cells. *Biochim Biophys Acta* 512, 331-340.
- Szász, I., Hasitz, M., Sarkadi, B. and Gárdos, G. (1978b). Phosphorylation of the Ca^{2+} pump intermediate in intact red cells, isolated membranes and inside-out vesicles. *Molec Cell Biochem* 22, 147-152.
- Taffet, G. and Tate, Ch. (1992). The MgATPase activity of rat cardiac sarcoplasmic reticulum is a function of the calcium ATPase protein. *Arch Biochem Biophys* 299, 287-294.
- Tanford, Ch. (1983). Mechanism of free energy coupling in active transport. *Ann Rev Biochem* 52, 379-409.
- Taniguchi, K. and Mardh, S. (1993). Reversible changes in the fluorescence energy transfer accompanying formation of reaction intermediates in probe-labeled $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPase. *J Biol Chem* 268, 15588-15594.
- Taverna, R. and Hanahan, D. (1980). Modulation of human erythrocyte $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity by phospholipase A_2 and proteases. A comparison with calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun* 94, 652-659.
- The, R. and Hasselbach, W. (1977). Stimulatory and inhibitory effects of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol on ATPase activity and calcium transport of sarcoplasmic membranes. *Eur J Biochem* 74, 611-621.
- Urry, D. (1978). Basic aspects of calcium chemistry and membrane interaction: on the messenger role of calcium. *Ann N.Y. Acad Sci* 307, 3-27.
- Urry, D., Trapane, T., Walker, J. and Prasad, K. (1982). On the relative lipid membrane permeability of Na^+ and Ca^{2+} . *J Biol Chem* 257, 6659-6661.
- Van Alstyne, E., Burch, R., Knickelbein, R., Hungerford, R., Gower, E., Webb, J., Poe, S. and Lindenmayer, G. (1980). Isolation of sealed vesicles highly enriched with sarcolemma markers from canine ventricle. *Biochim Biophys Acta* 602, 131-143.
- Veigl, M., Sedwick, W. and Vanaman, T. (1982). Calmodulin and Ca^{2+} in normal and transformed cells. *Fed Proc* 41, 2283-2288.
- Verma, A., Filoleo, A., Stanford, R., Wieben, E., Penniston, J., Strehler, E., Fischer, R., Heim, R., Vogel, G., Mathews, S., Strehler-Page, M., James, P., Vorherr, T., Krebs, J. and Carafoli, E. (1988). Complete primary structure of a human plasma membrane Ca^{2+} pump. *J Biol Chem* 263, 14152-14159.

- Vorherr, T., James, P., Krebs, J., Ehyedi, A., Mc Cormick, D., Penniston, J. and Carafoli, E. (1990). Interaction of calmodulin with the calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *Biochemistry* 29, 355-365.
- Waisman, D., Gimble, J., Goodman, D. and Rasmussen, H. (1981). Studies of the Ca^{2+} transport mechanism of human erythrocyte inside-out plasma membrane vesicles. I. Regulation of the Ca^{2+} pump by calmodulin. *J Biol Chem* 256, 409-414.
- Wang, K., Wright, L., Machan, C., Allen, B., Conigrave, A. and Roufogalis, B. (1991). Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from human erythrocyte. *J Biol Chem* 266, 9078-9085.
- Warber, K. and Potter, J. (1986) in *The Heart and Cardiovascular System*. Fozzard, H., Haber, E., Jennings, R., Morgan, H. and Katz, A. eds. Vol 2. pp 779-788, Raven, N.Y.
- Wasserman, R. and Fullmer, C. (1983). Calcium transport proteins, calcium absorption, and vitamin D. *Ann Rev Physiol* 45, 375-390.