

03081

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

11
24

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS DE PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

Análisis térmico y molecular de la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana
plasmática

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA

JUAN D. ^{ae go} SANTIAGO GARCIA

MEXICO, D.F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	26
RESULTADOS	29
DISCUSION	31
CONCLUSIONES	56
PERSPECTIVAS	58
BIBLIOGRAFIA	60

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento:

Al Dr. Jaime Mas Oliva por todo su apoyo y motivación a lo largo de estos años.

Al Dr. Angel Zarain Herzberg por sus enseñanzas, comentarios y apoyo brindado.

Al Dr. Armando Gómez Puyou por sus valiosas opiniones, comentarios y apoyo en todo momento.

Al Dr. Mario Calcagno por su tiempo, comentarios y sugerencias como parte de mi comite tutorial.

A la Dra. Alicia Ortega, por su colaboración en la elaboración y discusión de los experimentos de inactivación térmica y calorimetría.

A los Dres: Jesús Aguirre Linares, H. Celis Sandoval, Edmundo Chávez Cosío, Luis Covarrubias, Fernando López Casillas, Ruy Pérez Montfort y Luis Servín, por el tiempo dedicado a la revisión de la tesis, por sus valiosos comentarios y sugerencias.

A Blanca Delgado, por todo su apoyo técnico, pero sobre todo por su amistad.

A Irma y Celis por su amistad y el apoyo que me brindaron durante una etapa de mi Doctorado.

A Lupis por darse a la tarea de establecer el método para aislar y caracterizar la fracción de membranas microsomales de músculo cardíaco, así como el método para aislar a la ATPasa- Ca^{2+} , y por su amistad.

Al Departamento de Becas de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la U.N.A.M., por la beca otorgada durante mis estudios de Doctorado.

Al Sistema Nacional de Investigadores por el estímulo económico recibido durante mis estudios de Doctorado.

RESUMEN

La ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática (ACMP) es una enzima ubicua de las células eucariontes. Esta enzima transporta el calcio del citoplasma al espacio extracelular, a expensas de la hidrólisis de ATP. En esta tesis se presenta un estudio termodinámico del efecto del colesterol y el calcio en la estabilidad de esta enzima, así como el análisis de la expresión de los genes que codifican para esta enzima durante el desarrollo fetal del corazón de humano. Los resultados señalan que el colesterol confiere estabilidad térmica a la ATPasa- $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ de microsomas de músculo cardíaco. Al incorporar colesterol en las membranas microsomales, la inactivación y la desnaturalización térmica de la enzima se alcanza a temperaturas más altas. Los resultados obtenidos con la enzima aislada muestran que el colesterol también propicia una disminución en las velocidades de inactivación de la enzima. Sin embargo, las temperaturas de inactivación de la enzima aislada ocurren 10-15°C por debajo de la inactivación de la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ presente en las membranas, lo que indica que la integridad de las membranas es muy importante para la estabilidad de la enzima. Encontramos que el Ca^{2+} es un factor importante en la estabilidad de la enzima aislada, la unión de este catión provoca que la inactivación de la enzima se alcance a temperaturas más altas, así mismo provoca que las velocidades de inactivación disminuyan. La unión de Ca^{2+} induce cambios en la entalpía y entropía durante la transición de la enzima del estado activo a inactivo.

Por otro lado se estudio la expresión de los genes que codifican para la ACMP durante el desarrollo fetal del corazón de humano. Los resultados muestran, que los genes ACMP1 y ACMP4 se expresan en todos los estadios del desarrollo, en especial las isoformas 1b y 4b. El gen 2 (ACMP2) se detectó en niveles muy bajos en corazón de adulto, pero no se detecta en estados fetales. El gen 3 (ACMP3) no se expresa en muestras de tejido cardíaco o en placenta. El patrón de expresión de las diferentes isoformas cambia a medida que progresa el desarrollo fetal. Sin embargo, el resultado más importante de nuestro trabajo consiste en la descripción de una nueva variante, correspondiente al gen 4 denominada 4d. Esta variante se obtiene por la presencia de un sitio donador interno en el exón C, que permite la inclusión parcial de este exón en el ARNm. El corte y empalme alterno del exón C, da como resultado tres variantes (4a, 4b y 4d), que presentan diferencias en la región que codifica para el extremo carboxilo terminal de la enzima. Por su parte, las isoformas 2a, 2b y 3 de la ATPasa- Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico se expresan desde estadios muy tempranos del desarrollo y su expresión es constante a lo largo del desarrollo fetal del corazón de humano.

ABSTRACT

The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA) is an ubiquitous protein of eucaryotic cells. This enzyme pumps calcium from the cytoplasm to the extracellular space employing the hydrolysis of ATP. In this thesis I present a thermodynamic study on the effects of cholesterol and calcium on the enzyme's activity and stability, as well as the analysis of the mRNA expression of the genes encoding for the PMCA. The results show that cholesterol stabilizes the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase of cardiac microsomes against thermal inactivation and denaturation. Incorporation of cholesterol in the microsomal membranes produces an increase in the inactivation and denaturation temperatures of the enzyme. For the isolated PMCA, cholesterol also produces a decrease in the inactivation rates. However, inactivation of the isolated enzyme occurs 10 to 15°C below, to the one present in the microsomal membranes. This data suggest that the integrity of the membrane seems to be important for the stability of this enzyme. We found that Ca^{2+} is an important factor for the stability of the PMCA. Calcium binding to the enzyme produces an increase in temperature for the inactivation, as well as a decrease in the inactivation rates. This cation induces changes in the enthalpy and entropy during the transition from the active to the inactive forms of the enzyme.

On the other hand we analysed the expression of the genes encoding for PMCA in developing human heart and placenta as a control. PMCA1 and PMCA4 are expressed in all fetal stages, specially isoforms 1b and 4b. Isoforms corresponding to the PMCA2 gene were detected in human adult heart only, whereas gen 3 is not expressed in heart nor in placenta. The expression pattern of the PMCA isoforms change during the fetal development. The main contribution of this study is the description of a novel spliced variant corresponding to the PMCA4 gene. DNA sequence analysis reveals that this variant is generated by an internal donor site in exon C, which in turn codifies for the carboxy terminus region of the protein. Screening of a fetal human heart cDNA library allowed us to isolate 8 clones encoding for the PMCA1 and PMCA4, confirming that these are the two main genes expressed in cardiac muscle. Analysis of mRNAs encoding for the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, shows that isoforms 2a, 2b and 3 are expressed in the heart, from early stages of development.

INTRODUCCION

La membrana plasmática es altamente impermeable al calcio, por lo que mantiene un gradiente de concentración entre el interior y el exterior de la célula. La concentración del ión calcio (Ca^{2+}) en el espacio extracelular es de 1 a 3×10^{-3} M, mientras que su concentración en el citoplasma es de 10^{-7} M.

Como respuesta a diversos estímulos hormonales, eléctricos y químicos, la célula permite la entrada masiva de calcio a través de canales localizados en la membrana plasmática, lo que a su vez induce la liberación de Ca^{2+} de varios reservorios intracelulares. El aumento en la concentración citoplásmica de este catión constituye la señal para disparar una gran variedad de respuestas celulares como son: la liberación de neurotransmisores, la contracción muscular, liberación de hormonas, etc. Para recuperar su condición basal, la célula debe restablecer su concentración intracelular de calcio a niveles submicromolares, de otra forma permanecería permanentemente activada y eso la conduciría a la muerte.

Las células cuentan con varios mecanismos para remover el exceso de Ca^{2+} del citoplasma como son: la ATPasa- Ca^{2+} localizada en la membrana del retículo sarco(endo)plásmico, que transporta el Ca^{2+} del citoplasma al lumen del retículo, a expensas de la hidrólisis del ATP (Inesi, 1985). También se han descrito sistemas de transporte de calcio en la mitocondria, organelo que parece participar como amortiguador de las concentraciones de este catión (Carafoli y Crompton, 1978).

Por otro lado, en la membrana plasmática existen dos mecanismos que permiten la salida de Ca^{2+} de las células; un intercambiador Na^+ - Ca^{2+} (acoplado a la ATPasa- Na^+/K^+) y la ATPasa- Ca^{2+} , enzima que bombea el exceso de Ca^{2+} hacia el exterior de la célula a expensas de la hidrólisis de ATP. El intercambiador es un sistema de baja afinidad y alta capacidad

(presente sólo en algunos tipos celulares), mientras que la ATPasa-Ca²⁺ es de alta afinidad pero baja capacidad (Blaustein y Nelson, 1982; Carafoli, 1987).

La importancia de la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática (ACMP) radica en su capacidad de remover el exceso de calcio del citoplasma hasta restablecer los niveles encontrados en estado de reposo (10⁻⁷ M), debido a que tiene una afinidad 10 veces mayor para el Ca²⁺ en relación a la ATPasa-Ca²⁺ de retículo sarco(endo)plásmico (Carafoli y Stauffer, 1994).

Características Generales de la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática

Desde la demostración de su existencia en eritrocitos de humano en 1966 (Shatzman, 1966), la ACMP ha sido caracterizada y purificada a partir de una gran diversidad de tejidos y tipos celulares. Estos estudios sugieren que la ATPasa-Ca²⁺ es una enzima ubicua de la membrana plasmática de las células eucariotas (Rega y Garrahan, 1985; Carafoli, 1987; Carafoli, 1992; Strehler, 1991). Esta enzima, transporta o bombea el Ca²⁺ del citoplasma al espacio extracelular a expensas de la hidrólisis del ATP, con una estequiometría Ca²⁺/ATP cercana a uno (Carafoli, 1992).

La ACMP está formada por un solo polipéptido con una masa molecular aproximada de 130 a 140 kDa. Durante su ciclo catalítico, la enzima forma un intermediario fosforilado (Fig. 1), por la transferencia del fosfato gama del ATP a un residuo específico de ácido aspártico y su actividad es inhibida por el ortovanadato. Debido a estas dos características, la ACMP ha sido clasificada dentro del grupo de las ATPasas tipo P (Pedersen y Carafoli, 1987). La K_{0.5} para el Ca²⁺ es de aproximadamente 10⁻⁶ M; sin embargo, la enzima alcanza una activación máxima entre 10⁻⁵ a 10⁻⁴ M, las concentraciones mayores de este catión provocan inhibición. Su

actividad depende de concentraciones micromolares de Mg^{2+} libre, y tiene una alta especificidad por el ATP como sustrato (Rega y Garrahan, 1985).

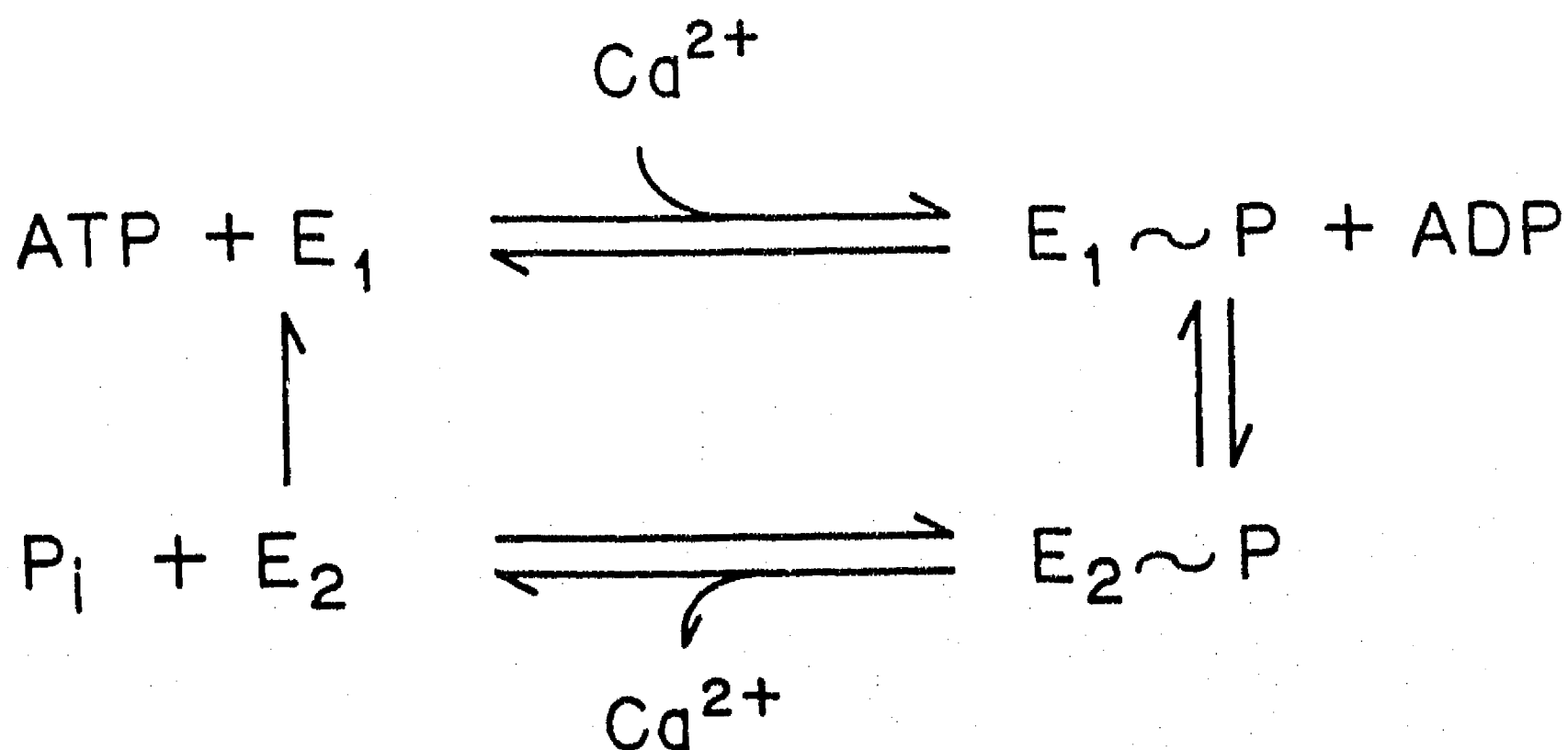


Fig. 1. Ciclo catalítico de la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática. La enzima hidroliza ATP de manera cíclica a través de dos estados conformacionales (E_1 y E_2). En conformación E_1 , la enzima puede unir Ca^{2+} y ATP con alta afinidad. Posteriormente se transfiere el fosfato gama del ATP a un grupo acilo de la enzima y se forma el complejo ternario $Ca^{2+} \cdot E_1 \cdot P$, conocido como intermediario fosforilado. La enzima pasa a un estado $E_2 \cdot P$, para lo cual requiere Mg^{2+} . En este estado la afinidad por el Ca^{2+} disminuye, por lo tanto, la enzima libera el Ca^{2+} en el espacio extracelular. Posteriormente se libera el fosfato de la enzima y pasa de la conformación E_2 a E_1 .

Una propiedad distintiva de la ACMP es su estimulación por interacción directa con la calmodulina. Esta propiedad ha sido aprovechada para purificar a la enzima de diversos tipos celulares, por medio de columnas de calmodulina-sefarosa (Niggli y col, 1979). En presencia de concentraciones óptimas de calmodulina (1nM), la K_m para el Ca^{2+} disminuye de 20 μM a cerca de 0.5 μM y la V_{max} aumenta considerablemente (Rega y Garrahan, 1985). En ausencia de calmodulina la ACMP es estimulada por fosfolípidos ácidos o ácidos grasos poliinsaturados (Niggli y col, 1981, Carafoli y Zurini, 1982), tratamiento con enzimas proteolíticas (Zurini y Carafoli, 1985, Benaim y Carafoli, 1984, Wang y col, 1990, James y col, 1991), fosforilación por proteína cinasa A (Caroni y Carafoli, 1981), o proteína cinasa C. Cuando la enzima se trata con tripsina pierde su respuesta a calmodulina, debido al corte del extremo carboxilo terminal, por lo que la enzima se mantiene permanentemente activa (Zurini y Carafoli, 1984, Benaim y Carfoli, 1984).

A diferencia de la tripsina, la proteasa calpaina puede tener efectos importantes *in vivo*, debido a que la calpaina ataca preferencialmente proteínas que presentan dominios de unión a calmodulina (Wang y col, 1988). En ausencia de calmodulina, la calpaina corta un fragmento del carboxilo terminal que contiene los dominios de unión a calmodulina y genera una enzima activada de 127 kDa. Sin embargo la presencia de calmodulina retrasa la proteólisis por calpaina y altera el patrón de corte (Wang y col, 1991; James y col, 1989).

Regulación de la actividad de la ATPasa- Ca^{2+} por lípidos.

La actividad de la ATPasa- Ca^{2+} de membrana plasmática, al igual que otra serie de enzimas y proteínas de diversas membranas, está regulada por la composición lipídica. El tratamiento de las membranas con fosfolipasas suprime la actividad de la ATPasa- Ca^{2+} , la actividad se restablece al

adicionar lípidos exógenos (Richards y col, 1977; Roelofsen y Schatzman, 1977; Ronner y col, 1977). De manera similar, al solubilizar fracciones de membrana plasmática con detergentes, es necesario adicionar fosfolípidos para preservar la actividad de la enzima (Niggli y col, 1979; Gietzen y col, 1980).

La disponibilidad de preparaciones de ATPasa pura, en conjunto con el desarrollo de los procedimientos para reconstituir a la enzima en vesículas de una composición lipídica conocida, han facilitado los estudios de interacción de la ATPasa- Ca^{2+} con su ambiente lipídico. Estos estudios han permitido concluir que para preservar la actividad de la enzima, no se requiere una clase específica de lípido. Sin embargo, los efectos de la calmodulina sí parecen depender de las propiedades físico-químicas del ambiente lipídico (Rega y Garrahan, 1985). Cuando la enzima se reconstituye con fosfatidilserina (PS) y otros lípidos ácidos, pierde la capacidad de ser estimulada por calmodulina, mientras que esta estimulación es máxima cuando la enzima se reconstituye con fosfatidilcolina (PC) (Carafoli y Zurini, 1982; Niggli y col, 1979).

Los fosfolípidos ácidos provocan un aumento en la V_{max} , la afinidad para el calcio y ligeramente la cooperatividad por Ca^{2+} de la ACMP. Los efectos combinados en la V_{max} , la $K_{0.5}$ y la cooperatividad para el Ca^{2+} dan como resultado un aumento en la actividad específica de la enzima (Carafoli y Zurini, 1982; Missiaen y col, 1989). La potencia relativa de los fosfolípidos ácidos para estimular la actividad de la ACMP, es la siguiente: fosfatidilinositol difosfato (PIP_2) > fosfatidilinositol monofosfato (PIP) > ácido fosfatídico (PA) > fosfatidil inositol (PI) = PS > PC. El fosfatidil inositol difosfato (PIP_2) y el PA tienen un efecto bifásico, ya que estimulan a bajas concentraciones, mientras que a altas concentraciones tienen un efecto inhibitorio en la actividad de la enzima. Por su parte, la PS y el PI tienen un efecto estimulador que va en función de su concentración (Missiaen y col,

1989). En presencia de PS la enzima mantiene sus propiedades de unión a la calmodulina, y es retenida por columnas de calmodulina-sefarosa con la misma eficiencia que al estar estabilizada por PC (Niggli y col, 1979, Gietzen y col, 1980). Un estudio, en el que se empleó dicroísmo circular, señala que la calmodulina y la PS inducen cambios estructurales diferentes en la enzima (Wrzosek y col, 1989).

Efecto del colesterol en la actividad de la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plásmática y otras proteínas membranales.

Los cambios en las propiedades físicas de las membranas, ejercidos por la presencia del colesterol, se han relacionado con la función de varias proteínas y propiedades de las membranas. Dentro de estas funciones se encuentran: el transporte de azúcares (Melchior y Czech, 1979; Grunze y col, 1980; Carruthers y col, 1988), el transporte de aminoácidos (McElhany, 1985), transporte activo (Papahajoupoulos y col, 1973; Flaherty y col, 1975), permeabilidad (Kroes y Ostwald, 1971; Scarpa y DeGier, 1971; DeKruyff y col, 1972), inmunoquímica (Esser y col, 1979), etc.

Estudios realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que los niveles de colesterol en la membrana plasmática pueden modular la actividad de la ATPasa-Ca²⁺. El aumento del contenido de colesterol en sarcolema de músculo cardíaco tiene un efecto inhibitorio en la actividad de la enzima, mientras que la extracción de este lípido de las membranas estimula su actividad (Ortega y Mas-Oliva, 1984, 1986). Para la ATPasa-Ca²⁺ de retículo sarcoplásmico (RS) existe controversia, ya que algunos trabajos sostienen que al aumentar la cantidad de este esteroide en el RS se produce una inhibición proporcional en la actividad (Madden y col, 1979; 1981); mientras que otros autores reportan que el colesterol no tiene efectos en la actividad de la enzima (Johansson y col, 1981c). Al realizar estudios con la enzima reconstituida en liposomas de PC/colesterol, se encontró que el colesterol no tiene efecto en la actividad de la ATPasa a temperaturas

mayores de 30°C. Sin embargo, a temperaturas menores de 30°C, el colesterol aparentemente inhibe la actividad de la enzima (Hesketh, 1976). Para la ATPasa-Na⁺/K⁺ reconstituida en liposomas de PC con diferentes cantidades de colesterol, se ha encontrado que existe una concentración crítica de colesterol (0.4 moles) donde la actividad de la enzima es óptima, concentraciones mayores o menores, provocan una disminución de su actividad (Yeagle, 1983). También se ha demostrado, que el colesterol es necesario para mantener la estructura y la función del receptor de acetilcolina (McNamee y Fong, 1987). La reconstitución de este receptor en liposomas carentes de colesterol provoca su inactivación.

Efecto de la temperatura en las actividades enzimáticas

La mayoría de las reacciones químicas proceden a una velocidad más rápida a medida que la temperatura aumenta. El aumento en la temperatura imparte más energía cinética a las moléculas reactantes, lo que da como resultado más colisiones por unidad de tiempo. Las reacciones catalizadas por enzimas, también obedecen estos principios. La actividad catalítica de las enzimas resulta de una estructura terciaria o cuaternaria precisa y ordenada, que se mantiene básicamente por interacciones débiles no covalentes. Si la enzima absorbe mucha energía, la estructura terciaria se puede dañar o romper y la molécula se puede inactivar y desnaturalizar. Esto es, a medida que la temperatura aumenta hay un incremento en las colisiones de enzima y sustrato lo que a su vez provoca un aumento en la velocidad de la reacción. Sin embargo, esto va acompañado de un aumento en la tasa de desnaturalización de la enzima (Segel, 1975). La estabilidad de una proteína a la temperatura depende de varios factores incluyendo: el pH, fuerza iónica, presencia o ausencia de ligandos. Los sustratos con frecuencia protegen a las enzimas contra la desnaturalización por temperatura. En general, una enzima puede ser más estable en extractos crudos que en forma aislada, al

encontrarse en contacto con una concentración alta de otras proteínas (Segel, 1975).

Análisis térmico para el estudio de las proteínas

La unión de ligandos o iones metálicos pueden inducir cambios en la estructura de las proteína y con frecuencia protegen a las proteínas contra la desnaturalización por temperatura. Estos cambios conformacionales se pueden seguir por diferentes técnicas espectroscópicas como son: fluorescencia, dicroísmo circular, resonancia magnética nuclear y resonancia del espín del electrón. El análisis térmico ofrece otra alternativa para investigar cambios estructurales. El principio de esta técnica se basa en la diferente sensibilidad a la temperatura que las proteínas pueden tener después de sufrir cambios en su estructura por la unión de ligandos.

El análisis térmico ha sido aplicado exitosamente al estudio de muchos materiales y macromoléculas. La aproximación general es monitorear transiciones de las moléculas en función de la temperatura. Para las proteínas, esto ha permitido la determinación de la desnaturalización o desdoblamiento de una proteína completa o de dominios específicos (Privalov, 1982). Cualquier técnica física que refleje ampliamente el proceso del desdoblamiento puede ser usada, sin embargo, la calorimetría diferencial de barrido es la metodología más empleada. El análisis térmico permite obtener información de la presencia de dominios, la fuerza de interacción de estos dominios, y los efectos de la unión de ligandos o sustratos en la estabilidad de las proteínas. En condiciones favorables es posible obtener un esquema de baja resolución de una macromolécula compleja (Tsalkora y Privalov, 1985; Lepock y col, 1990).

Diversos reportes en la literatura han demostrado que los cationes pueden tener un papel muy importante en la estabilidad de varias proteínas. La unión de Ca^{2+} a la ATPasa- Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico, propicia que la desnaturalización de la enzima se lleve a cabo en dos etapas, mientras que en

ausencia de calcio la desnaturalización de la enzima muestra un solo componente. El calcio permite distinguir dos dominios o zonas de la proteína que muestran una sensibilidad diferente a la temperatura (Lepock y col, 1990). En otras proteínas también se ha encontrado que el calcio provoca un aumento en la temperatura de desnaturalización, como son: la fosfodiesterasa alcalina (Belli y col, 1994), la α -lactoglobulina (Mitani y col, 1986), y la β -glucanasa (Keitel y col, 1994). La creación de sitios de alta afinidad para unión de Ca^{2+} en proteínas que de manera natural no unen a este catión, ha demostrado que la unión de Ca^{2+} puede estabilizar proteínas como la subtilisina (Pantoliano y col, 1988) y la lisosima (Kuroki y col, 1989; 1992). Además del calcio, se ha encontrado que otros cationes divalentes como el zinc y el cobre pueden tener un efecto estabilizante en algunas proteínas (Roe y col, 1988; Chlebowski y col, 1979). Para la pirofosfatasa de membrana de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum*, también se ha encontrado que el Ca^{2+} , Zn^{2+} y Mg^{2+} protegen a la enzima contra la inactivación térmica (Ordáz y col, 1992).

Por otro lado, para varias proteínas de membrana se ha demostrado que la composición lipídica es importante para mantener su estructura, actividad y estabilidad. La citocromo oxidasa muestra una mayor actividad y estabilidad al ser reconstituida con fosfolípidos que presentan ácidos grasos de cadena larga y saturados (18-20 carbonos). La desnaturalización de la enzima reconstituida en ácidos grasos de cadena larga se alcanza a temperaturas más altas y presenta dos componentes, lo que sugiere que en esas condiciones existen interacciones lípido-proteína que permiten estabilizar preferentemente algunas subunidades de la enzima (Morin y col, 1990; Rigell y col, 1987). Para la banda 3 del eritrocito, también se encontró que los ácidos saturados de cadena larga permiten que la estabilidad de la proteína sea mayor (Maneri y Low, 1988).

En otro tipo de estudios se ha demostrado que el colesterol puede participar en la estabilidad de diversas proteínas membranales. En nuestro grupo hemos demostrado que el colesterol puede estabilizar a la ATPasa-Ca²⁺ de sarcolema cardíaco contra la inactivación térmica (Mas-Oliva y Santiago-García, 1991). Al incorporar colesterol en la membranas, la enzima muestra una mayor actividad a temperaturas altas, en comparación con la enzima presente en membranas extraídas de colesterol. El efecto estabilizador del colesterol contra la inactivación térmica, también se ha observado para la ATPasa-Ca²⁺ de retículo sarcoplásmico (Cheng y col, 1987), así como para el receptor de acetilcolina (Atigues y col, 1993), y para la UDP-glucoronil transferasa (Rotenberg y Zakim, 1991).

BIOLOGIA MOLECULAR DE LA ATPasa-Ca²⁺ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Determinación de la estructura primaria de la ATPasa-Ca²⁺

La determinación de la secuencia de aminoácidos de los fragmentos tripticos que contienen los sitios de unión al isotiocianato de fluoresceína (FITC), que se considera el sitio de unión al ATP de las ATPasas tipo P (Ovchinnikov y col, 1987), así como la secuencia de aminoácidos del sitio de unión de calmodulina de la bomba de calcio de eritrocitos de humano (James y col, 1988), constituyeron el punto de partida para iniciar la clonación de la ACMP. En 1988 se publicó la secuencia completa de dos isoformas de esta enzima a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro de rata (Shull y Greeb, 1988). En el mismo año se reportó la secuencia de una isoforma de esta enzima, deducida a partir de una biblioteca de ADNc de un teratoma de humano (Verma y col, 1988).

El análisis de diversas bibliotecas genómicas y de ADNc de rata, humano, conejo y bovino, han permitido establecer que la ACMP pertenece a una familia multigénica, codificada por 4 genes. De esta forma se ha

deducido la secuencia de aminoácidos de cuatro isoformas de la ACMP de rata (Shull y Greeb, 1988; Greeb y Shull, 1989; Keeton y Shull, 1994), tres isoformas en humano (Verma y col, 1988; Strehler y col, 1990; Heim y col, 1992), una en conejo (Khan y Grover, 1991), una en cerdo (DeJaegere y col, 1990), y la secuencia parcial de una isoforma en bovino (Brandt y col, 1988).

Las ACMP de células de mamífero varían en tamaño, entre 1,159 y 1,258 residuos de aminoácidos, con masas moleculares calculadas entre 127.3 a 138 kDa (Tabla I). Las isoformas correspondientes entre humano y rata muestran una similitud del 97 al 99%, mientras que los productos de genes diferentes en una misma especie muestran de 75 a 85% de similitud en su secuencia (Strehler, 1991; Carafoli y Stauffer, 1994).

TABLA I

Isoformas de la ATPasa-Ca²⁺ de la Membrana Plasmática

Isoforma	Especie	Variantes	Número de residuos	Masa Molecular calculada
ACMP1	Rata, conejo cerdo y humano	1a	1,176	129,500
		1b	1,220	134,700
		1c	1,249	137,800
		1d	1,258	138,800
ACMP2	Rata y humano	2f	1,198	132,600
		2g	1,243	136,800
		2h	1,212	134,000
ACMP3	Rata	3a	1,159	127,300
ACMP4	Humano y rata	4a	1,170	129,400
		4b	1,205	133,900
		4g	1,169	130,300

La posición de los cuatro genes que codifican para la ACMP de humano se ha mapeado recientemente. El gen 1 (ACMP1) se localiza en el cromosoma 12 (q21-q32) (Olson y col, 1991), el gen 2 se localiza en el cromosoma 3 (p25-p26) (Brandt y col, 1992b; Latif y col, 1993), el gen 3, en el cromosoma X (q-28) (Wang y col, 1995) y el gen 4 en el cromosoma 1 (q25-q32) (Olson y col, 1991).

Determinación de secuencias y regiones similares entre la ATPasa- Ca^{2+} y otras ATPasas tipo P

Diversos estudios de marcaje directo, seguidos de proteólisis y/o ruptura con bromuro de cianógeno, purificación y secuencia de péptidos, han permitido identificar la secuencia de aminoácidos del sitio de formación del intermediario fosforilado y del sitio de unión de la FITC (considerado el sitio de unión al ATP) (Ovchinnikov y col, 1987; Filoteo y col, 1987). Así mismo, han permitido determinar la secuencia del sitio de unión de análogos del ATP no hidrolizables como lo son: el 5'-[p-(fluoro-sulfonil)benzoil]adenosin (FSBA) y el gama-[4-(N-2-cloroetil-N-metilamino)bencil ATP] (CIRATP), considerado como el sitio de unión de ATP de baja afinidad (Ohta y col, 1986).

Otros estudios similares han permitido deducir la secuencia de la ATPasa- Ca^{2+} que interacciona con la calmodulina (James y col, 1988). De manera complementaria a estos estudios, el análisis de las secuencias de diversas isoformas de la ACMP y su comparación con las secuencias de otras ATPasas tipo P, han permitido determinar y establecer las secuencias de aminoácidos que participan en la unión del ATP, sitio de fosforilación y otros (Fig 2).

La Figura 2A muestra la comparación de la secuencia del sitio de unión a FITC (sitio de unión al ATP) de tres isoformas de la ACMP y otras tres ATPasas tipo P. Es importante destacar el alto grado de similitud de las secuencias en torno a este sitio, hay cuatro residuos que se conservan, lisina

A)

ACMP1h	M	Y	S	K	G	A	S	E	I	I	L	R
ACMP1r	I	F	S	K	G	A	S	E	I	I	L	K
ACMP2r	M	Y	S	K	G	A	S	E	I	V	L	K
ACRS	M	F	V	K	G	A	P	E	G	V	I	D
ANaK	L	V	M	K	G	A	P	E	R	I	L	E
AHK	L	V	M	K	G	A	P	E	R	V	L	E

B)

ACMP1h	M	G	N	A	T	A	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T	M
ACMP1r	M	G	N	A	T	A	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T	M
ACMP2r	M	G	N	A	T	A	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T	T
ACRS	L	G	C	T	S	V	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T	T
ANaK	L	G	S	T	S	T	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T	Q
AHK	L	G	T	C	S	V	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T	Q

C)

ACMP1r	697	C	Q	R	A	G	I	T	V	R	M	V	T	G	D	N	I	N	T	A	R	A	I	A	719
ACMP1r	787	E	Q	R	Q	-	-	V	V	-	A	V	T	G	D	G	T	N	D	G	P	A	L	K	806
ACRS	690	L	Q	S	F	D	E	I	T	-	A	M	T	G	D	G	V	N	D	A	P	A	L	K	711
ANaK	698	C	Q	R	Q	G	A	I	V	-	A	V	T	G	D	G	V	N	D	S	P	A	L	K	719
AHK	714	C	Q	R	L	G	A	I	V	-	A	V	T	G	D	G	V	N	D	S	P	A	L	K	735
AKEc	506	Y	Q	A	E	G	R	L	V	-	A	M	T	G	D	G	T	N	D	A	P	A	L	A	527
AHL	623	Q	N	R	-	G	Y	L	V	-	A	M	T	G	D	G	V	N	D	A	P	S	L	K	643
AHNc	623	Q	Q	R	-	G	Y	L	V	-	A	M	T	G	D	G	V	N	D	A	P	S	L	K	643

Fig. 2. Comparación de secuencias de las ACMP con secuencias de otras ATPasas tipo P. A) Comparación de secuencias correspondientes al sitio de unión de FITC/ATP. B) Comparación de secuencias correspondientes al sitio de fosforilación o de formación del intermediario fosforilado. C) Comparación de secuencias correspondientes al sitio de unión de análogos del ATP no hidrolizables (FSBA y CIRATP). Las abreviaturas corresponden a: ACMP1h, ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática isoforma 1 de humano; ACMP1r, ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática isoforma 1 de rata; ACMP2r, ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática isoforma 2 de rata; ACRS ATPasa-Ca²⁺ de retículo sarco(endo)plásmico; ANaK, ATPasa-Na⁺/K⁺; AHK, ATPasa-H⁺/K⁺; AKEc, ATPasa-K⁺ de *Escherichia coli*; AHL, ATPasa-H⁺ de levadura, AHNc, ATPasa-H⁺ de *Neurospora crassa* (Tomado de Shull y Greeb, 1988).

(K) (residuo al que se une FITC), glicina (G), alanina (A) y ácido glutámico (E). De manera similar, la Figura 2B muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos del sitio de formación del intermediario fosforilado. Al igual que el sitio de unión al FITC, esta región está altamente conservada en las ATPasas tipo P y se puede observar la secuencia característica **ICSDKTGTLTM**, donde el residuo de ácido aspártico (D) es el responsable de formar la unión covalente con el fosfato gama del ATP.

Por otro lado, las evidencias bioquímicas sugieren la existencia de dos sitios de unión para el ATP en diversas ATPasas tipo P, un sitio de alta afinidad que tiene función catalítica y un sitio de baja afinidad con función regulatoria (Rega y Garrahan, 1985). Uno de estos sitios corresponde a la región que une a el FITC y el otro puede corresponder a la región que une FSBA y CIRATP (análogos del ATP no hidrolizables). La Figura 2C muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos correspondiente al sitio de unión a FSBA/CIRATP, la similitud en esta región es menor a la encontrada en las figuras 2A y 2B. Sin embargo, la secuencia **TGD** (Thr-Gly-Asp) responsable de esta unión, está totalmente conservada en todas las ATPasas comparadas.

Organización Transmembranal y Topología de la ATPasa-Ca²⁺ de la Membrana Plasmática

La secuencia de aminoácidos de la ACMP y otras ATPasas tipo P se han analizado de acuerdo al algoritmo de Kyte y Doolittle (1982) y otros algoritmos para predecir hélices transmembranales. Los resultados predicen diez hélices o cruces transmembranales (Fig. 3). Es notorio que varias de las ATPasas tipo P muestran una organización muy similar, a pesar de sus diferencias a nivel de secuencia. Este tipo de análisis, en conjunto con las predicciones de estructura secundaria, comparación y mapeo de secuencias en otras ATPasas tipo P, han permitido proponer un modelo para la ACMP.

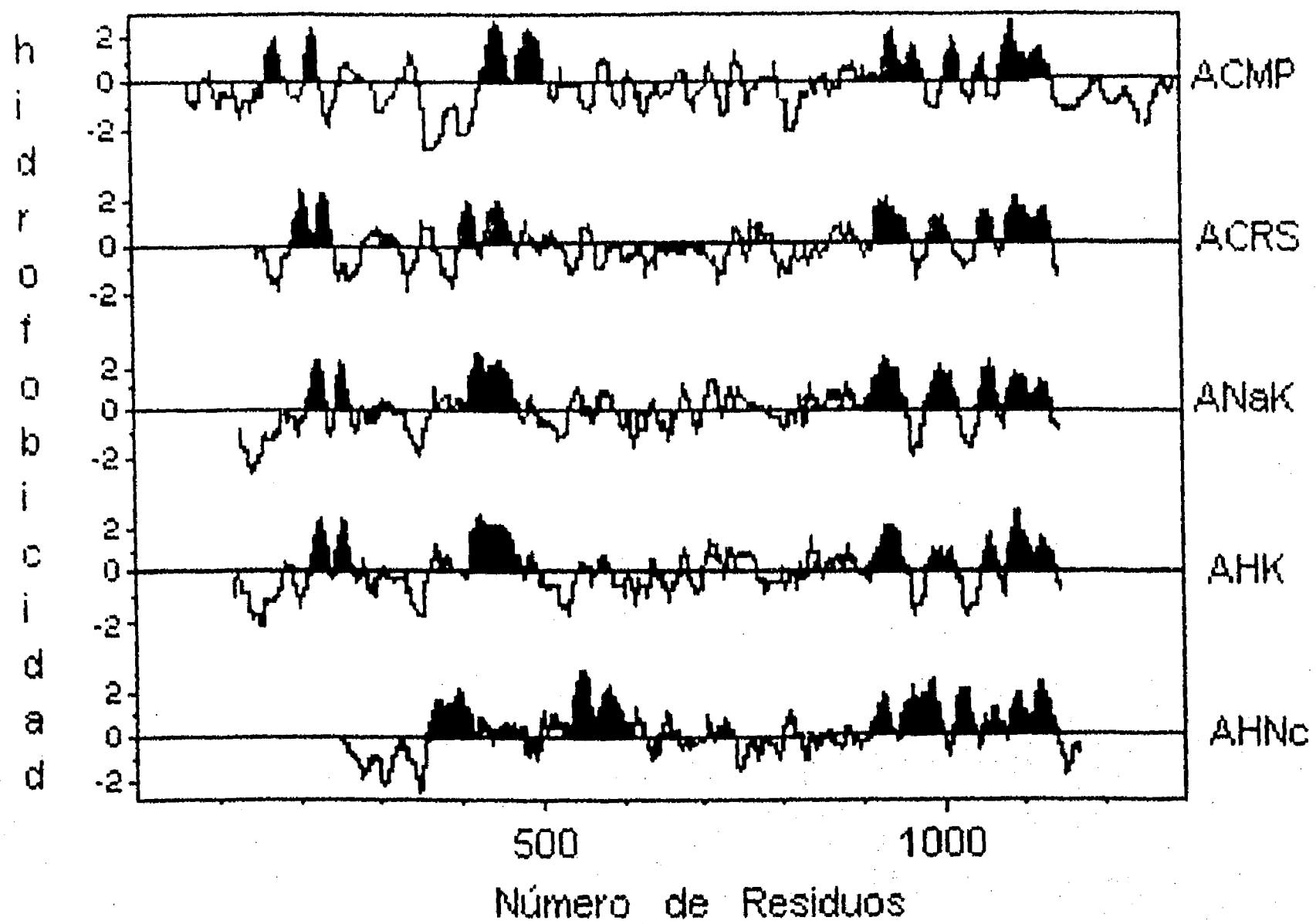


Fig. 3. Gráficas de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de cinco ATPasas tipo P, obtenidas por medio del algoritmo de Kyte y Doolittle (1982). Las abreviaturas corresponden a la figura 2.

La figura 4 presenta un modelo planar de la posible estructura de la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática. Este modelo toma como base el modelo propuesto para la ATPasa- Ca^{2+} de retículo sarco(endo)plásmico (Brandl y col, 1987), con la diferencia que la región carboxilo terminal de la ACMP es más prolongada. Precisamente esa es una de las regiones que marca una gran diferencia entre la ATPasa- Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico y la ACMP. En esta región se lleva a cabo la unión con calmodulina y se encuentran otras secuencias importantes para la regulación de la actividad de la enzima.

El modelo muestra los diez dominios o cruces membranales, un gran dominio citoplásmico de estructura alfa-beta entre los cruces membranales 4 y 5, donde se localiza el sitio de fosforilación y el sitio de unión para el ATP (Fig 4). También, muestra un pequeño dominio citoplásmico entre los cruces membranales 2 y 3, donde se ubica la región que participa en la interacción con fosfolípidos. Por otro lado, en el extremo carboxilo terminal se localizan los dominios de unión a calmodulina, el sitio de fosforilación por proteína cinasa dependiente de AMPc y sitios de corte por calpaina (Fig 4). El modelo sugiere que la mayor parte (aproximadamente 80%) de la ACMP se localiza en el citoplasma, mientras que en la cara extracelular solo se encuentran asas muy pequeñas que conectan los segmentos membranales. Todo parece indicar que la arquitectura de la ACMP es muy similar a la de otras ATPasas tipo P.

A diferencia de otras ATPasas tipo P, una característica sobresaliente de la ACMP es su capacidad de interacción y regulación por calmodulina. Por esta razón, se ha dedicado un gran esfuerzo en tratar de identificar la secuencia o regiones que participan en la interacción con calmodulina. Por medio de estudios de proteólisis controlada se demostró que el sitio de unión a calmodulina se localiza dentro de un fragmento de 12 kDa, cercano al carboxilo terminal (Zurini y Carafoli, 1984; Benaim y Carafoli, 1984; James y

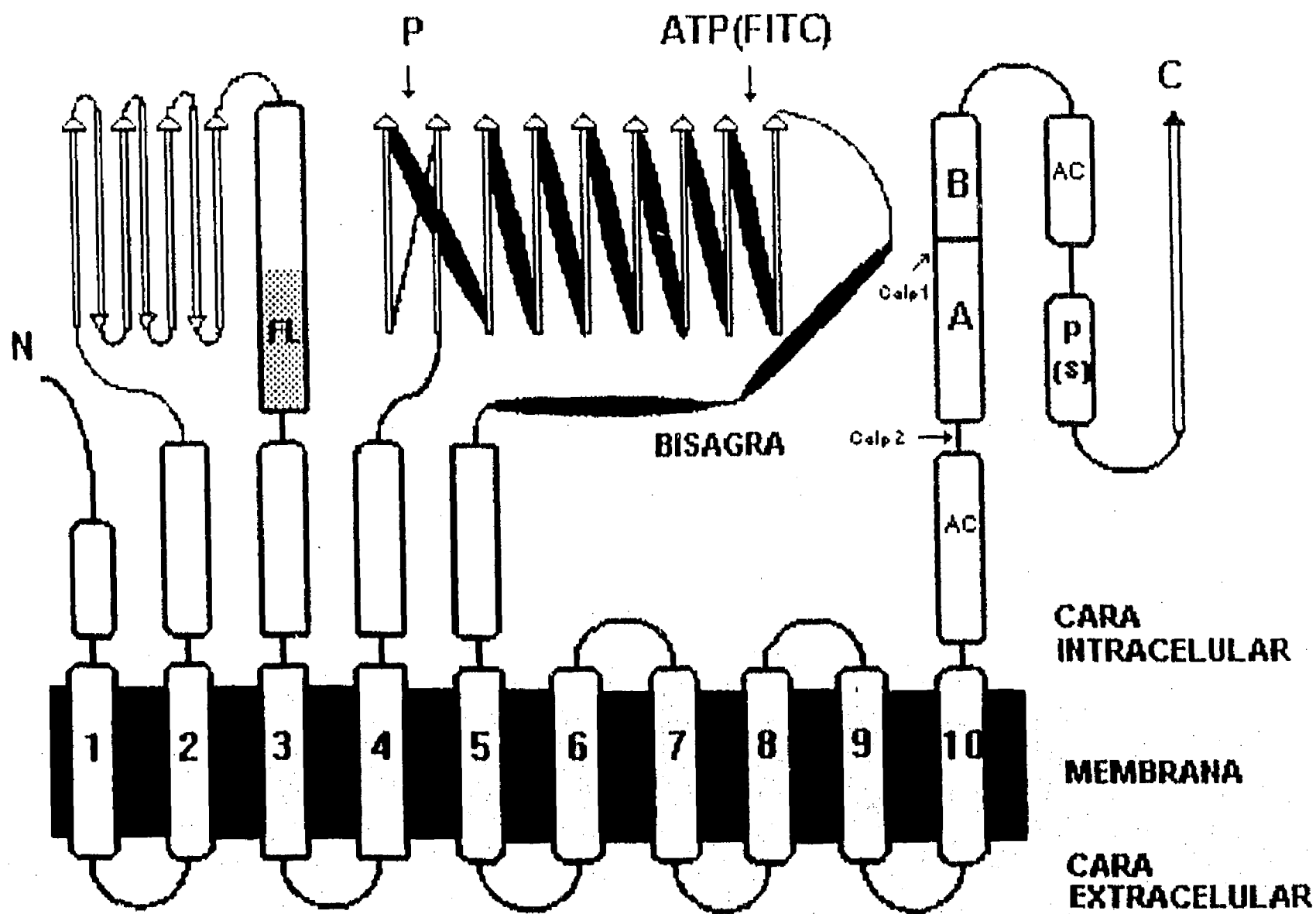


Fig. 4. Modelo topológico de la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática. Los sitios indicados son: sitio de unión a fosfolípidos (FL); sitio de fosforilación (P); sitio de unión a FITC/ATP; dominios A y B de unión a calmodulina; secuencias ricas en aminoácidos ácidos (AC); sitio de fosforilación por proteína cinasa A (PS); sitios de corte por calpaina en ausencia (Calp1) y en presencia de calmodulina (Calp2); 1 a 10, los diez dominios transmembranales; N y C, amino y carboxilo terminales.

col, 1988). Al comparar la secuencia de las ACMP con secuencias de diversas enzimas que son reguladas por calmodulina, se ha identificado la secuencia de unión a calmodulina (Shull y Greeb, 1988; Verma y col, 1988). Esta región se ha dividido en dos subdominios, el subdominio A y el subdominio B, de aproximadamente 15 residuos cada uno (Fig 4).

Empalme alternativo de los mensajeros y la generación de diversas isoformas de la ACMP

Diversos estudios de clonación han permitido la identificación de 4 genes que codifican para la ACMP, sin embargo, el empalme alternativo de los mensajeros de cada uno de estos genes puede generar a su vez una gran diversidad de isoformas (Strehler y col, 1989, Keeton y col, 1993; Adamo y Penniston, 1992, Brandt y col, 1992a, Heim y col, 1992, Stauffer y col, 1993, Tabla I y Fig 4). Esto ha demostrado que la ACMP pertenece a una familia multigénica, y sugiere la posibilidad de que la actividad ATPasa- Ca^{2+} observada en la membrana plasmática puede ser el resultado combinado de los productos de varios de estos genes.

El empalme alternativo de los mensajeros puede ocurrir en cuatro sitios denominados A, B, C y D (Fig 5A), sin embargo, principalmente se ha observado en los sitios A y C. El sitio A se localiza hacia el extremo amino terminal y está próximo al sitio de interacción o regulación por fosfolípidos. Todos los genes, excepto el gen de la ACMP1 presentan empalme alternativo a nivel del sitio A. Para el gen 2 existen tres exones de 33, 60 y 42 pb, que pueden incluirse en el ARNm maduro en varias combinaciones y generar tres posibles variantes denominadas: 2z, 2x y 2w, las cuales tienen inclusiones de 0, 42 y 135 pb respectivamente (Stauffer y col 1993 y Fig 5B). En el humano, el exón de 42 pb se inserta de manera separada, mientras que los exones de 60 y 33 pb se usan o insertan en conjunto con el exón de 42 pb (Fig.5B). En el caso de la rata (en algunos tejidos), los exones de 33 y 60 pb se

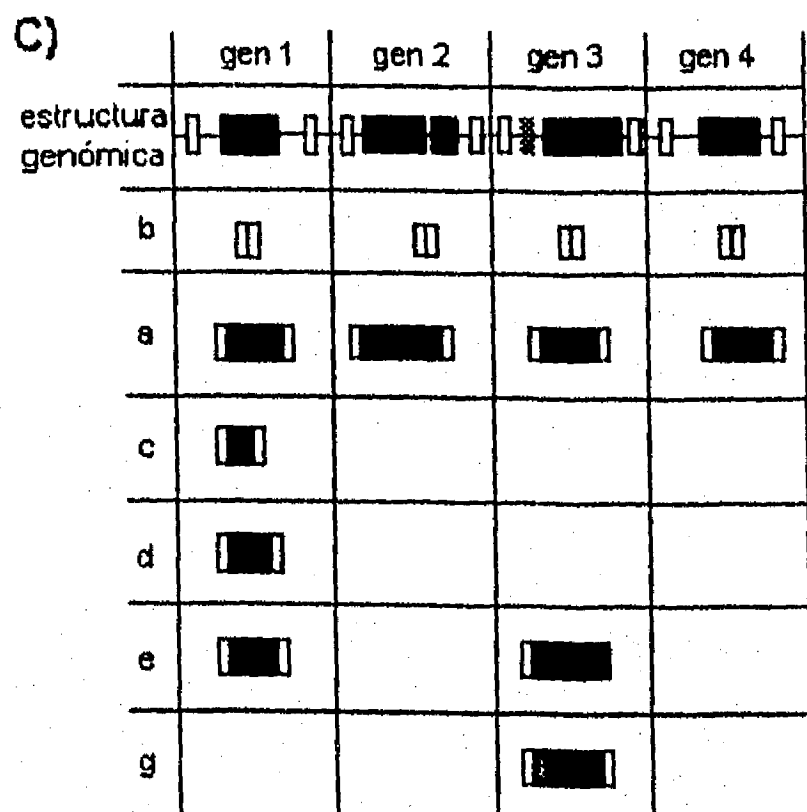
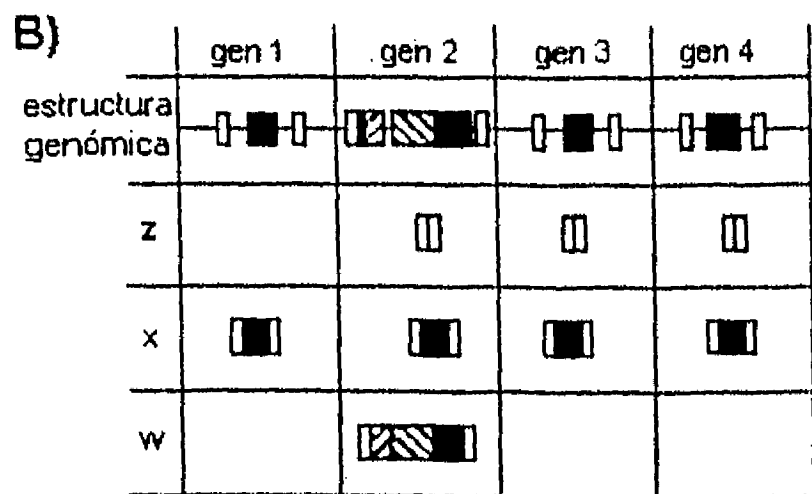
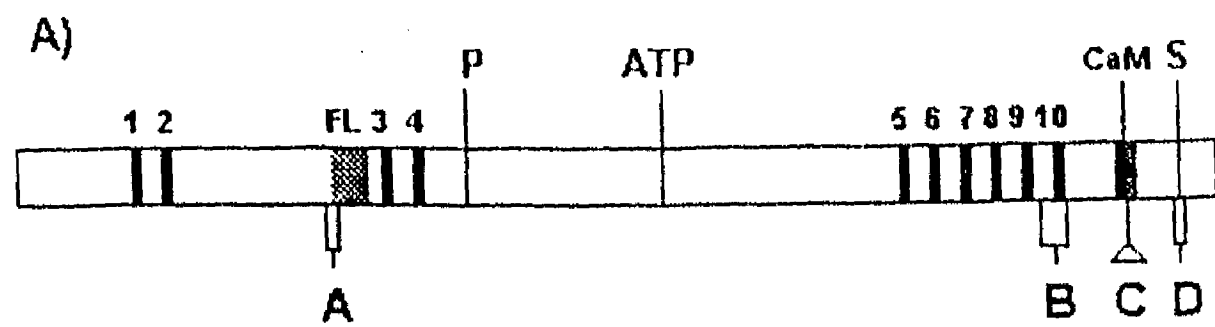


Fig. 5. Empalme alternativo de los mensajeros que codifican para la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática. **A)** Representación esquemática de la secuencia de la ACMP, donde se indican los sitios de corte y empalme alternativo A, B, C y D, los 10 cruces membranales, sitio de fosforilación (P), sitio de unión de FITC/ATP, dominios A y B de unión a calmodulina, región de estimulación por fosfolípidos (FL) y sitio de fosforilación por proteína cinasa A (S). **B)** y **C)** Empalme alternativo para los cuatro genes de la ACMP de humano y generación de las posibles variantes a nivel de sitio A y sitio C respectivamente. Los rectángulos corresponden a exones, las líneas horizontales a intrones y las letras a-e, w-z indican las posibles variantes.

pueden incluir en el ARNm sin el exón de 42 pb, de esta manera se genera una cuarta variante denominada 2y (Adamo y Penniston, 1992). Para el gen 3 de la ACMP, se ha encontrado un exón de 42 pb que puede ser incluido (variante 3x), o excluido del ARNm (variante 3z) (Stauffer y col, 1993; Carafoli y Stauffer, 1994). Para el gen 4 de la ACMP, el empalme alternativo puede generar dos posibles variantes (4z y 4x), por la exclusión o inclusión de un exón de 36 pb (Fig 5B).

El sitio C se localiza en la región carboxilo terminal de la enzima y comprende a uno de los dominios de interacción con calmodulina (Fig 5A). Para el gen 1, el empalme alternativo en este sitio incluye a un exón de 154 pb que presenta tres sitios donadores internos que puede generar un total de 5 variantes denominadas 1a, 1b, 1c, 1d y 1e (Fig 5C). Para el gen 2, existe un exón de 227 pb cuya exclusión o inclusión genera dos posibles variantes, 2b y 2a respectivamente (Fig 5C). Para el caso del gen 3, el empalme es más complejo, incluye 2 exones de 154 y 68 pb que al editarse diferencialmente pueden generar tres variantes (3b, 3a y 3g). La variante 3b no presenta inclusión alguna, la variante 3a incluye el exón de 154 pb, mientras que la variante 3g incluye el exón de 154 y 68 pb. En la rata se ha detectado una variante adicional, debido a que el exón de 154 pb presenta un sitio donador interno (Keeton y col, 1993). En relación al gen 4, en humanos se pueden generar dos posibles variantes (4a y 4b), por la presencia o ausencia de un exón de 154 pb (Stauffer y col, 1993 y Fig 5C). El empalme alternativo a nivel de sitio C, puede dar origen a proteínas con una sensibilidad o respuesta diferente a la calmodulina, así como una región carboxilo terminal diferente.

Las variantes generadas a nivel del sitio B únicamente se han observado de manera aislada para el ARNm del gen 4 (Strehler y col, 1989). El empalme alternativo en este sitio es de gran interés para la topología de la enzima, debido a que no presenta un exón que codifica para el dominio transmembranal 10. De tal manera que la exclusión de este exón daría origen a una proteína carente del cruce membranal número 10. El empalme a nivel

del sitio D incluye una secuencia que constituye el sustrato para una proteína cinasa A, que está ausente en la ACMP1a de rata, así como en la isoforma 4a de eritrocitos de humano (Keeton y col, 1993; Strehler y col, 1990; Stauffer y col, 1993).

Es importante resaltar que el empalme alterno de los mensajeros se da en sitios importantes para la regulación de la actividad de la ATPasa (sitio de interacción con fosfolípidos y sitio de interacción con calmodulina), mientras que las regiones que participan en la catálisis no sufren empalme alterno y el patrón de plegamiento parece estar altamente conservado entre las diversas ATPasas del tipo P (Carafoli, 1992; Strehler, 1991). Sin embargo, el significado funcional de toda esta gran diversidad de isoformas aún no es claro.

Por otro lado, se ha analizado la distribución y expresión de los ARNm provenientes de los cuatro genes de la ACMP en diferentes tejidos. Las isoformas 1b y 4b, se expresan de manera constitutiva en todos los tejidos, tanto en humano, como en la rata; mientras que las isoformas codificadas por los genes 2 y 3, se transcriben en tejidos especializados (músculo y cerebro) (Stauffer y col, 1993; Keeton y col, 1993; Brandt y col, 1992a; y Tabla II).

TABLA II

Distribución de las isoformas de la ACMP en diferentes tejidos

Tejido	PMCA1	PMCA2	PMCA3	PMCA4
Cerebro	1b 1c 1a 1e	2b	3a 3b 3e 3g	4b 4a
Músculo Esquelético	1b 1c	2b 2a	-	4b 4a
Corazón	1b 1c	2b 2a	-	4b 4a
Músculo liso	1b	2b*	-	4b 4a
Otros tejidos**	1b	2b*	-	4b

* Se expresa en niveles sumamente bajos

** hígado, riñón, bazo, testículo.

También se ha estudiado la expresión de los genes de la ACMP durante la diferenciación celular. En estados indiferenciados de la línea celular L6 (mioblastos), la línea celular N9c2(2-1), dos líneas diferentes de fibroblastos (FR y NRK-49F), células de músculo liso y células endoteliales, se detectan únicamente las isoformas 1b y 4b. Al inducir la diferenciación miogénica para conducir a la formación de miotubos de las células L6 y H9c2(2-1), además de las isoformas 1b y 4b, se expresan las variantes 1c, 1d y 4a. Este mismo patrón se observa en las células neuronales PC-12, al ser inducidas a diferenciación por el factor de crecimiento neural (NGF) (Hammes y col, 1994).

Isoformas de la ATPasa-Ca²⁺ de retículo sarco(endo)plásmico (ACRSE)

Para la ACRSE se han identificado 3 genes distintos; ACRSE1, ACRSE2 y ACRSE3. El empalme alternativo de los mensajeros que codifican para esta enzima da origen a 5 isoformas. La ACRSE1 se expresa en músculo esquelético rápido y el empalme alternativo del ARNm puede dar origen a dos isoformas, ACRSE1a y ACRSE1b (Brandl y col, 1986, 1987; Korczak y col, 1988; MacLennan y col, 1985) (Fig 6). La expresión de ACRSE1a se manifiesta después del nacimiento y es la única isoforma de este gen que se expresa en la etapa adulta. La isoforma 1b se expresa en estado fetal y en el neonato (Brandl y col, 1987). El gen 2 puede dar origen a dos isoformas (ACRSE2a y ACRSE2b), también por el empalme alternativo del ARNm en la región 3' (Fig 6). La ACRSE2a se expresa principalmente en músculo cardíaco y en músculo lento; mientras que la isoforma 2b se expresa en músculo liso y tejidos no musculares (Lytton y col, 1988, 1989).

ACRSE3 se expresa en la mayoría de los tejidos, pero principalmente en células endoteliales vasculares (Burk y col, 1989; Anger y col, 1993; Wuytack y col, 1994). Hasta el momento no se han descrito isoformas para este gen.

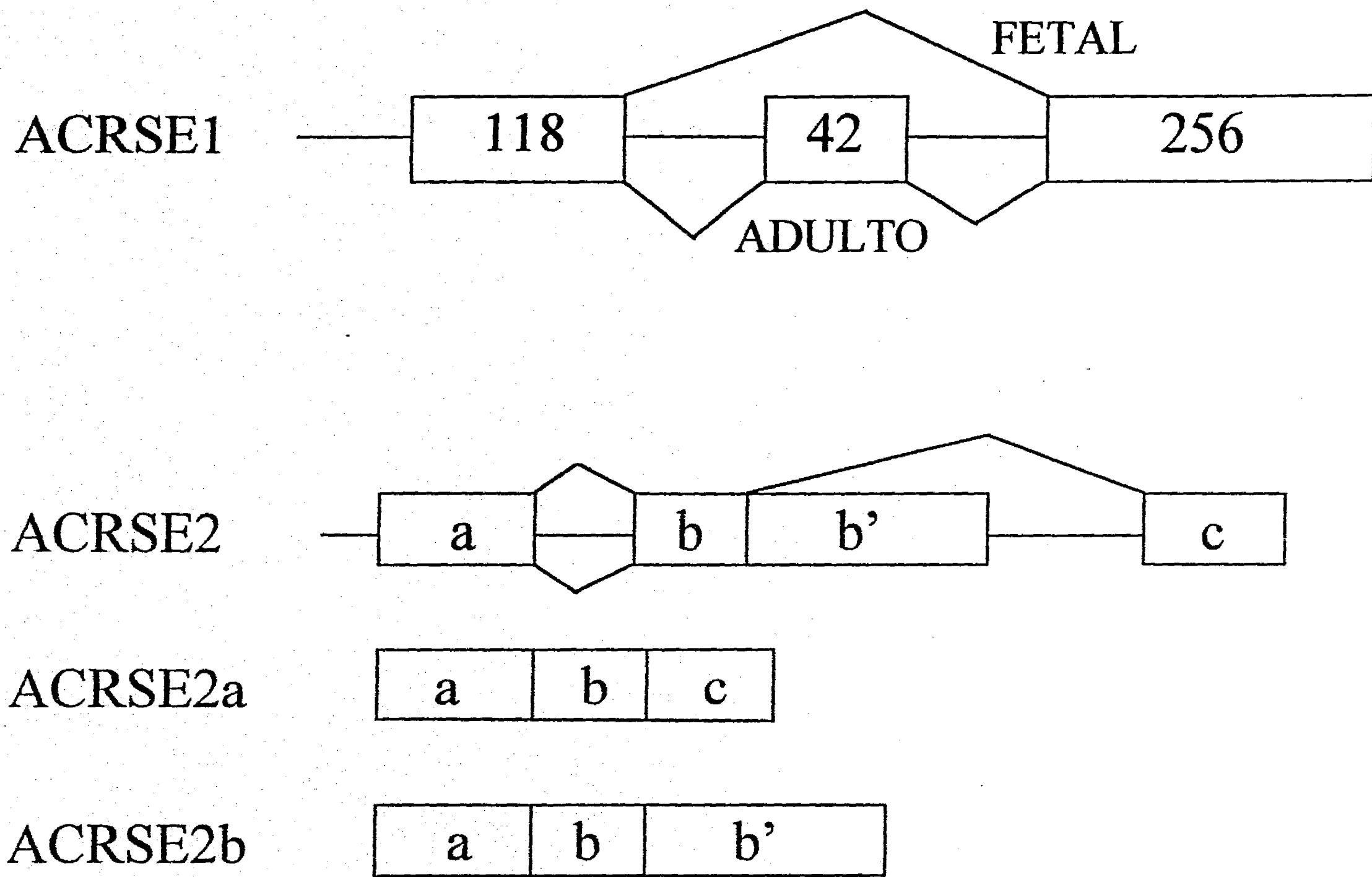


Fig. 6. Patrón del empalme alternativo de los mensajeros provenientes de los genes 1 y 2 de la ATPasa- Ca^{2+} de retículo sarco(endo)plásmico (ACRSE). Los exones se indican en rectángulos, los intrones por líneas horizontales, las líneas diagonales el patrón de empalme de los exones. Los números indican la longitud de los exones y las letras a-c, indican los exones del extremo 3' del ARNm de la ACRSE2.

OBJETIVOS GENERALES

Con base en estos antecedentes, se plantearon dos objetivos principales: 1) La caracterización del papel del colesterol y el Ca^{2+} en la estabilidad de la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática; 2) El aislamiento del ADNc que codifica para la ACMP, así como el estudio de la expresión de los genes que codifican para esta enzima durante el desarrollo fetal del corazón de humano.

Con relación al primer objetivo, estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que los niveles de colesterol en las membranas regulan la actividad de la ACMP. Niveles altos de colesterol en las membranas inhiben la actividad de la enzima, mientras que la extracción de este lípido de las membranas estimula a la enzima (Ortega y Mas-Oliva, 1984, 1986). En un trabajo preliminar encontramos que el colesterol puede conferir estabilidad térmica a la ACMP (Mas-Oliva y Santiago-García, 1990). Por lo tanto, nuestro interés se ha centrado en demostrar el mecanismo(s) por los cuales el colesterol lleva a cabo sus efectos en la actividad y estabilidad de la enzima. En este sentido, se pensó que el análisis térmico podría aportar información para caracterizar el papel del colesterol, en la actividad y estabilidad de la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática, así como la posibilidad de monitorear cambios en la estructura de la enzima, relacionados con la interacción con este lípido. El principio del análisis térmico se basa en la diferente sensibilidad que las proteínas muestran al cambiar las condiciones del medio. De esta manera, pensamos que si el colesterol interacciona con la enzima, o el colesterol produce cambios en las membranas que afecten la estructura de la enzima, entonces la sensibilidad de la enzima a la temperatura en membranas con diferente contenido de colesterol debe ser diferente. Con este mismo enfoque se decidió estudiar el papel del calcio en la estabilidad de esta enzima.

Con relación al segundo objetivo, durante varios años en el laboratorio se ha venido trabajando con la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática. Los trabajos se han enfocado en varios aspectos, como son: la caracterización cinética del efecto de la calmodulina, y su regulación por el Ca^{2+} , Mg^{2+} , metales pesados, lípidos, con especial énfasis en el colesterol. También se ha incursionado en el estudio de esta enzima en células neoplásicas, donde el control del calcio citoplásmico suele estar alterado. Con fundamento en lo anterior, decidimos que aislar y secuenciar el ADNc que codifica para la ACMP, nos permitiría en un futuro expresar esta proteína *in vitro* para llevar a cabo una caracterización cinética y estructural más detallada. También pensamos en la posibilidad a futuro de construir mutantes para determinar las regiones o dominios importantes para la actividad, estructura y estabilidad de esta proteína, tanto en células normales como neoplásicas.

Trabajos previos en la literatura han analizado la expresión de la ACMP en diferentes tejidos de adulto, tanto de rata, como de humano. Sin embargo, no se ha estudiado la expresión de los genes y el empalme alternativo de los mensajeros que codifican para esta enzima durante el desarrollo fetal. Por esta razón, decidimos estudiar la expresión de los genes que codifican para la ACMP durante el desarrollo fetal del corazón de humano. Para ello empleamos muestras de corazón de humano de diferentes etapas de desarrollo y por medio de RT-PCR se analizó la distribución de los mensajeros que codifican para la ACMP, así como la expresión de tres isoformas diferentes de la ACRSE. Se eligió corazón, debido a que en este tejido, los movimientos de calcio juegan un papel fundamental en el proceso de contracción-relajación.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1. Caracterizar el papel del colesterol en la inactivación térmica de la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática**
- 2. Estudiar el papel del colesterol en el proceso de desnaturalización térmica de la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática.**
- 3. Analizar el papel del calcio en la estructura y estabilidad de la ATPasa-Ca²⁺ aislada de sarcolema cardíaco.**
- 4. Aislar y secuenciar el ADNc que codifica para la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plásmica de cardiocitos de humano.**
- 5. Analizar la expresión de los genes que codifican para la ACMP durante el desarrollo fetal del corazón de humano.**
- 6. Analizar la expresión de los genes que codifican para la ATPasa-Ca²⁺ de retículo sarco(endo)plásmico, durante el desarrollo fetal del corazón de humano.**

RESULTADOS

Los resultados se presentan en formato de manuscrito y de una publicación. En primer lugar se presentan los resultados referentes al efecto del colesterol y el calcio en la estabilidad térmica de la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática. De manera breve, los resultados indican que al aumentar el contenido de colesterol en las membranas microsomales, la estabilidad de la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ es mayor. El colesterol propicia que la inactivación y la desnaturalización de la enzima se alcancen a temperaturas más altas. Experimentos realizados con la ATPasa- Ca^{2+} asilada de la membrana plasmática, muestran que extracción de esta enzima de la membrana provoca una alta sensibilidad de la enzima por la temperatura. En la enzima aislada, el colesterol también provoca una disminución en las velocidades de inactivación. Sin embargo, un factor importante para la estabilidad de la enzima aislada resultó ser el calcio. La unión de este catión a la enzima induce cambios en su estructura, reflejados en una mayor estabilidad de la enzima a la temperatura. Los resultados obtenidos de estos experimentos nos permitieron elaborar dos manuscritos, titulados:

- 1. Cholesterol increases the thermal stability of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase of cardiac microsomes** (aceptado para su publicación en la revista *Biochimica et Biophysica Acta*)
- 2. Thermal analysis of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. Calcium and cholesterol effects** (manuscrito en fase final de preparación).

Por otra parte, los resultados obtenidos en la caracterización molecular de la ACMP señalan que las variantes 1b y 4b se expresan en todos los estados de desarrollo del corazón, también se expresan en la

placenta. Las variantes 1c, 4a y 4d se detectan a partir de las 12 semanas de desarrollo fetal del corazón y su nivel de expresión va en aumento a medida que progresa el desarrollo. Por su parte, las variantes 2a y 2b se detectaron únicamente en muestras de corazón de adulto. El resultado más novedoso del presente trabajo consiste en la descripción de una nueva isoforma (4d), que se genera por el empalme alterno del mensajero proveniente del gen 4. Por otro lado, se encontró que tres isoformas de ACRSE (ACRSE2a, ACRSE2b y ACRSE3) se expresan desde estados muy tempranos del desarrollo del corazón y sus niveles de expresión se mantienen constantes a lo largo del desarrollo. En conjunto estos resultados dieron origen a una publicación, titulada:

Analysis of mRNA expression and cloning of a novel plasma membrane Ca^{2+} -ATPase splice variant in human heart (publicado en la revista *Molecular and Cellular Biochemistry* 155: 173-182, 1996)

Por último se presentan a manera de anexo, la secuencia parcial de nucleótidos de las isoformas 1 y 4 de la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática, deducida a partir de las clonas aisladas de la biblioteca de corazón fetal de humano. También se presenta como anexo un trabajo de revisión realizado durante mi programa de doctorado, titulado:

Avances y perspectivas en la caracterización molecular de la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática (publicado en el *Boletín de Educación Bioquímica* 14(3): 96-102, 1995).

Los resultados se discutirán en conjunto en la sección de discusión de esta tesis.

CHOLESTEROL INCREASES THE THERMAL STABILITY OF THE $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase
OF CARDIAC MICROSOMES†

Alicia Ortega^{§†}, Juan Santiago-García^{||}, Jaime Mas-Oliva^{||}
and James R. Lepock[§]

[§]Departments of Biology and Physics, University of Waterloo, Ontario N2L 3G1, Canada and

^{||}Departamento de Bioenergetica, Instituto de Fisiologia Celular, UNAM. Apartado Postal 70-600, 04510 México, D.F. MEXICO

Key words: Membrane protein thermostability and cholesterol.

†Partial financial support was obtained from DGAPA, National University of Mexico (Grant IN-209492), CONACYT (Grant ICSAXNA1872) and USPHS Grant CA40251 Awarded by the National Cancer Institute

‡Present address:

Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autonoma de México, UNAM, A.P. 70-159, México, 04510, D.F. MEXICO

Abbreviations: ADP, adenosine diphosphate; ATP, adenosine triphosphate; ATPase, adenosine triphosphatase; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; EGTA, ethyleneglycol-bis (β -amino-ethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid; HEPES, (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid); MOPS (3-[N-morpholino]propanesulfonic acid); NADH, nicotinamide adenine dinucleotide (reduced form); DSC, differential scanning calorimetry; E_A , activation energy; T_i , inactivation temperature; T_m , transition temperature; Tris, tris[hydroxymethyl]aminomethane.

ABSTRACT

The effect of membrane cholesterol on the thermal inactivation of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity from bovine cardiac microsomes was measured and compared to the thermal denaturation profiles of the microsomes as measured by differential scanning calorimetry (DSC). Inactivation, defined as loss of activity, and denaturation, defined as conformational unfolding, were irreversible under the conditions used. Both, thermal inactivation of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity and thermal denaturation were shifted to higher temperatures in microsomes enriched with cholesterol ($37 \pm 5 \mu\text{g}$ cholesterol/mg protein, $n = 10$) compared to control microsomes ($15 \pm 3 \mu\text{g}$ cholesterol/mg protein, $n = 10$). Thermal inactivation was measured by two methods: first, measuring activity at room temperature as a function of heating to elevated temperatures at $1^\circ\text{C}/\text{min}$, where inactivation temperatures (T_i , temperature of half activity) were $58.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$ for control membranes and $59.9 \pm 0.1^\circ\text{C}$ for cholesterol enriched membranes, respectively. Second, measuring ATPase activity as a function of time at constant temperature, where $T_{1/2}$ of $57.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $59.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$ were determined for control and cholesterol enriched membranes, respectively. DSC profiles of microsomal membranes consisting of a number of overlapping peaks were obtained. A well resolved transition was observed with a peak transition temperature (T_m) near 60°C . This T_m , which is a measure of conformational stability, correlates with the T_i for $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity and is $2.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$ higher in cholesterol enriched membranes. Thus, the increased resistance to inactivation appears to be due to increased conformational stability of the protein induced by cholesterol, demonstrating that a small change in lipid composition can influence the stability of an integral membrane protein in a natural membrane.

Most cholesterol in mammalian cells resides in the plasma membrane, where cholesterol is believed to be a functionally critical component. Because a high concentration of cholesterol in the blood has been correlated with the physiopathology of cardiovascular diseases in humans, the effect of cholesterol on biological activities regulated by membrane proteins has been the subject of study in many different systems (Yeagle 1988, 1990). The properties and effects of cholesterol on the physical behavior of membrane lipids has been extensively documented (Cullis et al, 1978; Estep et al, 1978, 1979; Mabrey et al, 1978; Presti, 1985). Among other effects on membranes, cholesterol decreases the enthalpy of transition between the gel and liquid crystalline phases (Cullis et al, 1978; Estep, et al, 1978, 1979; Mabrey et al, 1978; Presti, 1985), increases the orientational order of the acyl chains of fatty acids (Yeagle, 1985, 1988, 1990; Presti, 1985), and changes membrane thickness (McIntosh, 1978). Bloom and Mouritsen (1988) proposed that integral membrane proteins operate in an optimal manner in membranes whose natural hydrophobic thickness matches the hydrophobic thickness of the protein. Hence, cholesterol may be required at a higher concentration in some membrane systems which naturally accumulate cholesterol, such as the t-tubule membrane of skeletal muscle where cholesterol/phospholipid ratios of 0.5 (Roseblatt et al, 1981) to 0.9 (Sabbadini & Dhams, 1989) have been measured. Also, the plasma membranes of some neoplastic cells are known to have an altered cholesterol content (Shinitzky, 1984) that might be associated with changes in membrane function.

In the present work, we used thermal analysis and differential scanning calorimetry (DSC) to determine the influence of varying concentrations of cholesterol on the thermal stability of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase in cardiac microsomes as a measure of lipid-protein interactions.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

ADP, ATP, cholesterol, DTT, EDTA, EGTA, HEPES, L-malic acid, MOPS, NADH and Tris were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). All other chemicals were analytical grade.

Cardiac Microsome Isolation

Cardiac microsomes were isolated from bovine heart. The heart was cleaned of connective tissue and the ventricles minced. The minced tissue was homogenized in 5 volumes of 10 mM sodium bicarbonate, 0.5 mM sodium azide (pH 7.0) with an Ultraturrax for 5 cycles of 5 sec each. The homogenate was filtered through four layers of gauze and centrifuged at 8700 x g for 30 min. The pellet was rehomogenized and the above steps were repeated twice. The supernatants obtained were collected and centrifuged at 22000 x g for 60 min. The resulting pellet was resuspended and homogenized in 5 vol of 20 mM Tris-Malate, 0.6 M KCl (pH 6.8) and centrifuged at 33000 x g for 60 min. The pellet was then resuspended in 10 mM HEPES-KOH EDTA (pH 7.4), stirred for 10 min at 4°C, and centrifuged at 50000 x g for 30 min. The final pellet was saved and resuspended in 50 mM Tris-Malate, 0.5 mM MgCl₂, 0.05 mM CaCl₂, 2 mM DTT (pH 7.4). The resuspended membranes were rapidly frozen and stored in liquid nitrogen. This membrane fraction is enriched in Ca²⁺/Mg²⁺ ATPase activity.

Cholesterol Enrichment of Cardiac Microsomes

Changes in the concentration of cholesterol in cardiac microsomes were achieved by incubating the membranes in a plasma medium where cholesterol exchange between plasma lipoproteins and biological membranes occurs. The procedure has been previously described for

incorporation and depletion of cholesterol in cardiac sarcolemma (Ortega and Mas-Oliva, 1984). Briefly, approximately 10 ml of blood were centrifuged, and the resulting blood plasma heated for 30 min at 56°C. The inactivated plasma was diluted 1:10 in 10 mM NaH₂PO₄ (pH 7.1) and further diluted 10:1 with 10 ml of NaH₂PO₄ containing 30 mg of cholesterol previously dissolved in 1 ml of 2% DMSO. Plasma without cholesterol was prepared by the above procedure for use as a control. The cardiac microsomes were incubated with the plasma media for 5 hours at 25°C, followed by three washes with a solution containing 50 mM Tris-Malate, 0.5 mM MgCl₂, 0.05 mM CaCl₂ and 2 mM DTT (pH 7.4). The microsomes were finally resuspended in 20 mM MOPS, 0.1 M KCl (pH 7.0).

Determination of Cholesterol

The cholesterol concentration of cardiac microsomes was determined by a colorimetric method provided by Biochemical Analysis (Boehringer Mannheim). For the cholesterol determination, 0.20 mg of isolated membranes were used. The method is based on the oxidation of cholesterol to cholestenone by a cholesterol oxidase. In the presence of catalase, the hydrogen peroxide produced in this reaction oxidizes methanol to formaldehyde. The later reacts with acetyl acetone forming a yellow lutidine dye in the presence of NH₄⁺ that absorbs at 405 nm.

Thermal Inactivation

Thermal inactivation was determined by two methods. Isolated cardiac microsomes at 1.5-2 mg/ml were heated in 20 mM MOPS, 0.1 M KCl (pH 7.0) in a water bath. The temperature of the bath was increased so that the temperature of the microsome suspension

increased at a heating rate of 1°C/min. Samples were removed at time intervals of one minute from 30°C to 70°C and placed on ice. The Ca²⁺/Mg²⁺ ATPase activity was then determined at room temperature. An inactivation curve was generated by plotting enzymatic activity as a fraction of control activity (no heating) vs temperature. The inactivation temperature (T_i) is defined as the temperature of half inactivation. The first derivative of the inactivation curve was calculated and compared to the excess specific heat profiles of cardiac microsomes obtained by DSC. For all inactivation experiments, the derivative of the inactivation curves was not symmetrical; therefore, T_i does not correspond to the peak temperature but to the temperature of half inactivation.

Inactivation was also determined by measuring activity as a function of time at constant temperature from 52 to 60°C. The rate constants for inactivation were determined from plots of ln activity vs time, and Arrhenius plots were constructed from which the activation energy (E_A) and intercept (A) were calculated. Fractional inactivation or denaturation (f_D) as a function of temperature increased at 1°C/min. was calculated using

$$f_D [T(t)] = 1 - \exp \left\{ \frac{-RT_c^2}{E_A v} \exp \left[\frac{E_a}{RT_c^2} (T - T_c) \right] \right\}$$

where T_c (determined from E_A and A) is the temperature at which k = 1, E_A the activation energy, and v the scan rate (Lepock et al., 1990). The derivative of f_D as a function of temperature (df_D/dT) is proportional to the excess C_p, if inactivation is due to conformational unfolding, which is also proportional to the temperature derivative of activity. This equation is based on the assumptions that denaturation and inactivation can be approximated by a two

state reaction of the form $N \xrightarrow{k} D$ obeying pseudo first order kinetics where the temperature dependence of the rate constant k is given by the Arrhenius relation. These assumptions have been shown to hold for the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase of sarcoplasmic reticulum (Lepock et al, 1990). The best fits of the curves of the derivative of activity as a function of temperature using the above equation were obtained employing a recursive minimization routine (Lepock et al, 1990).

Differential Scanning Calorimetry

Calorimetric experiments were performed with a high resolution Microcal MC2 differential scanning calorimeter (DSC) interfaced to a DEC 380 computer with an automatic data collection system as previously described (Lepock et al, 1990). For DSC experiments, cardiac membranes were suspended in the same solution used for thermal inactivation. An initial DSC scan of cardiac membranes (10 mg/ml protein) was obtained at a scan rate of $1^\circ\text{C}/\text{min}$ from 10 to 100°C . The sample was immediately cooled to 10°C followed by a rescan to 100°C . Denaturation was completely irreversible after scanning to 100°C . Scans were also made to 49, 56, 63, and 70°C to check for partial reversibility. The intrinsic baseline curvature was corrected by subtracting the rescan, and the shift in specific heat on denaturation (ΔC_p) was corrected as previously described (Lepock et al., 1990). The transition temperature (T_m) of each peak is defined as the temperature at which C_p reaches a maximum.

ATPase activity measurements

ATPase activity at 25°C was determined by an enzyme-coupled assay essentially as described by McClure (1969). This assay follows the formation of ADP by observing the change in absorbance at 340 nm as NADH is oxidized by the coupled system. The reaction

medium contained 0.1 M KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , 0.1 mM CaCl_2 or 1 mM EGTA, 0.3 mM NADH, 0.33 mM ATP, 8 units/ml lactic dehydrogenase, 10 units/ml pyruvate kinase, 1.5 mM phosphoenol pyruvate and 1 mM ouabain, pH 7.0. The Ca^{2+} -independent Mg^{2+} ATPase activity was measured in the presence of EGTA.

Protein concentration was determined by the method of Lowry et al. (1951).

RESULTS

Thermal Inactivation of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase from Cardiac Membranes

Using the in vitro incorporation procedure, the cholesterol concentration of microsomal membranes was increased from $15 \pm 3 \mu\text{g}$ ($n = 10$) for control membranes to $37 \pm 5 \mu\text{g}$ ($n = 10$) cholesterol/mg protein for enriched membranes which correspond to cholesterol/phospholipid molar ratios of 0.12 and 0.31, respectively. The thermal stability of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase of microsomal membranes with these two cholesterol concentrations was determined by thermal inactivation and thermal denaturation.

For thermal inactivation utilizing the first method, the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity in control membranes (C) and membranes enriched (E) with cholesterol was measured at room temperature after heating, as a function of temperature increased at a rate of 1°C min . These results are presented in Figure 1A. Activity is lost in membranes following heating to temperatures of $55\text{-}60^\circ\text{C}$. To better calculate the inactivation temperature (T_i), the first derivative of Figure 1A was calculated and fit with the best theoretical curve as shown in Figure 1B. The theoretical fits for irreversible inactivation were calculated assuming the presence of one component. The first derivative curves for two state inactivation ($N \xrightarrow{k} D$) are skewed

towards the low temperature side (Lepock et al., 1992). The experimental curves in Fig. 1B are of this form and are fit well by the theoretical curves. This supports the use of the two state model for inactivation given above. The activation energy for the rate constant k is obtained directly from the fit. Control membranes have a T_1 of $58.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$ and an $E_A = 374$ kJ/mol. In contrast, membranes enriched in cholesterol have a T_1 of $59.9 \pm 0.1^\circ\text{C}$ and $E_A = 382$ kJ/mol. These results are the average of 8 experiments. A 1°C difference in T_1 appears small, but it corresponds to a two fold difference in the rate of inactivation following heating to 60°C .

For the second method of measuring inactivation and determining T_1 , the thermal inactivation rates were obtained from plots of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity at constant temperature as a function of time of incubation. Figures 2A and 2B show inactivation curves of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity from control and cholesterol enriched membranes. The activity decays exponentially with time, demonstrating pseudo first order kinetics. At any temperature, inactivation is faster for the control membranes than cholesterol enriched membranes. Arrhenius plots of the rate constants for inactivation are linear (Fig. 3). Linear regression analysis was used to obtain the activation energy (E_A), corresponding to the slope of the curve, and the frequency factor (A), corresponding to the intercept.

The E_A for control membranes (lower cholesterol content) is 298 ± 10 kJ/mole and 339 ± 28 kJ/mole for cholesterol enriched membranes. These values are in the same range as those obtained directly from the fits of inactivation; however, they should be more accurate because of the greater amount of data obtained during inactivation at constant temperatures and because mathematical transformation is not required.

The rates of inactivation as a function of time at constant temperature were used to simulate inactivation as temperature is scanned upward at a constant rate, which allows a direct comparison with the results from method one (Fig. 1B) and the DSC scans (Fig. 5). Thus, the experiments shown in Figs. 1 and 2 are equivalent ways of obtaining the same information. E_A and A , obtained from Fig. 3, and the scan rate were used to calculate fractional inactivation as a function of time ($f_D [T(t)]$) using the equation given in the Materials and Methods. The first derivative, which is equivalent to the curve shown in Fig. 1B, was calculated. These results are shown in Fig. 4. Control membranes had a T_i of $57.6 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and cholesterol enriched membranes had a T_i of $59.2 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (average of eight experiments).

These results are similar to those obtained from the direct measurements of activity as a function of temperature. The inactivation temperatures T_i are about a degree lower than those obtained from Fig. 1, but the increase in T_i for cholesterol enriched membranes of 1.6°C is similar to that obtained by method 1 (1.0°C).

Thermal Denaturation of Cardiac Microsomal Membranes

Two questions arising from these results are whether thermal inactivation of ATPase activity is due to denaturation of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase as is true for the Ca^{2+} ATPase from sarcoplasmic reticulum (Lepock et al., 1990), and if increased thermal stability in cholesterol enriched membranes is due to increased conformational stability of the enzyme. These questions can be answered from DSC scans of cardiac microsomes if the peak for the denaturation of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase is resolvable in the DSC profile of denaturation of all membrane proteins and corresponds to the predicted peak for inactivation.

To investigate if the T_1 values obtained for the thermal inactivation of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity corresponds to the thermal denaturation of a specific membrane component in cardiac microsomes with low and high cholesterol content, DSC profiles were obtained from control and cholesterol enriched microsomes. The experimental profiles for control and cholesterol enriched membranes are shown in Fig. 5. Both profiles have similar shape and consist of at least two strong peaks with peak transition temperatures (T_m) of about 54 and 60-62°C. In addition, in most but not all scans a much weaker peak at 75-85°C and a partially resolved peak between 40 and 50°C are present. These complex profiles must be the sum of the individual profiles of all membrane transitions.

In order for a direct comparison between conformational denaturation measured by DSC and inactivation, denaturation must be highly irreversible and obey the irreversible model $N \xrightarrow{k} D$. Partial scans to 49, 56, 63, and 70°C for both control and cholesterol demonstrate complete irreversibility of the proteins denaturing below these temperatures, supporting the use of the irreversible model for denaturation and validating a direct comparison between inactivation and denaturation. A sample of cholesterol enriched microsomes was heated to 49°C, cooled and further heated to 56°C, 63°C, and 70°C with intermediate cooling cycles (Fig 6). After heating to these temperatures, the beginning of each subsequent curve is shifted to approximately the maximum temperature of the previous heating. This indicates that denaturation is highly irreversible after heating to these moderate temperatures.

The transition temperature of the peak with $T_m \sim 60-62^\circ\text{C}$ appears to correspond to the T_1 's of inactivation. However, the T_1 's given above are the temperatures of half inactivation.

The T_m 's that can be determined directly from DSC profiles are the peak transition temperatures. The transition profiles are not symmetrical for irreversible denaturation, thus, T_i and T_m will not be the same. The peak T_i 's from Fig. 1B are 58.9 and 59.9°C for control and cholesterol enriched microsomes, respectively, and those from Fig. 4 are 58.3 and 59.7°C, respectively. The average T_m 's from several DSC scans of microsomes are $59.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$ ($n = 6$) and $61.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$ ($n = 4$) for control and enriched microsomes, respectively. The ΔT_i 's are 1.0 and 1.4°C from the two different methods of measuring inactivation while the ΔT_m is $2.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$. This shift in T_m is statistically significant ($p < 0.01$ by an unpaired t-test). The value of ΔT_m is greater than ΔT_i by about 1°C and the values of T_m are 0.5 to 2°C greater than the values of T_i depending on which set of T_i values are used. However, considering that different thermometry was used for DSC and inactivation, the values of T_i and T_m correspond closely enough to conclude that the thermal inactivation of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase is due to the irreversible denaturation of a protein with corresponding values of T_m and T_i .

DISCUSSION

The effect of cholesterol on the activity and thermal stability of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase of cardiac membranes was determined primarily to study the influence of cholesterol on a protein in a natural, isolated membrane. We selected this system for the following reasons: i) The activity of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase in cardiac microsomes can be easily separated from the interference of any other Mg^{2+} dependent ATPases, such as Na^+/K^+ ATPases or the Ca^{2+} stimulated Mg^{2+} ATPase. ii) $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity in cardiac microsomes is comparable to the Mg^{2+} ATPase activity observed in purified t-tubule membranes from skeletal muscle in which the cholesterol concentration is naturally high, presumably necessary for proper membrane

function (Roseblatt et al, 1981). iii) The concentration of cholesterol in cardiac microsomes is lower than t-tubule membranes. Depletion of cholesterol of cardiac microsomes can not be completely achieved, but cholesterol can be incorporated to levels found in t-tubules. iv) The effect of cholesterol concentration on the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity has been determined (Ortega and Mas-Oliva, 1984). Cholesterol inhibits the ATPase activity of the Ca^{2+} stimulated Mg^{2+} ATPase of cardiac sarcolemma while stabilizing against thermal inactivation (Ortega and Mas-Oliva, 1984; Ortega and Mas-Oliva, 1986; Mas-Oliva and Santiago-Garcia, 1990).

As shown in this study, a high concentration of cholesterol in cardiac microsomes reduces the rate of thermal inactivation of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase. Membrane cholesterol also increases the thermal stability of the ATP hydrolytic function of other membrane ATPases including the Ca^{2+} ATPase of sarcoplasmic reticulum (Cheng et al., 1987) and cardiac sarcolemma (Mas-Oliva and Santiago-Garcia, 1990) and other membrane proteins (Artigues et al., 1989; Rotenberg and Zakim, 1991). The ATPase hydrolytic function is located in a protein domain outside the membrane core in a hydrophilic environment (MacLennan et al., 1985; Serrano, 1988) while cholesterol is present in the lipid bilayer which contacts only the transmembrane region. Since ATPase activity is affected by cholesterol (Cheng et al., 1986; Ortega and Mas-Oliva, 1986; Warren et al., 1975; George and McElhaney, 1992; Yeagle, 1985, 1988, 1990), this must occur through the influence of cholesterol on the transmembrane region of the protein.

Inactivation must result from an irreversible alteration of the protein. The simplest model for inactivation is $N \xrightarrow{k} D$ where N and D are the native and inactive forms, respectively, and k is the temperature dependent rate constant for this first order process. If the conformational

unfolding of the protein is to be considered explicitly, then this model must be extended to

$N \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} U \xrightarrow{k_3} D$ where U is the thermally unfolded state and the k_i 's the rate constants for the

various steps if the native state is the lowest energy state. Inactivation is then due to a step subsequent to unfolding. Since unfolding must precede inactivation, decreased inactivation can occur because of increased conformational stability (i.e. an increase in the T_m of unfolding) or a decrease in the rate constant of inactivation k_3 .

The DSC scans of control and cholesterol enriched membranes have a peak at the temperature predicted from inactivation ($T_m \sim 60^\circ\text{C}$) which is shifted $2.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$ higher in the cholesterol enriched membranes. This is somewhat larger than the $1.0 - 1.4^\circ\text{C}$ shift predicted from inactivation; however, the shift is highly significant and indicates that the increased conformational stability of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase is sufficient to account for the increased resistance to inactivation.

What is the mechanism by which cholesterol increases the conformational stability of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase? Cholesterol (43 mole %) has been shown to increase the T_m of the erythrocyte band 3 protein in reconstituted dioleoylphosphatidylcholine vesicles by 6°C (Maneri and Low, 1988). In addition, stability increased as the chain length of the lipid bilayer increased. The T_m of the band three protein increased from 47 to 65°C as the fatty acyl chain length of monounsaturated, symmetric phosphatidylcholines increased from 14 to 24. Since cholesterol is known to increase the thickness of the lipid bilayer (McIntosh, 1978), this led to the suggestion that cholesterol might stabilize by a similar mechanism (Maneri and Low, 1988).

Of relevance is the observation that the activity of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum, the Na^+ , K^+ -ATPase, and the erythrocyte glucose transporter displays a strong chain length dependence (Carruthers and Melchior, 1986; Johannsson et al., 1981a; Johannsson et al., 1981b). Chain lengths shorter or longer than 18 carbons produce a decrease in ATPase activity. Thus, an attractive hypothesis, which is suggested by the very strong dependence of the T_m of the band 3 protein on acyl chain length, is that the increased stability of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase in cholesterol enriched cardiac microsomes is due to an increase in bilayer thickness.

Another mechanism of stabilization follows from the effect of cholesterol on the order and packing characteristics of unsaturated bilayer lipids. Any conformational change in an intrinsic membrane protein, of which denaturation is an extreme example, requires a compensatory reorganization of the lipid bilayer. The fractional volume (f_v), which is a bulk lipid bilayer parameter related to the acyl chain packing free volume, characterizes the volume available for membrane conformational changes that occur with a positive volume change (Straume and Litman, 1988). The equilibrium constant for the interconversion of metarhodopin I and metarhodopsin II is proportional to f_v (Mitchell et al., 1990). A greater degree of lipid acyl saturation, lower temperature, and cholesterol decrease f_v and reduce the likelihood of membrane protein conformational changes (Litman et al., 1991). By similar reasoning, a decrease in f_v caused by increased cholesterol should decrease the probability of denaturation with a resulting increase in T_m . Supporting this hypothesis is the observation that T_m for the band 3 protein was 7°C lower in dilinolenylphosphatidylcholine (three double bonds, larger f_v) vesicles compared to dioleoylphosphatidylcholine (one double bond, smaller f_v) vesicles (Maneri and Low, 1988). Both bilayer thickness and decreased f_v could contribute independently to

the cholesterol-modulated stability.

There are other potential mechanisms of stabilization. The presence of cholesterol in model membranes reduces the hydration and penetration of water into the lipid bilayer (Simon et al, 1982). Studies performed with membrane proteins in reverse micelle systems show that a decrease in water content renders these enzymes more stable to thermal inactivation (Ayala et al., 1986; Garza-Ramos et al, 1989). Studies performed with the acetylcholine receptor reconstituted in lipid vesicles and erythrocyte membrane proteins showed that increases in the cholesterol content of the membranes caused an increase in the α -helix content of the acetylcholine receptor and erythrocyte membrane proteins (Fong and McNamee, 1988; Rooney et al., 1984). Fong & McNamee (1988) suggested that cholesterol stabilizes the structure of the acetylcholine receptor through a change in conformation and is important for the proper function of this receptor. In addition to these potential mechanisms of stabilization, direct binding of cholesterol to the native form of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase would result in conformational stabilization.

ACKNOWLEDGEMENT

The secretarial assistance of Mrs. M.E. Gutiérrez is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Artigues, A., Villar, M.T., Fernandez, J., Farragut, J.A. and Gonzalez-Ros, J.M. (1989).
Biochim. Biophys. Acta, 985, 325-330.
- Ayala, G., Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A., and Darzon, A. (1986) FEBS Lett.
203, 41-43.
- Bloom, M. and Mourtisen, O.G. (1988) Canadian J. Chem. 66; 706-712.
- Carruthers, A. and Melchior, D.L. (1986) Trends Biochem. Sci. 11, 331-335.
- Cheng, K.H., Lepock, J.R., Hui, S.W. and Yeagle, P.L. (1986) J. Biol. Chem. 261, 5081-
5087.
- Cheng, K-H., Hui, S.W. and Lepock, J.R. (1987) Cancer Res. 47, 1255-1261.
- Cullis, P.R., Van Dijck, P.W.M., De Kruijff, B. and De Gier, J. (1978) Biochim. Biophys.
Acta 513, 21-30.
- Estep, T.N., Mountcastle, D.B., Biltonen, P.L., and Thompson, T.E. (1978) Biochemistry 17,
1984-1989.
- Estep, T.N., Mountcastle, D.B., Barenholz, Y., Biltonen, R.L. and Thompson, T.E. (1979)
Biochemistry 18, 2112-2117.
- Fong, T.M. and McNamee, M.G. (1987) Biochemistry 26, 3871-3880.
- Garza-Ramos, G., Darzon, A., Tuena de Gomez-Puyou, M., and Gomez-Puyou, A. (1989)
Biochemistry 28, 3177-3182.
- George, R. and McElhaney, R.N. (1992) Biochim. Biophys. Acta 1107, 111-118.
- Johannsson, A., Keightley, C.A., Smith, G.A., Richards, C.D., Hesketh, T.R. and Metcalfe,
J.C. (1981a) J. Biol. Chem. 256, 1643-1650.

- Johannsson, A., Smith, G.A. and Metcalfe, J.C. (1981b) *Biochim. Biophys. Acta* 641, 416-421.
- Lepock, J.R., Rodahl, A.M., Zhang, C., Heynen, M.L., Waters, B., and Cheng, K-H. (1990) *Biochemistry* 29, 681-689.
- Lepock, J.R., Ritchie, K.P., Kolios, M.C., Rodahl, A.M., Heinz, K.A., and Kruuv, J. (1992) *Biochemistry* 31, 12706-12712.
- Litman, B.J., Lewis, E.N., and Levin, I.W. (1991) *Biochemistry* 30, 313-319.
- Mabrey, S., Mateo, P.L., and Sturtevant, J.M. (1978) *Biochemistry* 17, 2461-2468.
- MacLennan, D.H., Bandl, C.J., Korzcak, B., and Green, N.M. (1985) *Nature* 316, 696-700.
- Maneri, L.R. and Low, P.S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16170-16178.
- Mas-Oliva, J., and Santiago-Garcia, J. (1990) *Biochem. Int.* 21, 233-241.
- McClure, W.R. (1969) *Biochemistry* 8, 2782-2786.
- McIntosh, T.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 513, 43-58.
- McNamee, M.G., and Fong, T.M. (1988) in *Lipid Domains and the Relationship to Membrane Function Vol. 2* (Aloia, R.C., Curtain, C.C., and Gordon, L.M. Ed.) pp 43-62, Alan Liss, New York.
- Mitchell, D.C., Straume, M., Miller, J.L., and Litman, B.J. (1990) *Biochemistry* 29, 9143-9149.
- Ortega, A. and Mas-Oliva, J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 773, 231-236.
- Ortega, A. and Mas-Oliva, J. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 868-874.
- Presti, F.T. (1985) in *Membrane Fluidity in Biology, Vol. 4* (Aloia, R.C. and Boggs, J.M. Ed.) pp 97-146, Academic Press, Orlando FL.
- Rooney, M.W., Lange, Y., and Kauffman, J.W. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 8281-8285.

Roseblatt, M., Vergara, C., Hidalgo, C., and Ikemoto, N. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8140-8148.

Rotenberg, M., and Zakim, D. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 4159-4161.

Sabbadini, R., and Dhams, S. (1989) *J. Bioenerg. Biomemb.* 21, 163-212.

Serrano, R. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 947, 1-28.

Simon, S.A., McIntosh, T.J., and Latorre, R. (1982) *Science* 216, 65-67.

Straume, M. and Litman, B.J. (1988) *Biochemistry* 27, 7723-7733.

Warren, G.B., Housley, M.D., Metcalfe, J.C., and Birsau, N.J.M. (1975) *Nature* 255, 684-687.

Yeagle, P.L. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 822, 267-287.

Yeagle, P.L. (1988) in *Biology of Cholesterol* (Yeagle, P.L. ed.) pp. 122-145. CRC Press, Boca Raton, FL.

Yeagle, P.L. (1990) in *Advances in Cholesterol Research* (Esfahani, M. and Swaney, I.B. Ed.) pp 111-132, The Telford Press, New Jersey.

FIGURES

- Fig. 1 A) Thermal inactivation of the $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase from cardiac microsomes. ATPase activity at room temperature after heating to temperatures of 49 to 64°C is shown for control (●) and cholesterol enriched membranes (○). A suspension of each membrane sample was heated in a rate controlled waterbath at 1°C/min from room temperature to 64°C. Aliquots were removed at 1 min (1°C) intervals during heating, immediately cooled to room temperature, and activity measured.
- B) The first-derivative of the data shown in Fig. 1A. The best fit theoretical curves (dotted lines) give T_1 's of 58.9 and 59.9°C for the control and cholesterol enriched microsomes, respectively.
- Fig. 2 Thermal inactivation of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity as a function of preincubation time at temperatures of 52-60°C for control (A) and cardiac microsomes enriched in cholesterol (B).
- Fig. 3 Arrhenius plots of the rate constant for the thermal inactivation (sec^{-1}) of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity of control (●) and cholesterol enriched microsomes (○). The rate constants were calculated from the inactivation curves shown in Fig. 2.
- Fig. 4 Derivative of the fractional inactivation of $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity as a function of temperature simulated using values of E_A and the A obtained from

Fig. 3. T_1 is 57.6 for control (C) and 59.2°C for cholesterol enriched microsomes (E).

Fig. 5 Differential scanning calorimetry profiles (C_p [excess] vs. temperature, scan rate 1°C/min) of control cardiac microsomes (solid line) and cholesterol enriched microsomes (broken line).

Fig. 6 Differential scanning calorimetry profiles (C_p [excess] vs. temperature, scan rate 1°C/min) of cholesterol enriched microsomes (solid line) and a sample of microsomes heated to 49°C (dashed) cooled to 10°C, and subsequently heated to 54°C (dotted), 63°C (dot-dashed), and 70°C (dot-dot-dashed).

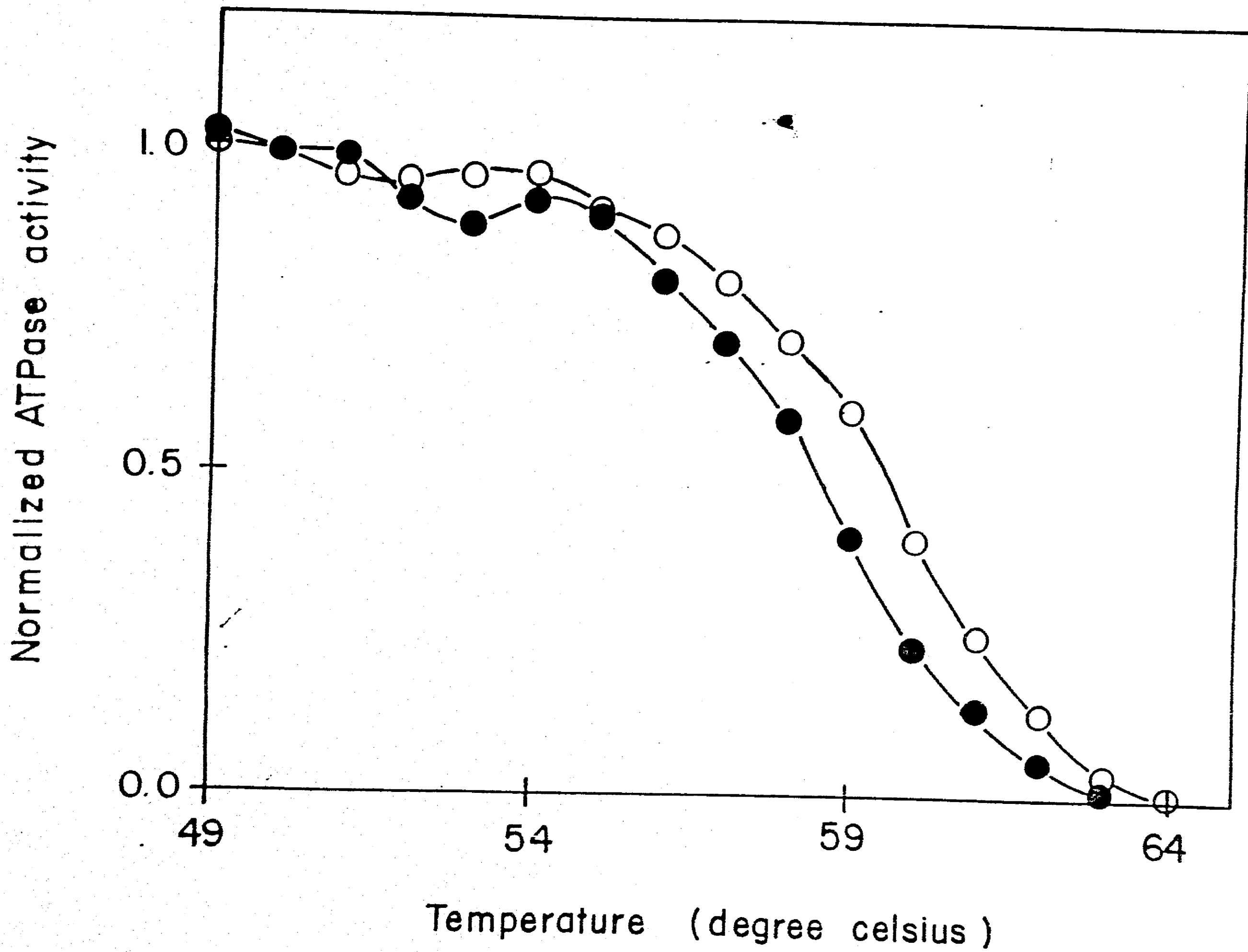


Fig 1A

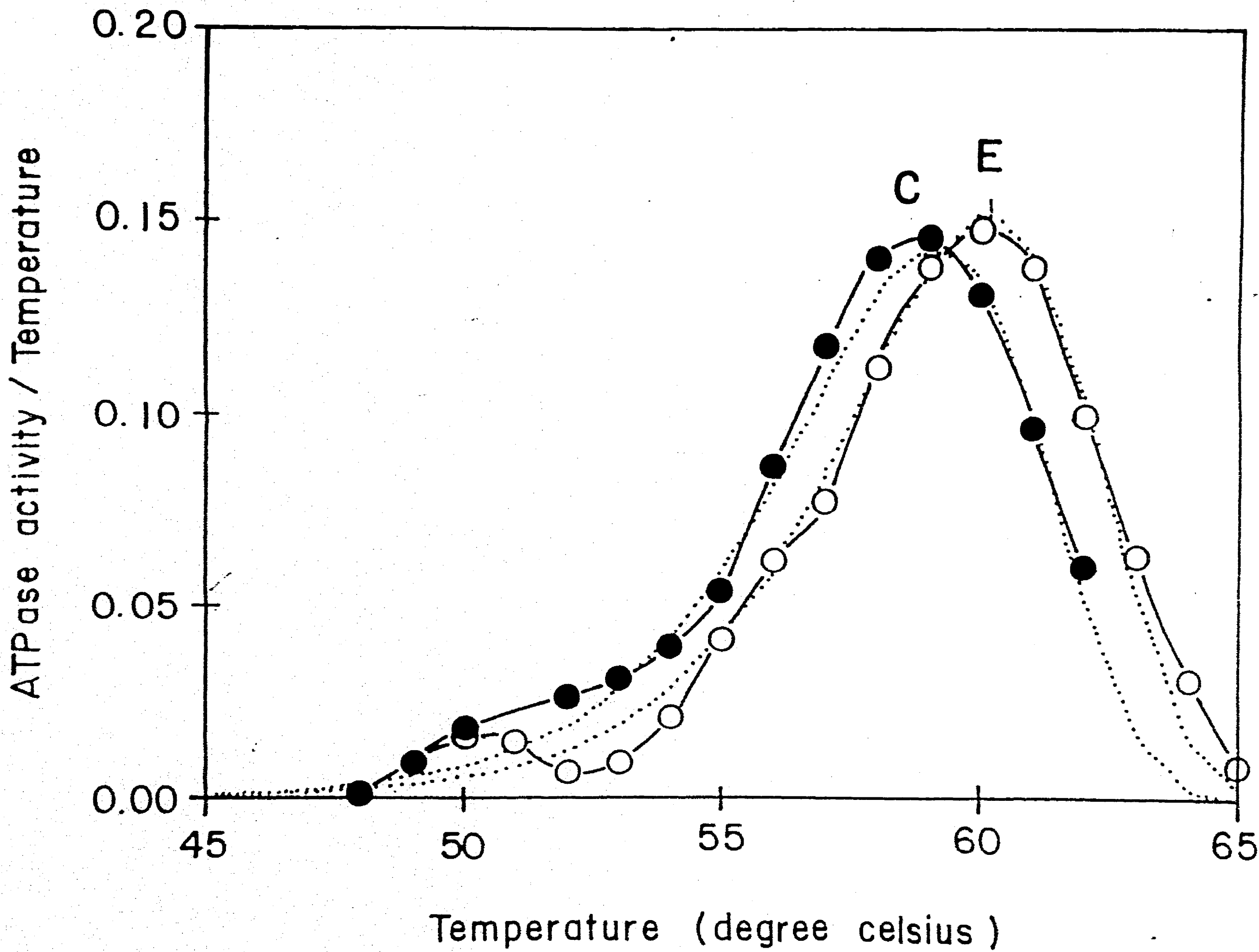


Fig 1B

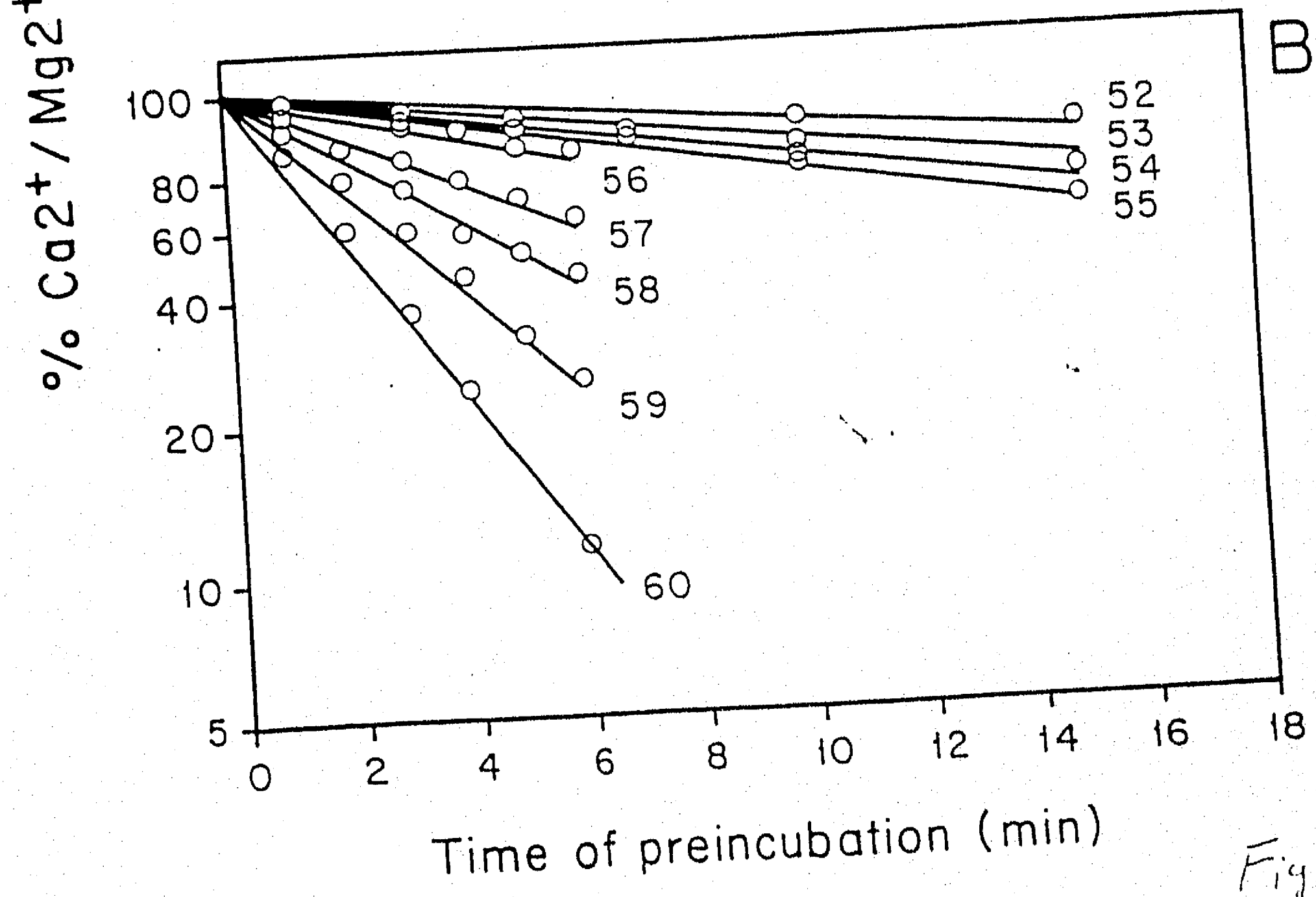
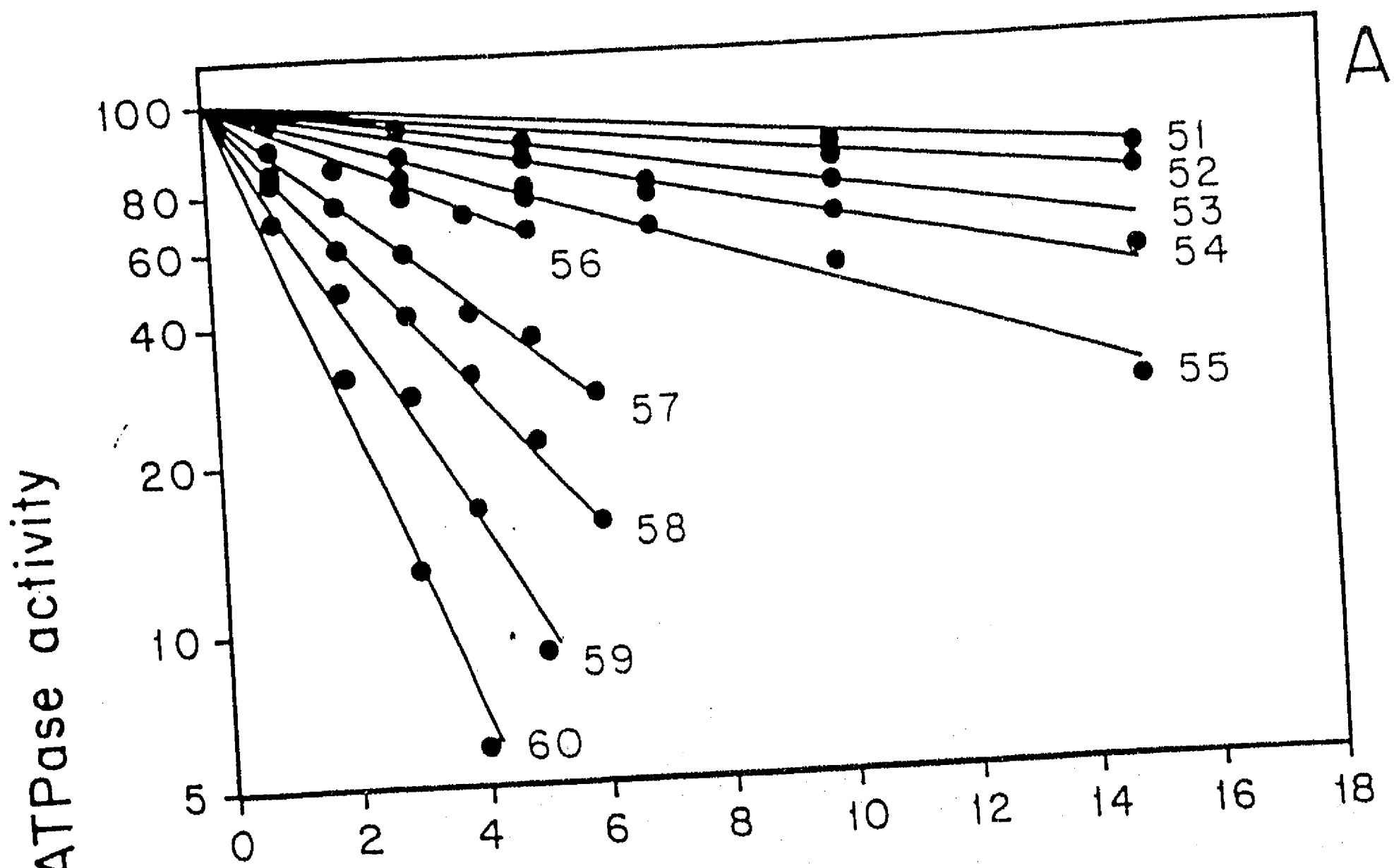


Fig 2

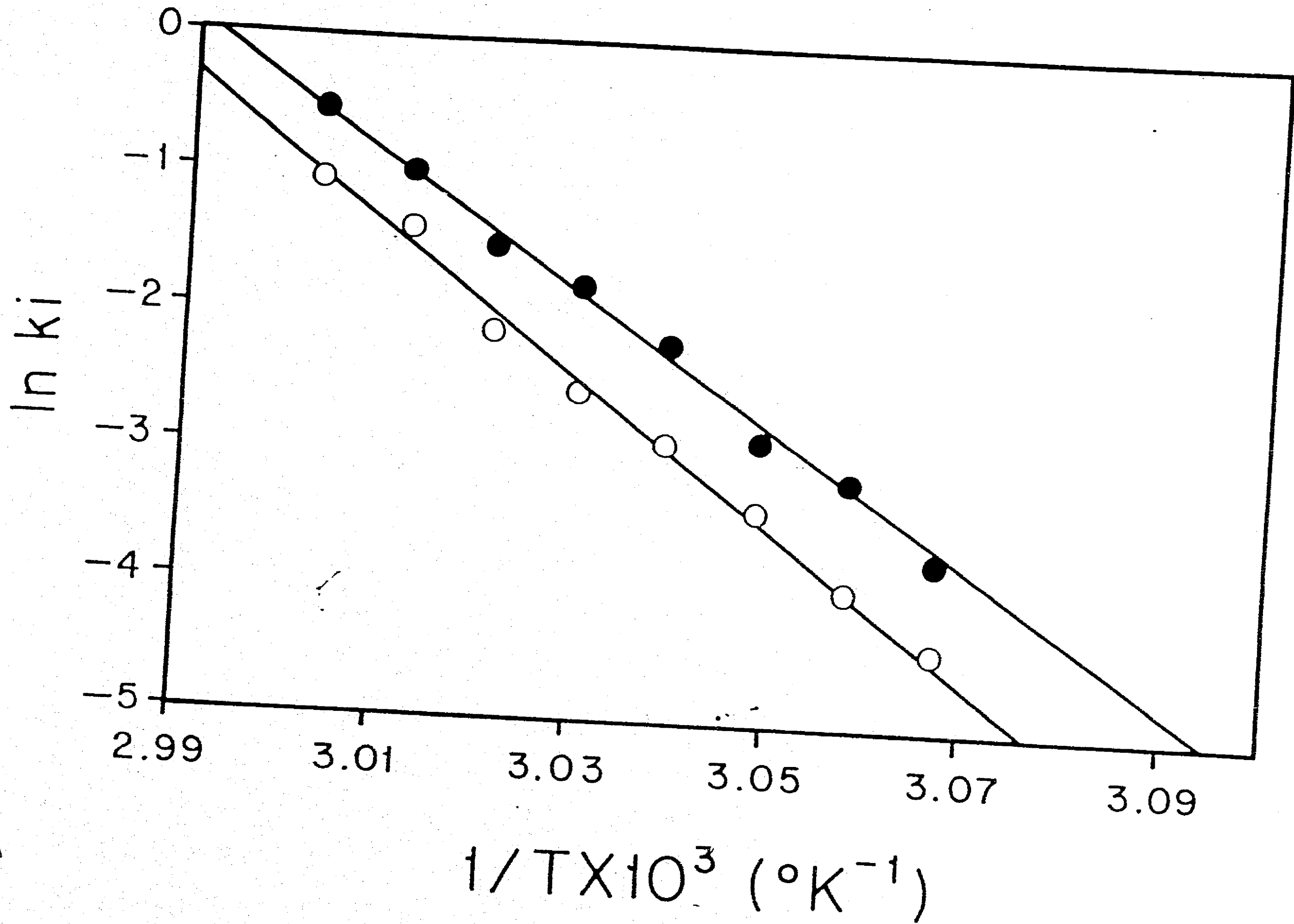


Fig. 3

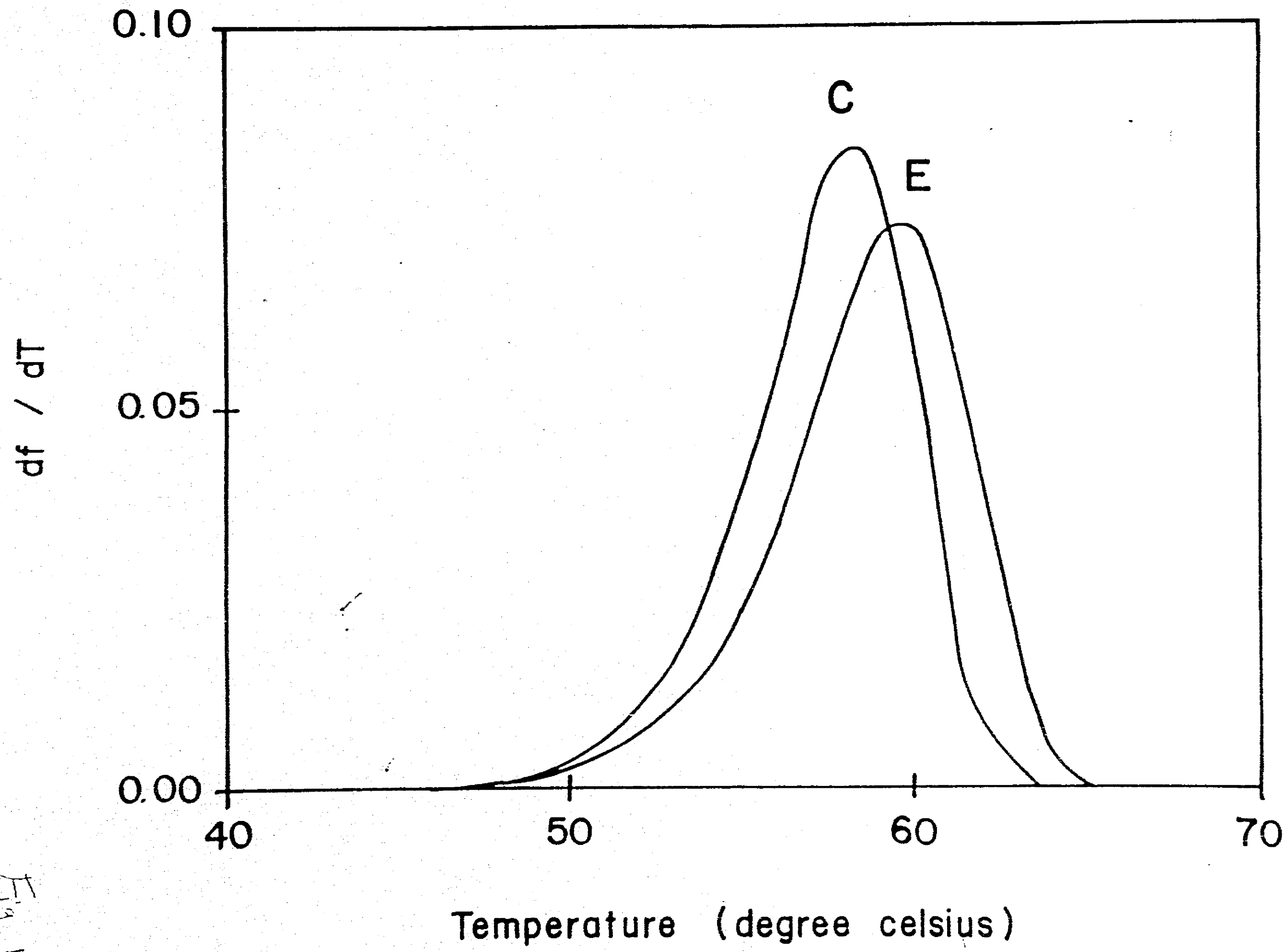


Fig 4

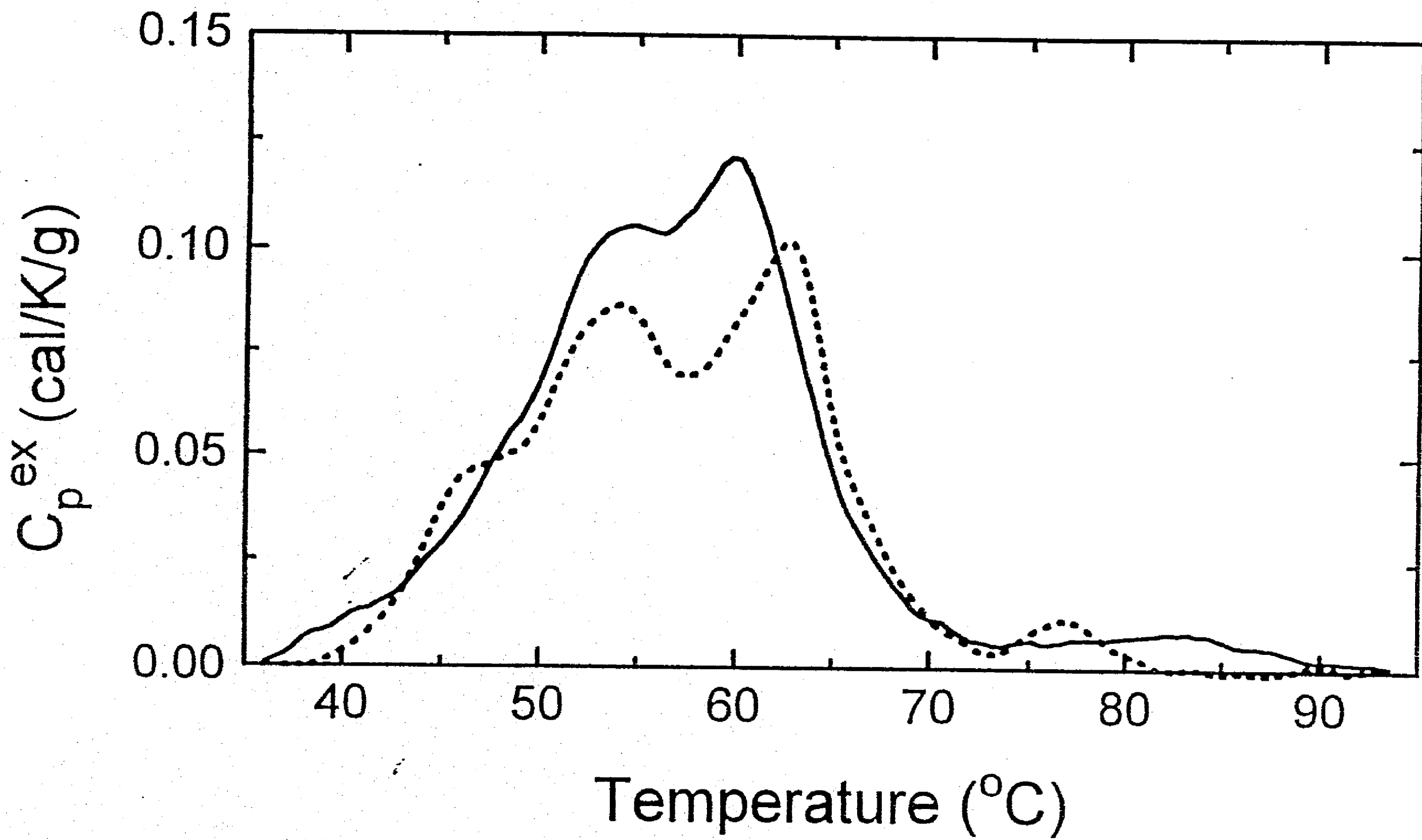


Fig 5

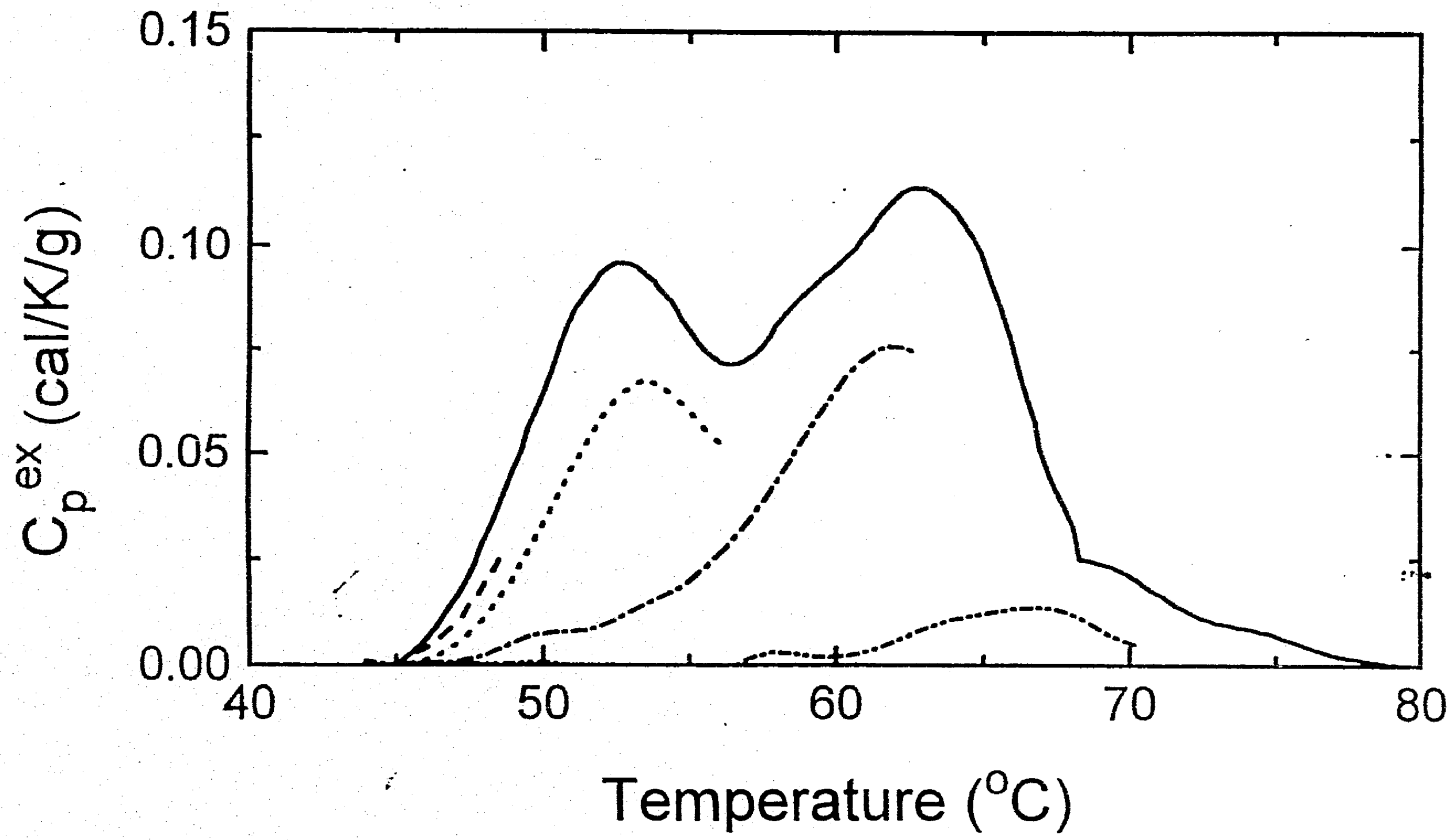


Fig. 6

**Thermal analysis of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase.
Calcium and cholesterol effects**

**Juan Santiago-García¹, Andrés Hernández-Arana² and
Jaime Mas-Oliva^{1,3}**

¹Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
Apartado Postal 70-243, 04510, México D.F.

²Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana.

³Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional
Autónoma de México, Apdo. Postal 70-159. México 04510, D.F. MEXICO.

3. To whom correspondence should be addressed

Introduction

The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase is a ubiquitous enzyme of eukaryotic cells (1). This enzyme couples the hydrolysis of ATP to the transport of calcium from the cytoplasm to the extracellular space, and has been shown to be regulated by several factors including calmodulin, phospholipids, phosphorylation, etc. (1-3). The lipid environment has been shown to be very important for the activity and stability of several membrane bound proteins, i.e., enzymes, receptors, channels, etc. For some of these proteins there is a strict lipid requirements in order to maintain a biological active conformation. Changes in the lipids surrounding these proteins can alter their activity, structure, and stability. For the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, acidic phospholipids like, phosphatidyl serine and phosphatidic acid stimulate the activity of the enzyme (4). In our laboratory we have shown that cholesterol can also regulate the activity of the pump, in such a way that high cholesterol concentrations in the membranes correlates with low ATPase activity, and *vice versa* a low cholesterol content produces a stimulation of the ATPase (5,6). We have found that an increased concentration of cholesterol in cardiac sarcolemma stabilizes the enzyme against thermal inactivation (7). Cholesterol has been also shown to stabilize the Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum (8), as well as the acetylcholine receptor (9), and the UDP-glucuronyl transpherase (10). For the acetyl choline receptor, the presence of cholesterol seems to be necessary to mantain a proper function and also to stabilize its structure (11). In a similar way, studies performed with cytochrome oxidase have shown that the activity and stability are optimum when the enzyme is reconstituted in liposomes with phospholipids containing fatty acids with 18 and 20 carbons (12,13). This conclusion has been reached using two different techniques; gel thermal analysis and differential scanning calorimetry (DSC) (12,13).

On the other hand binding of ligands or metal ions to different proteins can induce conformational changes stabilizing proteins. These conformational changes can be followed by different spectroscopic techniques like: fluorescence, circular dichroism, nuclear magnetic resonance, and electron paramagnetic resonance. Thermal analysis also offers the opportunity to investigate structural changes, based on the differential sensitivities of proteins to temperature, when binding of ligands or metal ions has been occurred. This approach has been successfully applied to study the effect of calcium on thermal inactivation and denaturation of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (14), alkaline phosphodiesterase I (15), α -lactoglobulin (16), and β -glucanase (17). In all these proteins binding of calcium induces an increase on thermally induced unfolding transition. Other studies have been focused to create calcium binding sites in different proteins by mutagenesis, in this way binding of Ca^{2+} stabilizes proteins like: subtilisin (18), and lysozyme (19,20). Pronounced protein stabilization mediated by metal ions has been reported for Cu-Zn superoxide dismutase (21) and zinc metalloenzyme alkaline phosphatase (22). Enzyme stabilization by cations has been also observed for membrane bound pyrophosphatase from the photosynthetic bacteria *R. rubrum*, where binding of Zn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} protects the enzyme against thermal inactivation (23).

In this study we have used thermal analysis to investigate the role of calcium and cholesterol on thermal stability of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isolated to homogeneity. It is shown that calcium and cholesterol stabilize the enzyme against thermal inactivation, and for the first time we provide an insight into the thermodynamic properties of this phenomena.

Materials and Methods

Cardiac Microsomes Isolation

The microsomal enriched fraction was isolated from calf ventricular muscle based in a procedure reported by van Alstyne et al. (24) with modifications performed in our laboratory (25). The procedure involves the following steps: calf ventricular tissue is cleaned and finely minced with cold scissors, homogenized twice with a blender for 2 minutes and rehomogenized with an ultra turrax five cycles for 5 seconds each in a buffer containing 10 mM NaHCO₃ (pH 7.0), and 0.5 mM sodium azide (buffer A). After filtration with four layers of gauze, the suspension is centrifuged at 8,700 g for 30 min. and the supernatant separated. The pellets are blender homogenized for 2 min. with 5-6 volumes of buffer A, recentrifuged at 8,700 g for 30 min., and the supernatants mixed and centrifuged at 22,000 g for 60 min. Pellets from this spin are homogenized with a Potter pestle in 5-6 volumes of a buffer containing 20 mM malic acid (pH 6.8), and 0.6 M KCl (buffer B). The suspension centrifuged at 33,000 g for 60 min. and the pellets resuspended and homogenized with a Potter pestle in 5-6 volumes of a buffer containing 10 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 2.0 mM EDTA. The suspension is mixed for 10 min. with a magnetic stirrer and centrifuged at 50,000 g for 30 min. Pellets are resuspended in 2 vol. of a buffer containing 50 mM Tris-malate (pH 7.4), 0.5 mM MgCl₂, 50 μM CaCl₂, 2 mM DTT (buffer C), separated in aliquots, and stored at -70°C.

Ca²⁺-ATPase isolation from cardiac sarcolemma

The Ca²⁺-ATPase from cardiac sarcolemma is isolated employing a calmodulin-sepharose 4B column as described by Niggli et al (26). Briefly, the microsomal membrane suspension is adjusted to 5 mg of protein/ml with a buffer containing 20 mM MOPS, 130 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 2

mM DTT (pH 7.4). Triton X-100 is slowly added to a final concentration of 0.5%, gently stirred during 15 min. and the nonsolubilized material removed by centrifugation at 100,000xg at 4°C for 30 min. The supernatant is recovered and sonicated soybean asolectins added to a final concentration of 0.5 mg/ml. The supernatant is loaded in a calmodulin-sepharose 4B column, previously equilibrated with the solubilization buffer plus 0.5% Triton X-100 and asolectins 0.5 mg/ml (buffer A) . The column is washed with 10-15 volumes of buffer A, and with 10 volumes of the same buffer with the exception that Triton X-100 is decreased to 0.05% (buffer B). Finally, the enzyme is eluted with 20 mM MOPS, 130 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM EGTA, 10% Glycerol, 0.05% Triton X-100 and 0.5 mg/ml asolectins (pH 7.4) (buffer C). The isolated enzyme is stored in liquid nitrogen until use. In order to obtain the enzyme in the different lipid environments employed, the ratio cholesterol/phospholipid is changed along the purification procedure.

Thermal inactivation experiments

Inactivation experiments performed as a function of temperature employ two to three micrograms of isolated enzyme in buffer C with the indicated concentrations of free calcium and cholesterol. The samples are heated in a water bath at a heating rate of 1.2°C/min., removed from the bath at 1°C intervals from 25°C to 55°C, and immediately placed on ice until all samples were collected. Once all samples are collected, the remaining Ca²⁺-ATPase activity is determined at 25°C.

For the inactivation experiments as a function of time where the temperature is kept constant, the purified Ca²⁺-ATPase contained in the different lipid mixtures is heated in buffer C. This buffer either contains 1 mM EGTA (no calcium), 10 µM or 100 µM free calcium. Samples are incubated at the desired temperatures in small glass tubes, removed at the indicated times and placed on ice. The remaining Ca²⁺-ATPase activity is measured at 25°C as indicated below. Rates of inactivation are obtained from least-square analysis calculated

from the plots of log of the remaining activity vs. time. The activation energy (E_A) is calculated from the slope of the Arrhenius plots.

Ca²⁺-ATPase activity measurement

The Ca²⁺-ATPase activity is determined at 25°C in a reaction medium containing 20 mM MOPS-KOH (pH 7.4), 130 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 3 mM ATP and the free Ca²⁺ concentration adjusted to 10 μM with EGTA. After incubation for ten minutes, the reaction is stopped with the malaquite acid reagent and released Pi determined (27). Free Ca²⁺ concentrations are adjusted with a computer program (28). Protein was measured following the Bensandoun and Wenstein procedure (29).

Results

The use of a microsomal preparation permitted us to obtain large amounts of membranes employed as raw material for affinity chromatography. The use of this preparation for the isolation of the sarcolemmal Ca²⁺-ATPase employing a calmodulin-sepharose column, gave excellent results since large amounts of membranes permitted to isolate good concentrations of pure Ca²⁺-ATPase as demonstrated by SDS-PAGE and calmodulin sensitivity (data not shown).

After isolation, enzyme activity obtained at 25°C without heat treatment was used as representative of the enzyme in native state. The fraction of enzyme activity remaining in the native state at higher temperatures (F_n), is obtained by dividing the activity of the enzyme at the indicated temperatures over the activity at 25°C as follow:

$$F_n(T) = \frac{A(T)}{A(25^\circ C)}$$

where $A(T)$ and $A(25^\circ C)$ represent the normalized activities at temperature T and 25°C, respectively.

Inactivation profiles presented a sigmoid shape and a marked shift of inactivation profiles to higher temperatures dependent on the presence of calcium ions. This effect is more evident when 100 μM free calcium is added during enzyme preincubation (Fig. 1A). These results suggest that calcium stabilizes and protects the Ca^{2+} -ATPase against thermal inactivation. When cholesterol was added to the phospholipid dispersion in a molar ratio of 0.3/0.7 or 0.4/0.6 (cholesterol/phospholipid), the inactivation profiles for the Ca^{2+} -ATPase was slightly shifted to higher temperatures, compared to the enzyme associated to phospholipids only (Fig. 1B and 1C).

The sigmoid-like patterns of the heat-inactivation curves were also analyzed in terms of their T_{50} values, temperatures at which half of the initial Ca^{2+} -ATPase activity remains (Table I). Depending upon preincubation time, concentration of calcium and/or cholesterol, the T_{50} values ranged between 46.4°C in the absence of calcium to 48.9°C in the presence of 100 μM of this cation. From these data we can observe that in the absence of calcium, cholesterol seems to have no effect on enzyme stabilization, since the cholesterol effect is only appreciated when calcium is present in the preincubation media. These results suggest that calcium *per se* has an important role on enzyme stabilization against thermal inactivation. However at 10 μM of free calcium, the addition of cholesterol seems to optimize or potentiate the stabilizing effect of calcium. These results also suggest that calcium binding to the enzyme might expose certain areas of the protein susceptible to interact with cholesterol, since in the absence of calcium there is no change in the T_{50} and ΔH_{vh} , in contrast to the values found when calcium ions are presented (Table I).

Using the data shown in Figure 1, the "apparent equilibrium constants", corresponding to the ratio of the population of molecules in the inactive *vs.* native state were calculated:

$$K_{app}(T) = \frac{1 - F_n(T)}{F_n(T)} = \frac{F_d(T)}{F_n(T)}$$

The apparent equilibrium constants can be used to estimate "apparent thermodynamic parameters" like the van't Hoff enthalpy. The van't Hoff plots for the calculated apparent equilibrium constants obtained from data shown in Figure 1 are presented in Figure 2. The linearity of these plots suggest that even though the thermal inactivation of the Ca^{2+} -ATPase is irreversible, calculated k_{app} values obey an exponential dependence on the inverse of the absolute temperature. The addition of calcium to the enzyme produces an increase in the slopes of the van't Hoff plots, whereas the addition of cholesterol causes a decrease. Although the presence of calcium and cholesterol seem to "increase" the thermal stability of the enzyme, reflected in higher T_{50} values, ΔH_{vh} values decrease when cholesterol is present in the lipid dispersion.

It has been proposed that under irreversible processes or reversible multistage transitions, the van't Hoff enthalpy change is only a measure of the sharpness of a thermally induced transition rather than the effects associated with the process (13). If we assume this idea, addition of calcium to the preincubation media produces sharper transitions during enzyme inactivation, suggesting that calcium might induce high cooperativity during this process. On the other hand, the addition of cholesterol together with calcium produces less sharp curves, suggesting a poorer cooperativity during thermal inactivation of the Ca^{2+} -ATPase.

Once we established the temperatures for the transition of the Ca^{2+} -ATPase (active-inactive), we carried out inactivation experiments at fixed temperatures as a function of time. Inactivation plots of remaining Ca^{2+} -ATPase activity at different conditions, are presented in Figures 3 and 4. It is shown that enzyme inactivation obeyed pseudo-first-order kinetics. Addition of calcium during preincubation stabilizes the Ca^{2+} -ATPase activity against thermal inactivation, reflected in a decrease of the inactivation rates at each temperature (Fig. 3). Arrhenius plots, obtained from the data presented in

panels 3A and 3B show that calcium addition during preincubation produces an increase of about 10 kcal/mol in the activation energy of the process (Fig. 3C and Table II). In a similar set of experiments, our results show that the inclusion of cholesterol in the lipid mixture decreases the inactivation rates, where the addition of calcium seems to further stabilize the enzyme against the heat challenge, producing a higher decrease in the inactivation rates (Fig. 4). Even though cholesterol seems to stabilize the enzyme, we observe a decrease in the activation energy (around 8 kcal/mol), compared to the enzyme present in phospholipid dispersions only (Table II). However, when calcium and cholesterol are present during preincubation, the activation energy increases again, close to those values obtained when phospholipids and calcium are present during preincubation (Table II).

In order to obtain more information about the apparent thermodynamic parameters involved in the thermal inactivation of the Ca^{2+} -ATPase from cardiac sarcolemma, the data presented in Figs. 3 and 4 were replotted as $\ln(k/T)$ vs $(1/T)$ (Fig. 5) and analyzed with the following equation:

$$\ln(k/T) = \frac{-\Delta H^{++}}{R} (1/T) + \frac{\Delta S^{++}}{R} + \ln(k'/h)$$

where ΔH^{++} is the apparent enthalpic change, ΔS^{++} the apparent entropic change, R the gas constant, k the Boltzman constant, and h the Plank's constant.

From the slope of these plots, it is possible to estimate ΔH^{++} , and from the intercept ΔS^{++} . The data obtained from these calculations are summarized in Table II. The results show that while calcium increases ΔH^{++} of the transition, cholesterol induces a decrease of ΔH^{++} values, even if calcium is present in the preincubation media. On the other hand, if we accept the hypothesis that high ΔS values correlate with a more disorganized system, the addition of cholesterol to the enzyme produces a decrease in ΔS^{++} , suggesting that under

these conditions the enzyme seems to be more organized. A different interpretation could be due to the possibility that the initial and final states of the enzyme are different depending on the composition of the preincubation media.

ΔG^{++} calculated from ΔH^{++} and ΔS^{++} is ranged between 24 and 27 kcal/mol depending on the lipid composition, and the presence or absence of calcium in the medium (Table II). Since ΔG has been used as a parameter for protein stability, ΔG^{++} values obtained suggest that the enzyme is more stable when calcium is present in the preincubation medium. This stabilization effect seems to be enhanced when cholesterol is present.

Discussion

Our results show that calcium promote an increase in different thermodynamic parameters like: T_{50} values, van't Hoff enthalpy and apparent ΔG . Binding of calcium to the enzyme can induce structural changes reflected in higher stability of the protein. Although a direct evidence of the location of calcium binding sites in the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase and the conformational changes induced by this cation are unknown, we can discuss our results in the following context. Extensive reports in the literature have been show that plasma membrane Ca^{2+} -ATPase has a K_M for calcium between 10-20 μM (1-3). The experiments performed at 10 μM of free calcium suggest that at this concentration, the cation can partially saturate the active site of the enzyme, that in turn can induce a conformational change reflected in higher T_{50} and ΔH_{vh} values. Furthermore addition of 100 μM of free calcium produce a higher increase in these values, at this concentration calcium can saturate completely the active site of the enzyme, inducing a different or additional structural change producing a more stable conformation of this ATPase.

In a recent work it has been proposed that plasma membrane Ca^{2+} -ATPase has two non catalytic high affinity Ca^{2+} binding sites, located in the COOH

terminus (30). An alternative explanation of our data could be that 10 μ M of calcium can saturate these high affinity binding sites and partially saturates the active site, which in turn can promote stabilization of the protein. When calcium concentration is raised to 100 μ M the active site should be totally saturate, producing a more stable conformation of the enzyme. Although we perform CD experiments, we found no difference in the espectras in the presence and absence of calcium (data not show), suggesting that the change should be on the tertiary structure of the enzyme. For the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase it was also found that calcium binding has no effect on the secondary structure (31). Although a high affinity calcium binding sites have been proposed for the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, located between the putative transmembrane sequences M4, M5, M6 and M8 (32), definitive determination of calcium binding site(s) in the plasma membrane Ca²⁺-ATPase will require the elucidation of its three dimensional structure. Crystallographic and thermal studies performed with proteins like: Δ -glucanase, subtilisin, and lysozyme have demonstrated that binding of metal ions induce structural changes producing more stable conformations of these proteins (17-20).

Values of apparent ΔH obtained from experiments presented in figures 3 and 4 are lower compare to ΔH_{vh} obtained from figures 1 and 2. Since it was not possible to determine the calorimetric ΔH it is difficult to know which values are correct. It is possible that ΔH^{++} values obtained from data presented in figures 3 and 4 are more accurate than values obtained from figures 1 and 2, due to they include more data points. The inactivation of the Ca²⁺-ATPase is a irreversible transition, these differences can be explained in terms that ΔH_{vh} values only reflect the sharpness of the transition and not the energy involved in the process. This assumption has been validated for irreversible transitions or multistage reversible transitions (13). The higher ΔH_{vh} values obtained in the presence of calcium, might be suggest that thermal transition of the

plasma membrane Ca^{2+} -ATPase is more cooperative than in the absence of this cation.

On the other hand, cholesterol has a less prominent effect than calcium, in did there is no change on T_{50} and ΔH_{vh} values in the absence of calcium (table 1), suggesting that cholesterol can stabilize the enzyme only in the presence of calcium, which in turn suggest that calcium binding to the enzyme might expose certain areas of the protein that might interact with cholesterol. However, during the inactivation experiments keeping the temperature constant but changing the time of preincubation, a decrease in the inactivation rates, even in the absence of calcium was observed. Under these conditions the presence of calcium seems to be no necessary to observe a stabilizing effect of cholesterol. The decrease of ΔH_{vh} and apparent ΔH^{++} values induce by cholesterol might suggest that this lipid decrease the cooperativity during the thermally induced transition of the Ca^{2+} -ATPase. Although a cholesterol binding site in the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase has not been identified yet, our results suggest the possibility that this lipid could interact with this enzyme.

ΔG^{++} values also suggest that calcium and cholesterol stabilize the enzyme ...

Our results clearly demonstrate that calcium has a important effect on the stabilization of this enzyme, but further experiments need to be done to explore the mechanism and the structural modifications induce by this cation.

References

1. Carafoli, E. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56, 395-433.
2. Rega, A.F. and Garrahan, P.J. (1985) *The calcium pump of plasma membranes.* CRC press, Boca raton Fl, 173 pp.
3. Carafoli, E. (1994) *FASEB J.* 8, 993-1002.
4. Carafoli, E. and Zurini, M. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 683, 279-301.
5. Ortega, A. and Mas-Oliva, J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta.* 773, 231-236.
6. Ortega, A. and Mas-Oliva, J. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 868-874
7. Mas-Oliva, J. and Santiago-García, J (1990) *Biochem. Int.* 21, 233-241.
8. Cheng, K-H., Hui, SW. and Lepock, J.R. (1988) *Cancer Res.* 47, 1255-1262.
9. Artigues, A., Villar, M.T., Fernandez, J., Farragut, J.A. and Gonzalez-Ros J.M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 985, 325-330.
10. Rotenberg, M. and Zakim, D. (1991) *J Biol Chem* 266: 4159-4161.
11. McNamee, M.G. and Fong T.M. (1988) In: *Lipid Domains and the Relationship to Membrane Function*, vol. 2. Aloia RC, Curtain CC, Gordon LM (Ed.) Alan Liss, New York, pp 43-62.
12. Morin, P.E. Diggs. D. and Freire, E. (1990) *Biochemistry* 29, 781-788.
13. Rigell, C.W. and Freire, E. (1987) *Biochemistry* 26, 4366-4371.
14. Lepock, J.R., Rodhal, A.M., Zhang, C., Heynen, M.L., Waters, B. and Cheng, K-H. (1990) *Biochemistry* 29, 681-689.
15. Belli, S.I., Sali, A. and Goding, J.W. (1994) *Biochem J.* 304, 75-80.
16. Mitani, M., Harushima, Y., Kuwajima, K., Ikeguchi, M. and Sugai, S. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 8824-8829.
17. Keitel, T., Meldgaard, M. and Heinemann, U. (1994) *Eur. J. Biochem.* 222,203-214.

18. Pantoliano, M. W., Whitlow, M., Wood, J.F., Rollence, M.L. Finzel, B.C., Gilliland, G.L., Poulos, T.L. and Bryan P.N. (1988) *Biochemistry* 27, 8311-8317.
19. Kuroki, R., Taniyama, Y., Seko, C., Nakamura, H., Kiruchi, M. and Ikehara, M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6903-6907.
20. Kuroki, R., Kawakita, S., Nakamura, H. and Yutani, K. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6803-6807.
21. Roe, J.A., Butler, A., Scholler, D.M., Valentine, J.S., Marky, L. and Breslauer, K.J. (1988) *Biochemistry* 27, 950-958.
22. Chlebowski, J.F., Mabrey, S. and Falk, M.C. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 5745-5753.
23. Ordaz, H. Sosa, A., Romero, I. and Celis, H. (1992) *Int. J. Biochem.* 24, 1633-1638.
24. VanAlstyne, E., Bartschat, D.K., Wellsmith, N.V., Poe, S.L., Schilting, W.P. and Lindenmayer, G.E. *Biochim. Biophys. Acta* 553, 388-395.
25. Oliva-Ramírez, G. (1994) Master of Sciences Thesis. Faculty of Medicine. National Autonomus University of Mexico.
26. Niggli, V., Adunyah, E. S. and Carafoli, E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8588-8592.
27. Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S., Candia, O.A. (1979) *Anal. Biochem.* 100, 95-97.
28. Fabiato, A. (1988) *Methods Enzymol.* 157, 378-416.
29. Bensandoun, A. and Wenstein, D. (1976) *Anal. Biochem.* 70, 241-250
30. Hofmann, F., James, P., Vorherr, T. and Carafoli, E. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 10252-10259.
31. Nakamoto, R.K. and Inesi, G. (1986) *FEBS Lett.* 194, 258-262.
32. Clarke, D.M., Loo, T.W., Inesi, G. and MacLennan, D.H. (1989) 339, 476-478.

Figure Legends

Fig. 1. Thermal inactivation profiles of the Ca^{2+} -ATPase under different lipid compositions in the presence or absence of calcium. A. Inactivation profiles of the enzyme in soybean phospholipids dispersion (0.5 mg/ml). B. Inactivation profiles of the Ca^{2+} -ATPase in cholesterol/phospholipids (0.3/0.7) dispersion. C. Inactivation profiles of the enzyme in cholesterol/phospholipids (0.4/0.6) dispersion. Symbols (o) 1 mM EGTA, (•) 10 μM of free Ca^{2+} , and (\blacktriangle) 100 μM free Ca^{2+} during preincubation.

Fig. 2. van't Hoff plots of the Ca^{2+} -ATPase inactivation, obtained from the data shown in figure 1. Symbols correspond to figure 1.

Fig. 3. Inactivation of the Ca^{2+} -ATPase at the indicated temperatures and times as described in Materials and Methods, in phospholipids dispersion (0.5 mg/ml). A. Inactivation plots of the enzyme preincubated in the presence of 1 mM EGTA (no calcium). B. Inactivation of the enzyme preincubated in the presence of 10 μM of free calcium. C. Arrhenius plots obtained from the calculated inactivation rates from the data shown in panel A and B. Symbols represent, (o) inactivation in the presence of 1 mM of EGTA, or (•) 10 μM of free Ca^{2+} .

Fig. 4. Inactivation of the Ca^{2+} -ATPase preincubated at the indicated temperatures and times in cholesterol/phospholipids (0.3/0.7) dispersion (0.5 mg/ml). A. Inactivation plots of the enzyme preincubated at the indicated temperatures in the presence of 1 mM of EGTA (no calcium). B. Inactivation of the enzyme preincubated in the presence of 10 μM of free Ca^{2+} . C. Arrhenius plots obtained from the calculated inactivation rates from the data shown in panel A and B. Symbols same as figure 3.

Fig. 5. Replot of the data presented in figures 3 and 4. Inactivation of the Ca^{2+} -ATPase in phospholipid dispersions (o,●). Inactivation of the enzyme in cholesterol/phospholipid dispersions (0.3/0.7) (Δ , \blacktriangle), open symbols preincubation of the enzyme with 1 mM of EGTA (no calcium), and closed symbols preincubation of the enzyme in the presence of 10 μM of free Ca^{2+} .

TABLE I

Influence of calcium and cholesterol on T_{50} and ΔH_{vh} of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase

	ΔH_{vh} (kcal/mol)			T_{50} ($^{\circ}C$)		
	0	10	100	0	10	100
Free $[Ca^{2+}]$ μM						
PL	138	184	223	46.4	47.1	48.8
PL/CHOL (0.7/0.3)	139	155	135	46.4	47.8	48.4
PL/CHOL (0.6/0.4)	139	157	154	46.5	48.1	48.9

Note: PL=phospholipids

PL/CHOL=phospholipids/cholesterol

TABLE II**Thermodynamic Properties of Purified Ca²⁺-ATPase From Cardiac Sarcolemma**

	<u>ΔH^{++}</u> <u>kcal/mol</u>	<u>ΔS^{++}</u> <u>cal/molK</u>	<u>ΔG_{298K}</u> <u>kcal/mol</u>	<u>E_A</u> <u>kcal/mol</u>
PL	83.6	200.2	23.9	81.3
PL + Ca ²⁺ 10 μ M	90.8	222.2	24.5	93.4
PL/CHOL	69.7	154.8	26.6	73.1
PL/CHOL + Ca ²⁺ 10 μ M	83.4	197.0	24.7	87.3

Note: PL=Phospholipids, PL/CHOL=Phospholipids/cholesterol (0.7/0.3)

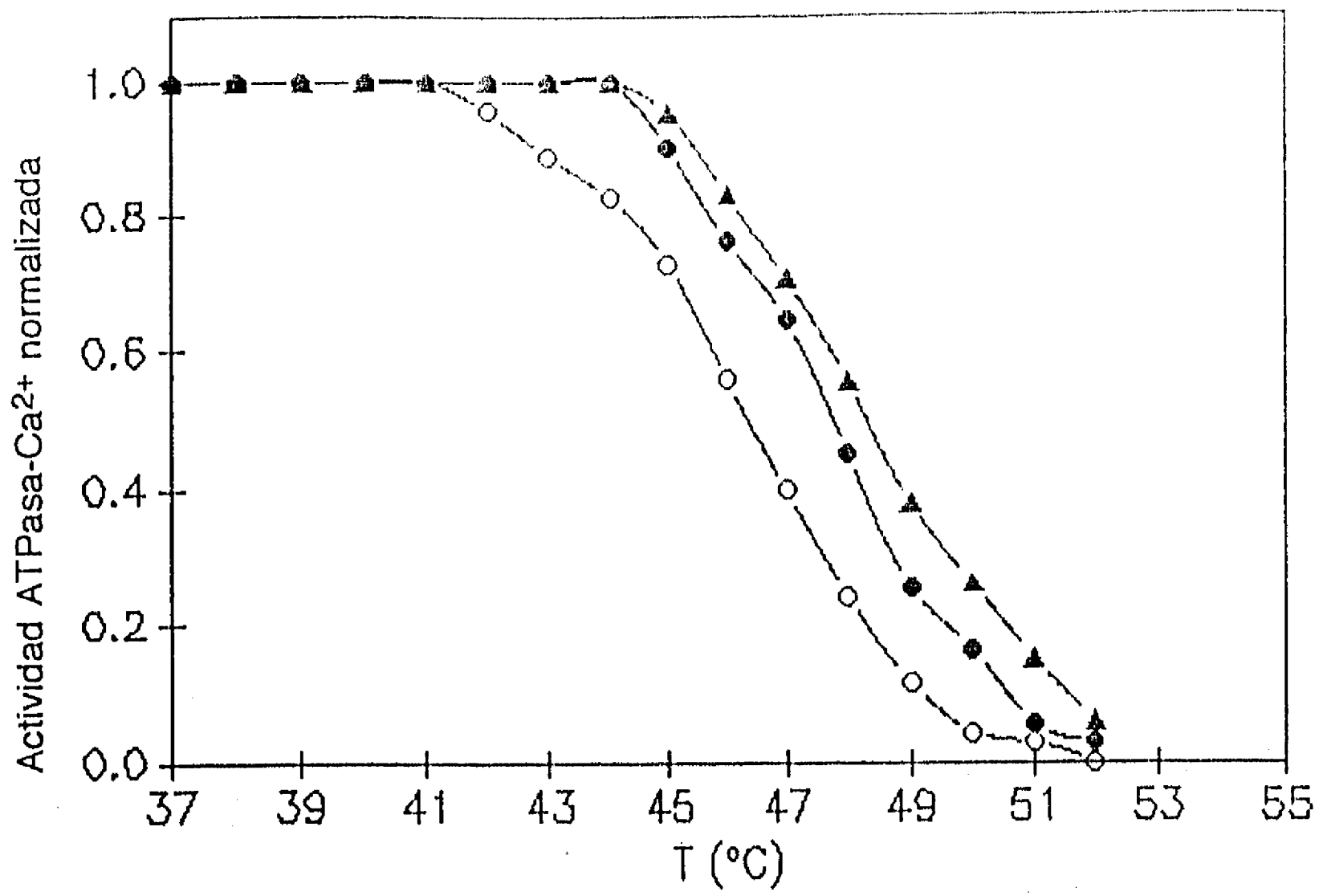
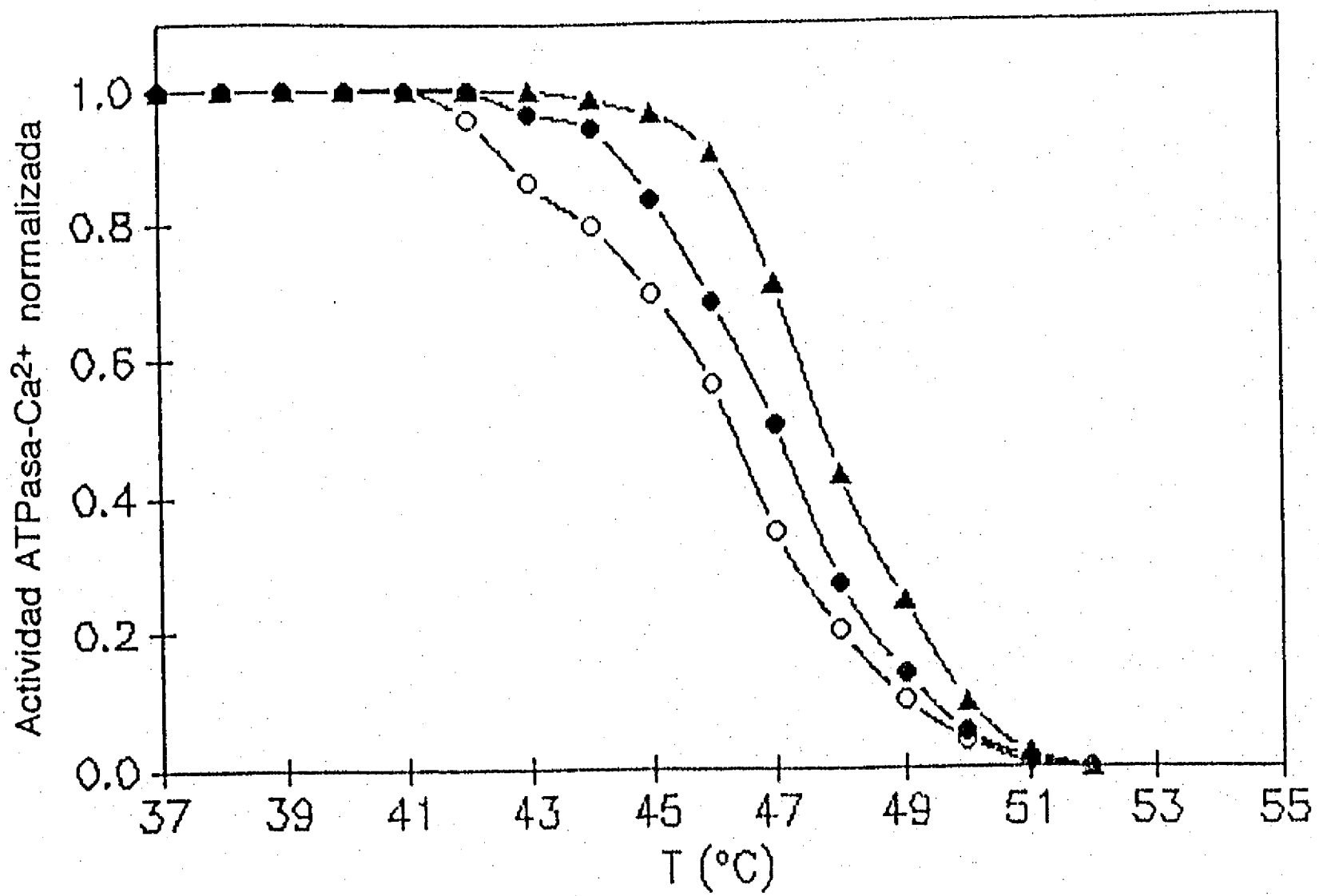


Fig. 1 B



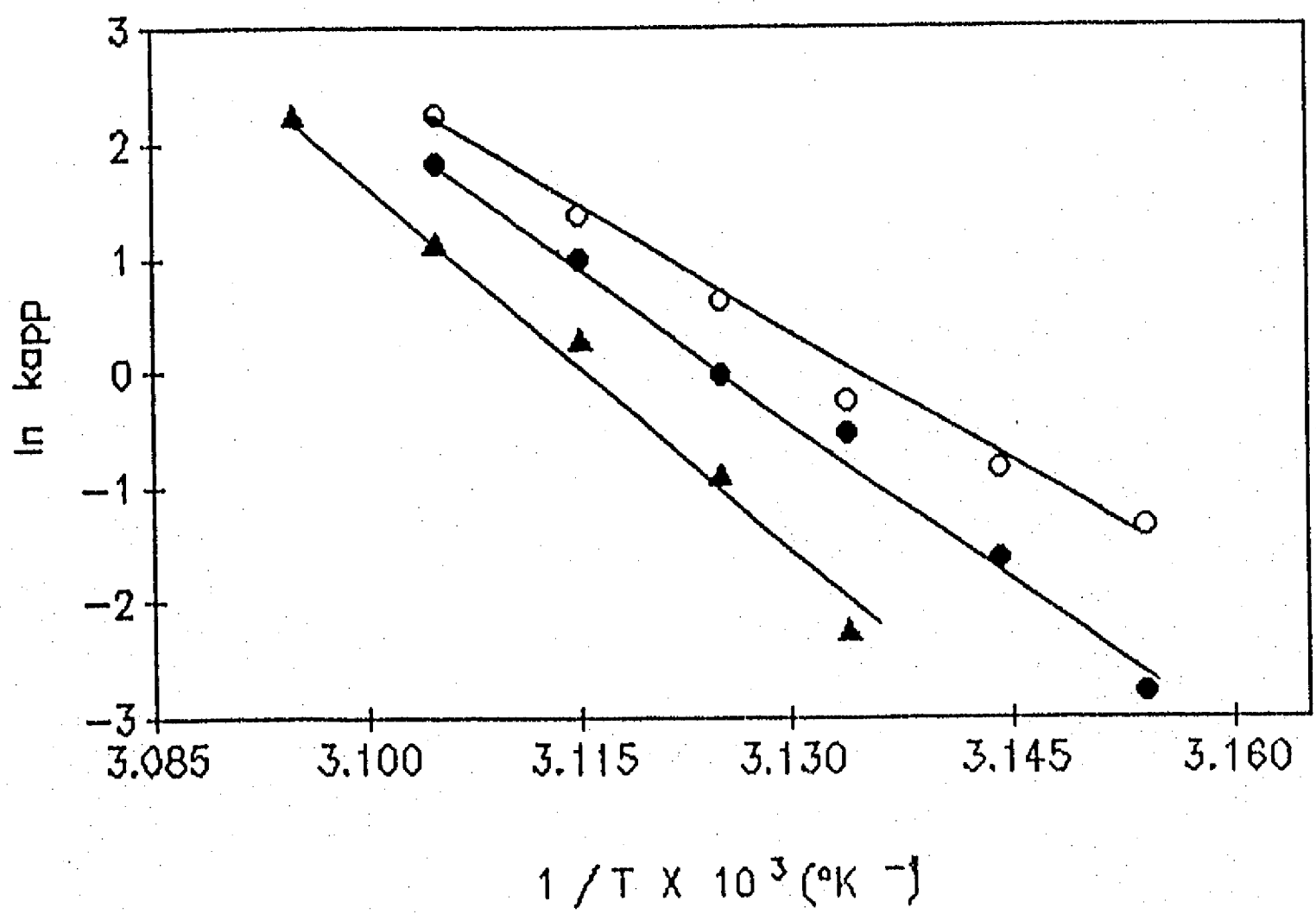
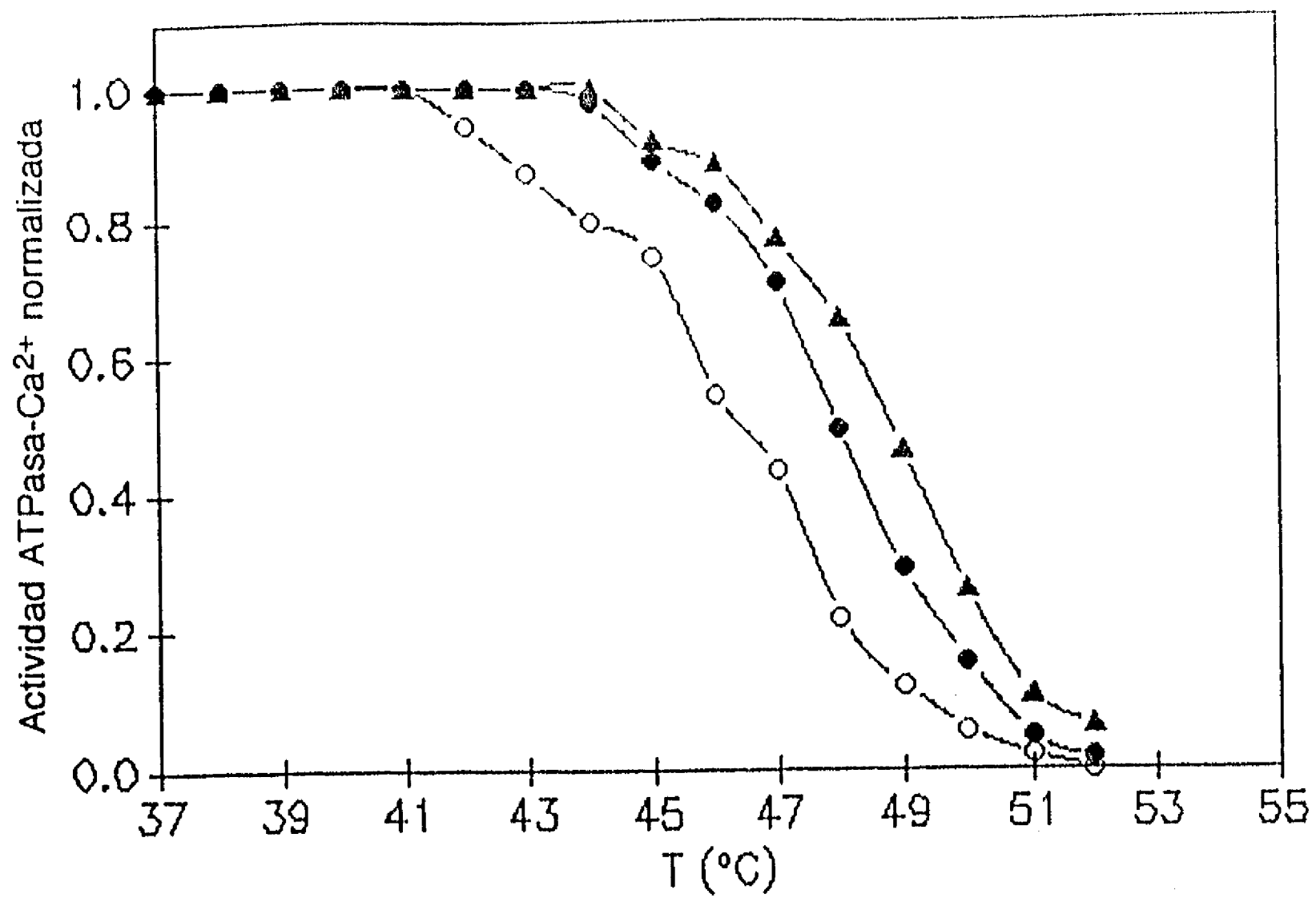


Fig 2A

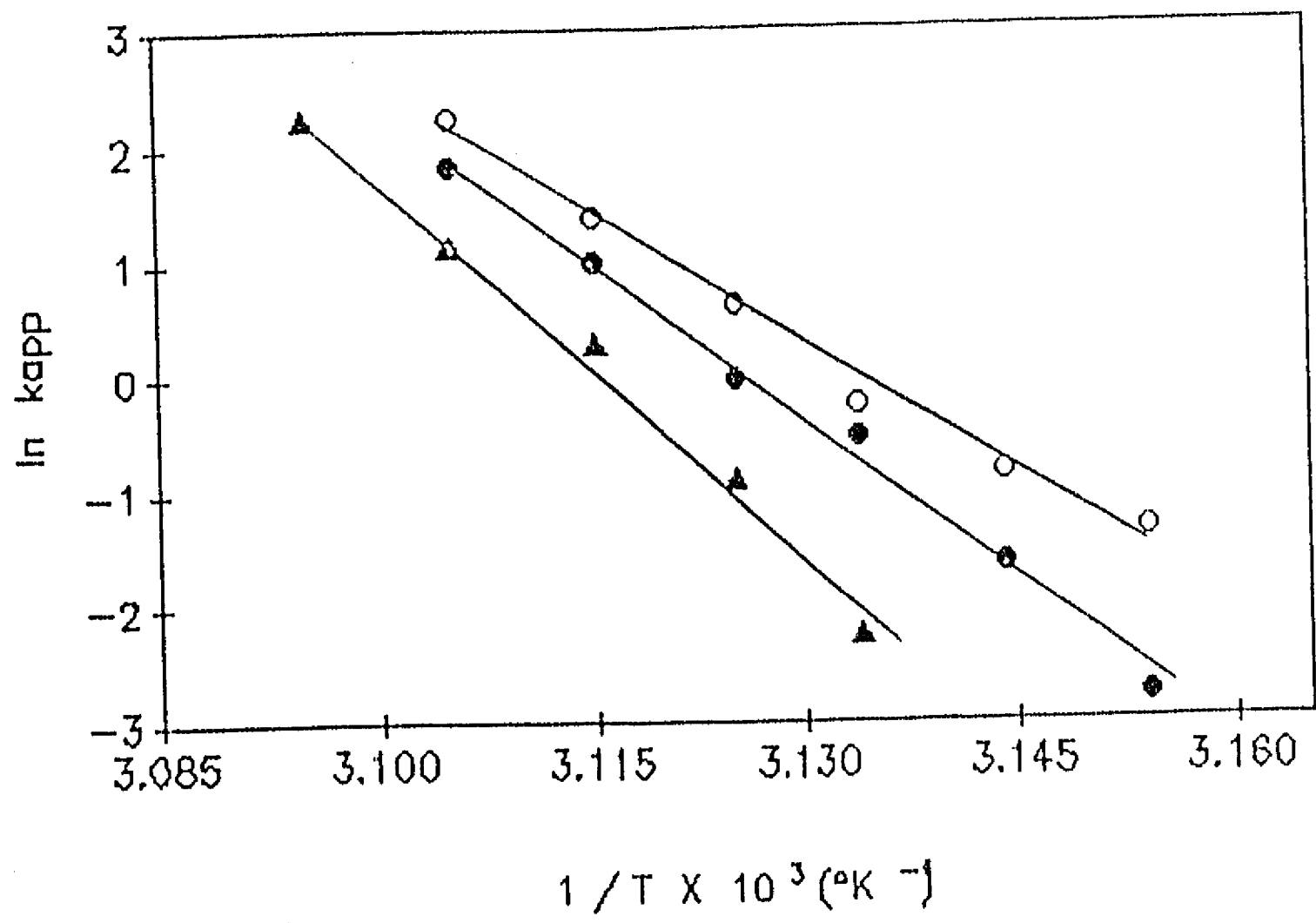
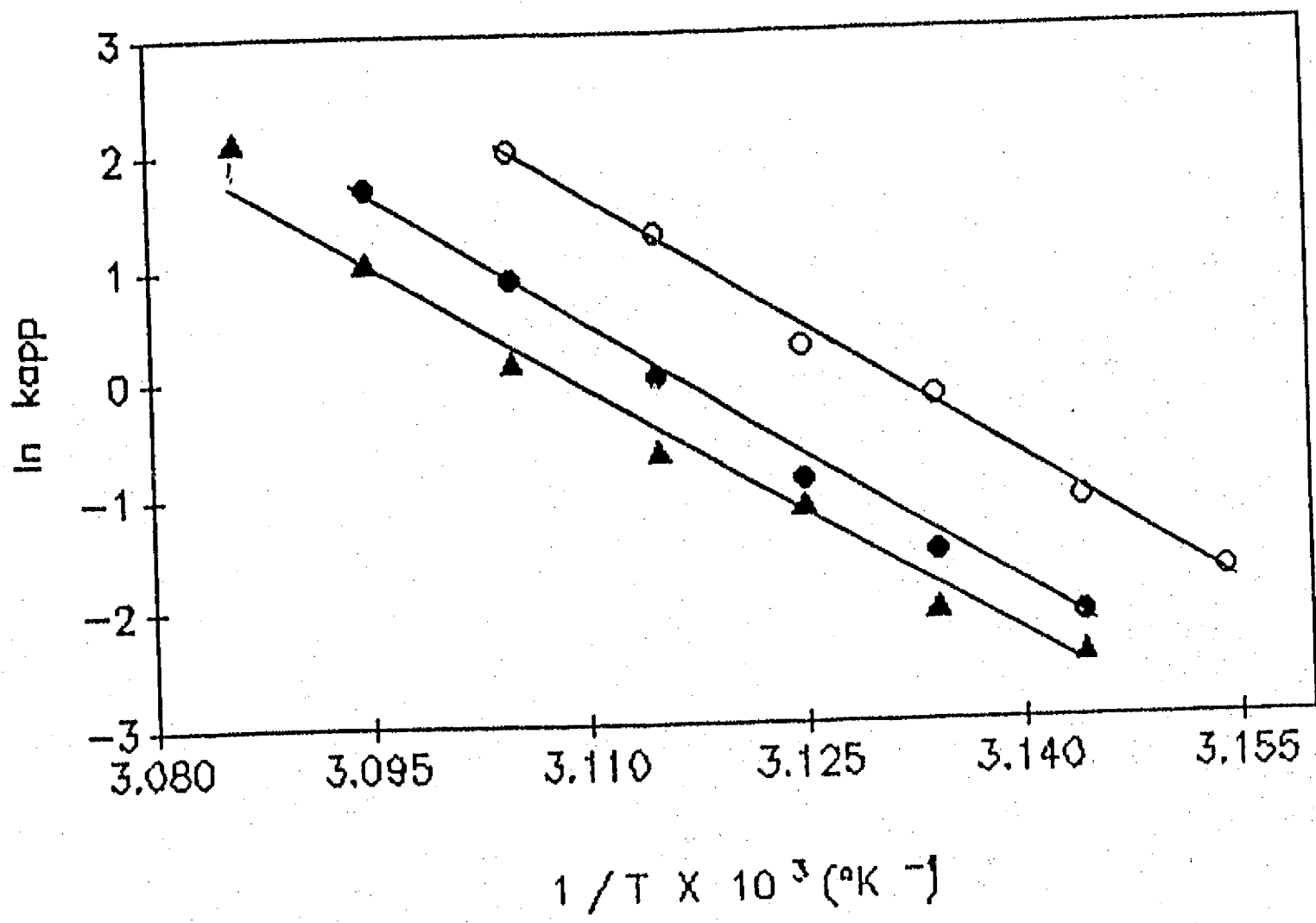


Fig. 2B



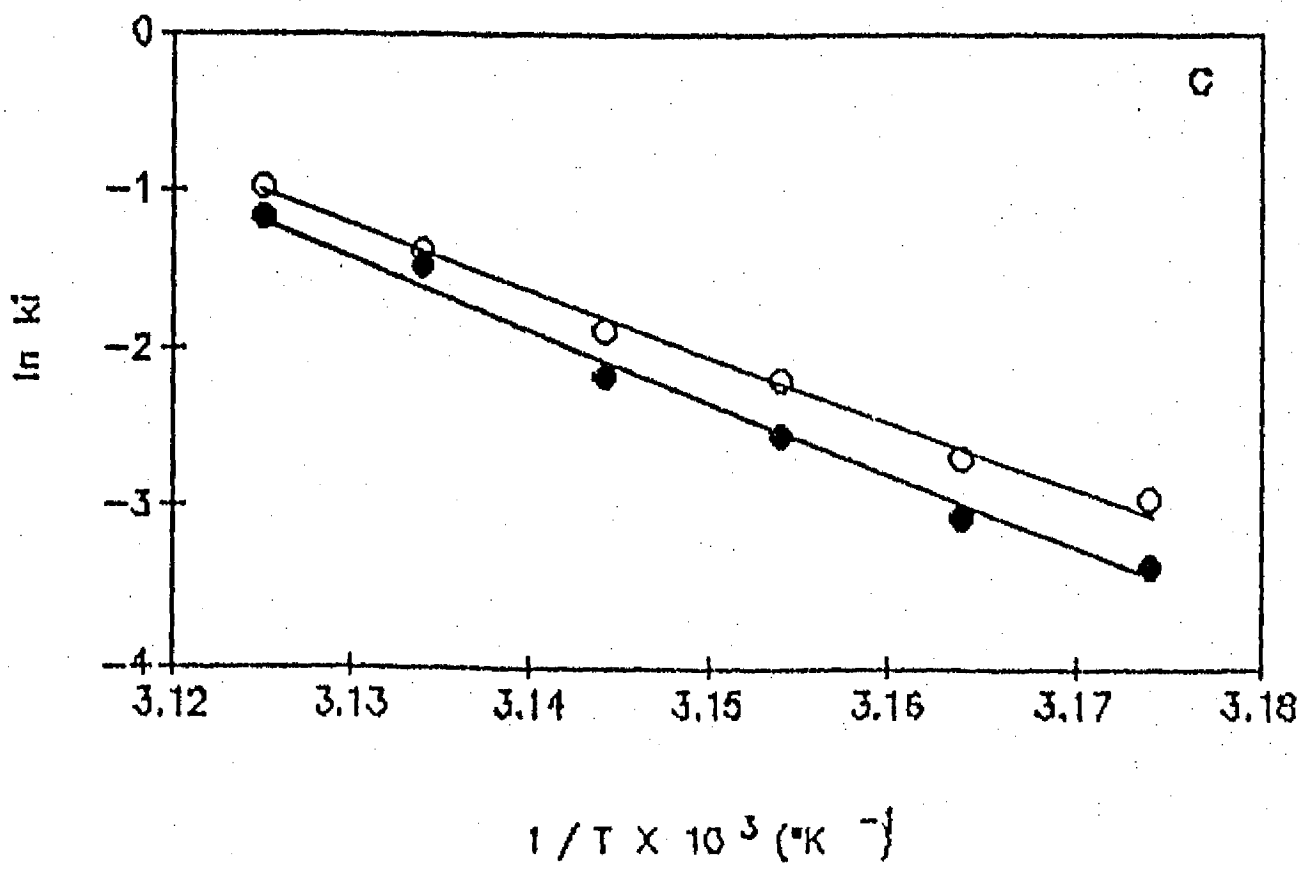
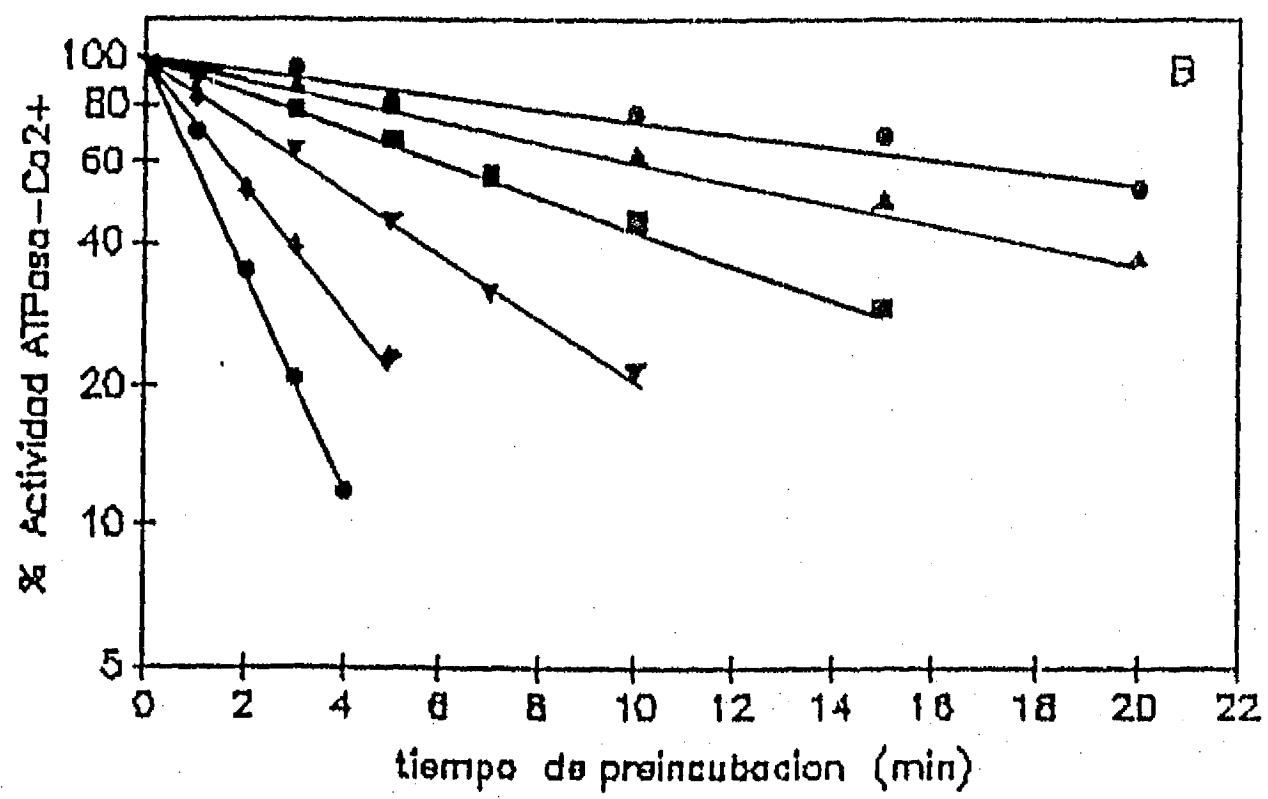
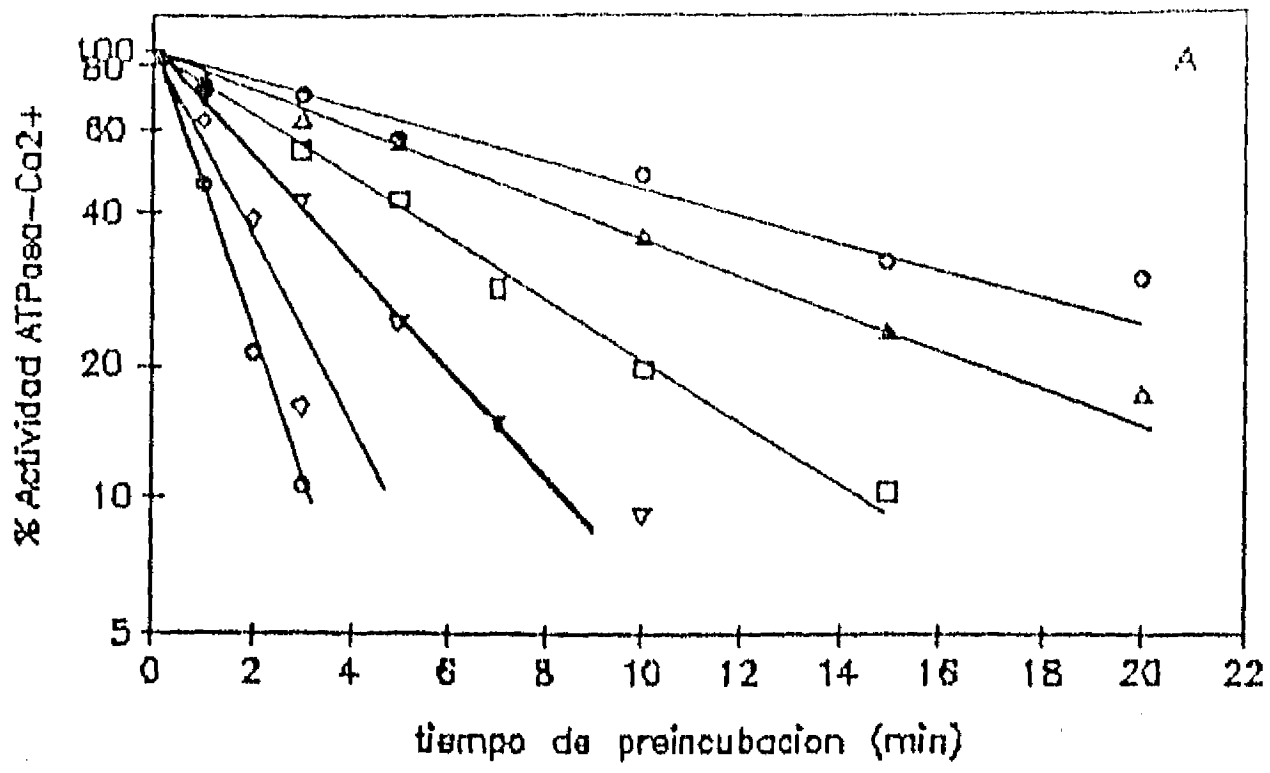
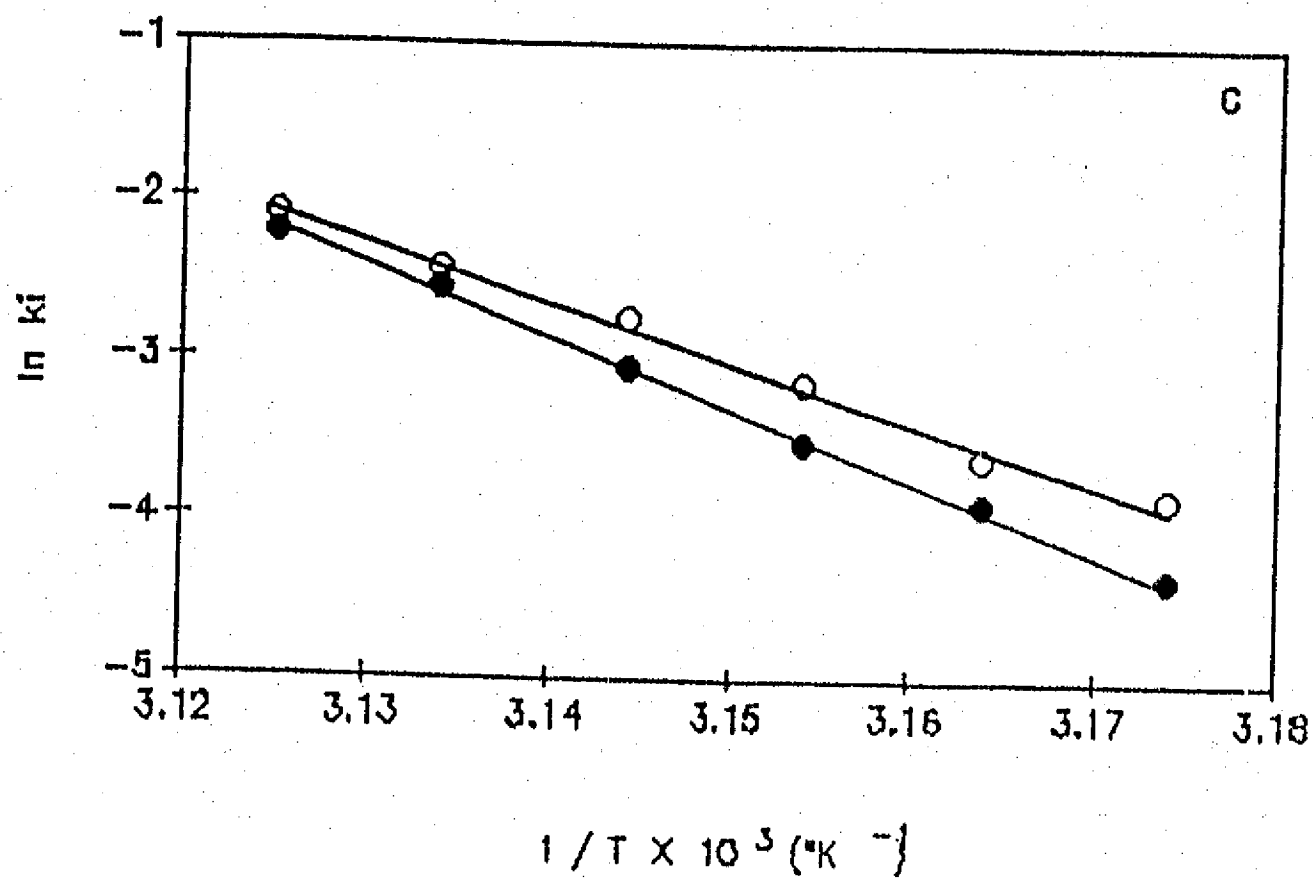
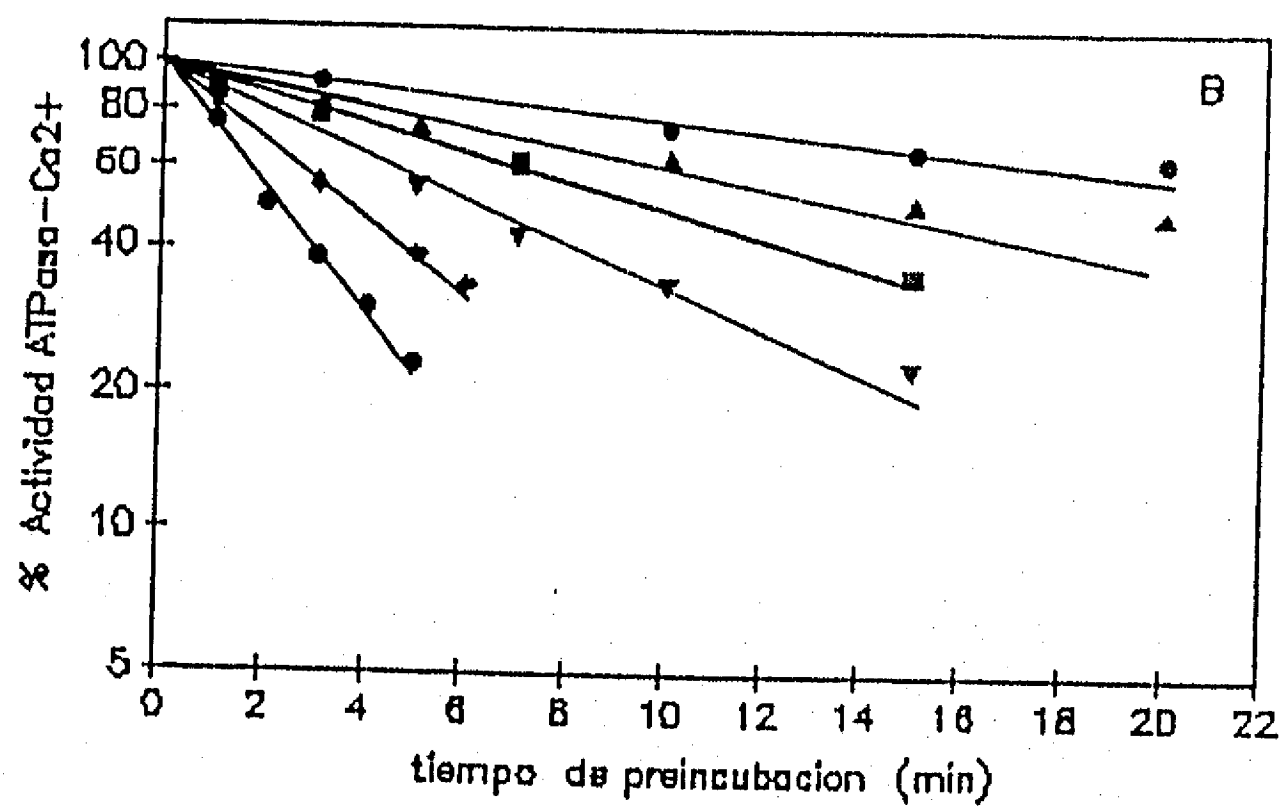
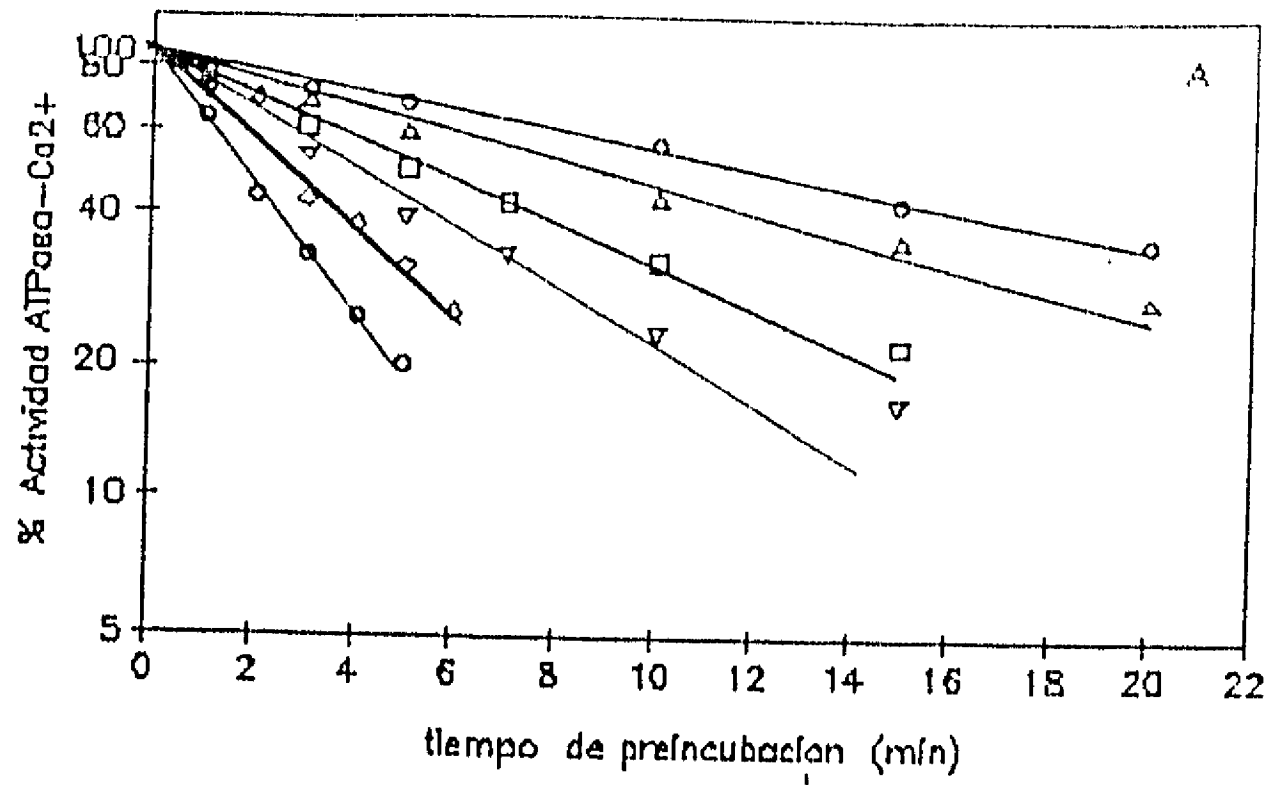


Fig 3



Fu 4

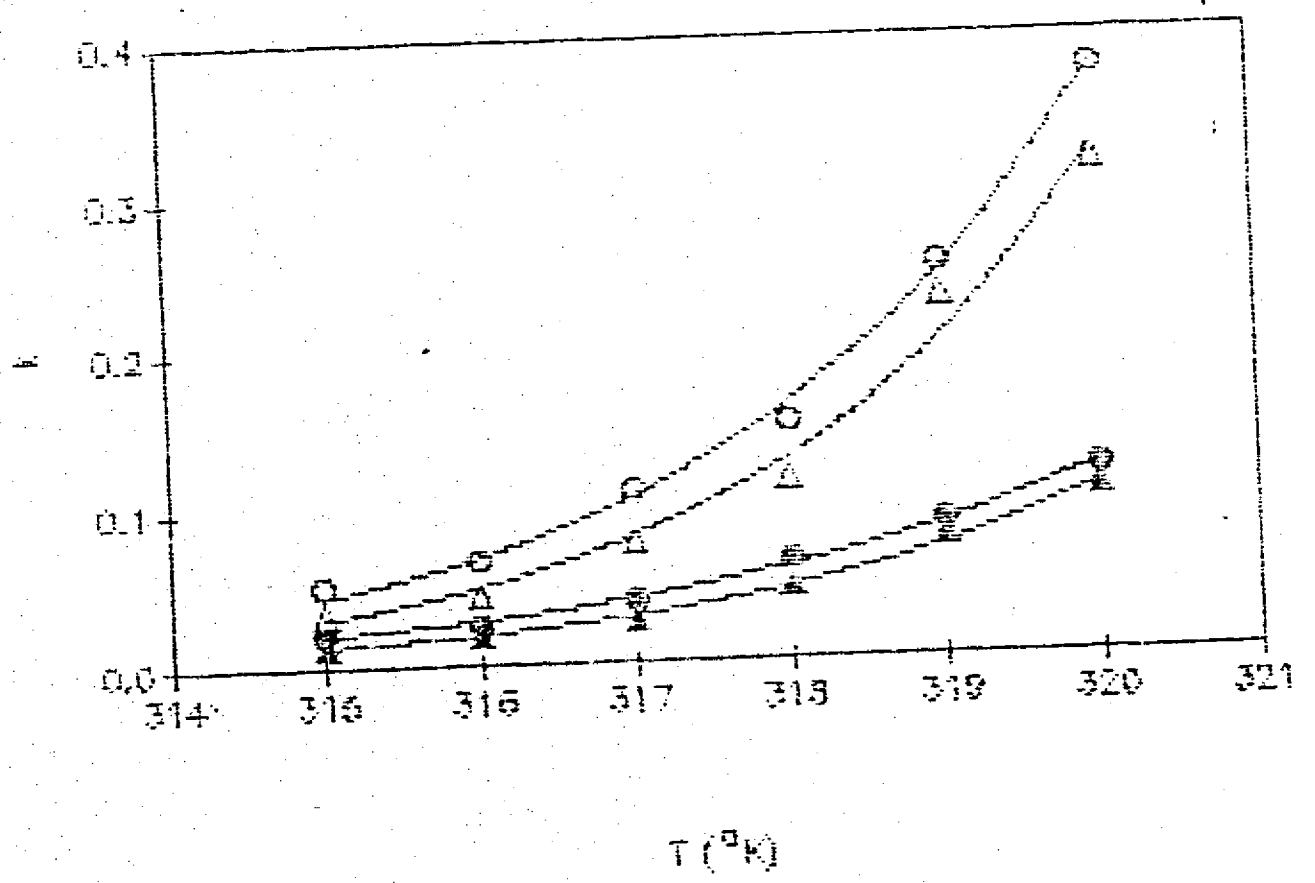
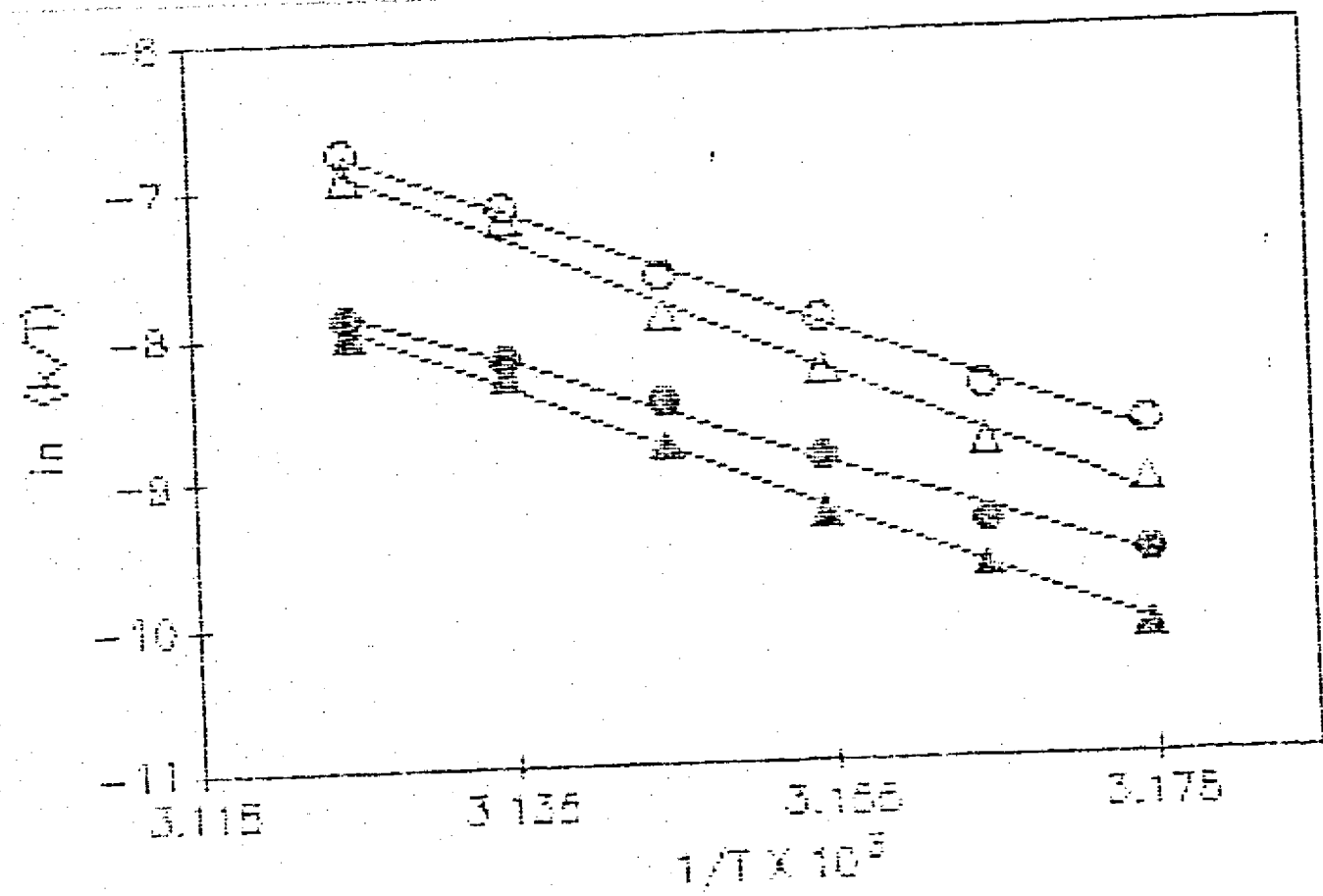


FIG. 5

Analysis of mRNA expression and cloning of a novel plasma membrane Ca²⁺-ATPase splice variant in human heart

Juan Santiago-García,^{1,2} Jaime Mas-Oliva,² Dolores Saavedra³ and Angel Zarain-Herzberg¹

¹Division of Cardiovascular Sciences, St. Boniface General Hospital Research Centre, and Department of Physiology, University of Manitoba, 351 Taché Avenue, Winnipeg, Manitoba, R2H 2A6, Canada; ²Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-243, 04510, D.F.; ³Hospital General Dr. Manuel Gea Gonzalez, Calzada de Tlalpan 4800, D.F. 14000, México

Received 29 September 1995; accepted 13 October 1995

Abstract

Four different plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) genes and three sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) genes have been previously cloned and characterized. In this study we have investigated the expression of the mRNA encoding the various PMCA and SERCA proteins in fetal and adult human heart and placenta by the reverse-transcriptase-polymerase-chain-reaction (RT-PCR) and cDNA cloning. We have found that PMCA1 and PMCA4 genes were expressed in 8-, 12- and 20-week fetal heart and in adult heart. PMCA2 gene was expressed at low levels in adult heart but was not detected in fetal heart. PMCA3 mRNA was not detected in the heart nor placenta. In contrast, the mRNA encoding SERCA2a, SERCA2b and SERCA3 were expressed in all cardiac developmental stages. Multiple alternatively spliced mRNA transcripts which differ at splice site A and B/C of the PMCA1, PMCA2 and PMCA4 genes were detected in the human heart. Interestingly, a novel tissue specific variant of the PMCA4 gene was detected in both fetal and adult human heart but not in placenta that accounts for about 30% of the total PMCA4 mRNA variant expression. DNA sequence analysis of this novel variant revealed that it corresponds to the equivalent of the PMCA1d variant and accordingly we have named it PMCA4d. We cloned and sequenced eight cDNA inserts encoding for the PMCA1 and PMCA4 variants from a fetal human heart cDNA library confirming that these are the two main PMCA genes expressed in cardiac muscle. (Mol Cell Biochem 155: 173–182, 1996)

Key words: development, cardiac muscle, placenta, sarcoplasmic reticulum, sarcolemma, plasma membrane, PMCA, SERCA2, SERCA3, cDNA cloning, PCR

Introduction

Among the proteins involved in the movement of calcium between different compartments are the plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA), which pumps calcium from the cytosol to the extracellular space and the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) that mobilizes Ca²⁺ from the cytosol to interior of the sarcoplasmic reticulum (SR) [1, 2].

The PMCA is thought to be responsible for reestablishing the cellular calcium concentration to that found in the resting cell because it has a KD for Ca²⁺ 10-fold lower than the SR Ca²⁺ pump [1]. The SR is the major intracellular organelle that sequesters Ca²⁺ inside the myocyte and regulates the relaxation and the tension development in both skeletal and cardiac muscle [2]. Calcium uptake by the SR into the myocyte is driven by the SERCA [3]. Five different isoforms for

Address for offprints: A. Zarain-Herzberg, Division of Cardiovascular Sciences, St. Boniface General Hospital Research Centre, and Department of Physiology, University of Manitoba, 351 Taché Avenue, Winnipeg, Manitoba, R2H 2A6, Canada

SERCAs have been identified and are encoded by three distinct genes: fast-twitch (SERCA1) [4–6], slow-twitch/cardiac (SERCA2) [7–9], and SERCA3 that is expressed in most tissues but predominantly in endothelial vascular cells [10–12]. The SERCA2 gene encodes two distinct Ca²⁺-ATPases generated by alternative splicing, one expressed mainly in cardiac and slow-twitch muscle (SERCA2a), and the other in smooth muscle and non-muscle tissues (SERCA2b) [8, 9]. Similar to the situation for the SERCA genes, PMCA differentiation-specific isoform expression has been recently described. The PMCA genes are encoded for by at least four genes, and each primary transcript can be alternatively spliced to yield several different proteins from the same gene [13–22].

Two major splice sites have been identified near or including the main regulatory sites of the PMCA, one adjacent to the amino-terminal phospholipid-responsive region (site A), and other within the carboxyl-terminal calmodulin (CaM) binding domain (site C) [1]. In this study we have analyzed the mRNA expression of the various variants encoded by the hPMCA genes 1, 2, 3 and 4 at splice sites A and B/C, and of the SERCA 2a, 2b, and 3 isoforms from 8-, 12- and 20-week-old human fetal hearts as well as from human adult heart and placenta. In addition, we report the presence of a novel tissue specific variant named hPMCA4d.

Materials and methods

RNA preparation and analysis

Heart tissue was obtained from autopsy material of 8, 12 and 20 week-old human fetus few hours after death (M. Gea Gonzalez General Hospital, México, D.F.). Right atrial appendages were collected from surgical human adult patients (kindly provided by Dr. E. Pascoe, St. Boniface General Hospital, Winnipeg, Manitoba, Canada). The human placenta cDNA was obtained from the 5'-AmpliFINDER-RACE kit (Clontech, Palo Alto, CA). Tissues were quickly frozen in liquid nitrogen. Total cellular RNA was isolated from myocardial tissue by the guanidine thiocyanate method [23]. The integrity of the total RNA was verified by electrophoresis on agarose-formaldehyde gels [24]. Poly(A)⁺ mRNA was isolated from 100 µg of total RNA using para-magnetic oligo dT-Dynabeads following the manufacturer's recommendations (Dyna, Inc., Oslo, Norway).

RT-PCR mRNA analysis

First-strand cDNA synthesis was performed by reverse transcriptase (RT) using 1–2 µg of poly(A)⁺ mRNA and random hexamer synthetic oligonucleotides as primers. Briefly,

mRNA was incubated at 65°C for 3 min and 40 pmol of hexamer primers were added. First strand cDNA synthesis and purification was performed according to the 5'-AmpliFINDER-RACE kit (Clontech, Palo Alto, CA), following the manufacturer's recommendations. The purified cDNA was resuspended in 100 µl of DEPC treated water. The polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed by adding 1 µl of purified cDNA to 95 µl of a reaction mixture containing the following: 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.01% gelatin, 0.2 mM of each dNTP, a trace of α-[³²P]dCTP (1 µCi) and 1 U of Taq polymerase (Life Technologies, Inc.). The samples were overlaid with one drop of silicon oil, heated at 82°C for 1 min ('hot-start') and 10 pmol of each of the indicated specific PCR primer pairs were added (see Table 1), then subjected to 35 cycles (94°C for 45 sec, 55°C for 45 sec, and 72°C for 2 min) of amplification using a thermal cycler SCS-2 (Stratagene, CA) with a final extension step at 72°C for 10 min. The PCR amplification DNA products were fractionated by electrophoresis using 2% agarose gels. The gels were dried, exposed to Dupont Reflexion NEF-496 film, and the [³²P]-labeled PCR products were quantified from the autoradiographies by densitometric scanning. The primer pairs used for PCR are shown in Table 1. For the 8-week human fetal heart, 2.5 µg of total RNA in a final volume of 40 µl was reverse transcribed using a Gene Amp RNA PCR kit (Perkin Elmer Cetus), following the manufacturer's recommendations. One-tenth of the first strand cDNA mixture (4 µl) was used for PCR as indicated above.

Screening of a human fetal heart cDNA library

Approximately 1 × 10⁶ independent clones of a human 22-week-old fetal heart cDNA library in the vector lambda gt11 (Clontech, Palo Alto, CA) were screened by the hybridization protocol [24] using [³²P]-labeled cDNA fragments containing the full length coding region of the rat PMCA2 isoform (kindly provided by Dr. Gary Shull, University of Cincinnati) [16]. Briefly, nitrocellulose replica filters (Schleicher & Schuell) were pre-hybridized for 8–10 h at 42°C in a solution containing 50% formamide, 5 × SSPE, 5 × Denhart's solution, 0.1% SDS, and 100 µg/ml of denatured salmon sperm DNA. Filters were then hybridized for 12 h with a mixture of Pst I-Pst I restriction fragments 3969, 1956 and 842 bp from the rat PMCA2 cDNA [16], labeled by random priming extension with α-[³²P]-dCTP. After hybridization, the filters were washed two times for 20 min at 42°C in 2 × SSC, 0.1% SDS, and then two times for 30 min each at 65°C with 0.2 × SSC, 0.1% SDS. The filters were then subjected to autoradiography and examined for hybridization signals. Positive recombinant clones were isolated, amplified and analyzed by Southern blotting using [³²P]-labeled cDNA fragments as probes, as previously described [24]. The posi-

Table 1. Information of primers used for PCR experiments

Primer sequence	Position	Splice site	Reference
5'-CAGGTACTCATGTAAGGGAAGGCTC-3'	785-809 (F)	1 A	[20]
5'-CACTCTTCAATGGCTGCATTCC-3'	1015-993 (R)	1 A	[20]
5'-GGAAGAAATGCTCCTTTGCATG-3'	2875-2896 (F)	1 B/C	[20]
5'-TCGGCATCAGTGTCAATAAGG-3'	3503-3480 (R)	1 B/C	[20]
5'-ATGAAAGCTCCCTAACTGGAGAGTC-3'	710-734 (F)	2 A	[26]
5'-AGGTGTCCACAGTGAAGTAGAGCAC-3'	1261-1237 (R)	2 A	[26]
5'-CGCAATGTCTTTGACGGCATC-3'	3058-3078 (F)	2 B/C	[26]
5'-ATTGTTGCTCGTTGCTGCTTG-3'	3843-3823 (R)	2 B/C	[26]
5'-GGGGTCAATGAGGATGACGAAG-3'	862-883 (F)	4 A	[17]
5'-GTGATGCCGATGATGAAGAACTTG-3'	1244-1221 (R)	4 A	[17]
5'-CGCAACATTATCTTCTGCTCTGTAGTCTTGG-3'	2977-3007 (F)*	4 B/C	[17]
5'-GGATGGACTTTTGGTTGTAGGGTTTC-3'	3382-3357 (R)*	4 B/C	[17]
5'-TGTCGAACCCTTGCCACTCATC-3'	2847-2868 (F)	SERCA2a/b	[9]
5'-GCCTCATTCTTGCAGCAAAG-3'	3272-3250 (R)	SERCA2a	[9]
5'-ACCTCCATCACCAGCCAGTATG-3'	3408-3387 (R)	SERCA2b	[9]
5'-CGCCTGTAACACGGTCATCAAG-3'	49-70 (F)	SERCA3	[12]
5'-TGCAGTACACGGACATGGATTTC-3'	137-115 (R)	SERCA3	[12]
5'-TGAAGGTCCGAGTCAACGGATTTGGT-3'	71-96 (F)	GAPDH	[25]
5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'	1030-1053 (R)	GAPDH	[25]

*For subcloning of PMCA4 PCR products, primers containing an EcoRI linker (5'-CTGGAATTC-3') were used.

tive cDNA fragments were subcloned into the EcoRI site of pTZ18R vector (Pharmacia), and sequenced by the dideoxy chain termination method using double strand sequencing kit (Life Technologies, Inc.) and/or Sequenase 2 kit (U.S.B.).

Subcloning and sequencing of PCR products

PCR products were separated by electrophoresis in 2% agarose gel and purified from gel slices using Gene Clean II kit (Bio 101 Inc. La Jolla, CA). DNA fragments were sequenced as mentioned above. For analysis of total PCR products for the splice site B/C of PMCA4, primers containing an EcoRI-linker were used (Table 1). The resulting PCR amplification products were precipitated with ethanol, digested with EcoRI, extracted with phenol:chloroform, precipitated with ethanol and ligated into the EcoRI site of pTZ18R. Recombinant plasmids were screened for DNA inserts and subjected to DNA sequencing in both directions.

Results

PMCA splice variants at site A

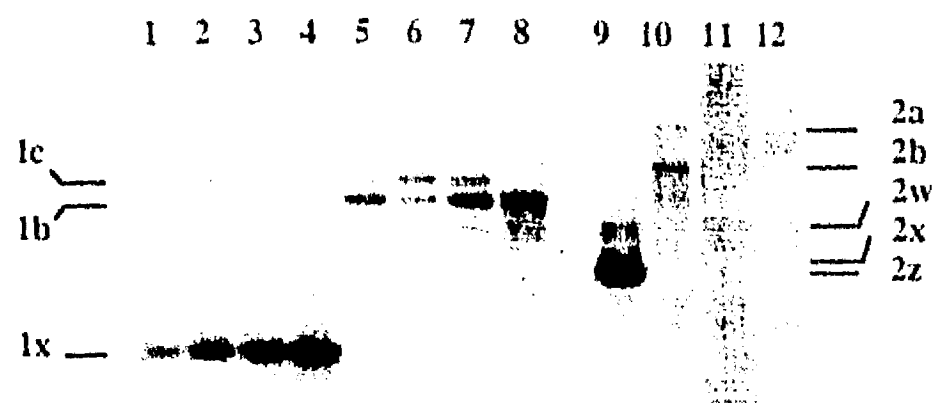
The PMCA1 transcript did not show alternative splicing at site A in heart and placenta, producing a single 231 bp fragment corresponding to variant 1x (Fig. 1A and C). Similar results have been previously reported indicating that the PMCA1 primary transcript is not spliced at site A in a variety

of tissues [18, 22, 25]. The relative amount of 1x variant in the 12-week-old fetal heart was lower compared to the adult heart and placenta (Fig. 1A). PMCA2 mRNA was not detected in 8-, 12-, and 20-week-old human fetal heart (Fig. 1C and data not shown). In contrast, PCR analysis of adult atrial tissue revealed the three splice variants at site A, showing fragments of 417, 459, and 552 bp (Fig. 1A). The above fragments corresponded to inclusions of 0 bp (2z-variant), 42 bp (2x-variant), or 135 bp (2w-variant), respectively. In contrast, placenta did not express any PMCA2 transcripts. Previous work has shown that in the PMCA2 variants only the 42 bp exon was inserted separately, whereas those of 60 and 33 bp were always used together with the 42 bp exon [26]. The relative amounts of 2z, 2x, and 2w variants in the adult human heart were expressed at ratios 53:29:18, respectively (Fig. 1A). Noteworthy, the PMCA3 mRNA was not detected using primers for site A indicating that this gene was not expressed in heart and placenta (data not shown). PCR analysis of the PMCA4 at site A revealed that the splice variant 4x (383 bp), and 4z (347 bp) which lacks a 36 bp exon, were expressed at 50:50 ratio in adult heart, and in 8-week fetal heart (Fig. 1B and C). In contrast, 12- and 20-week fetal heart expressed the 4z and 4x variants at a ratio 64:36 and 57:43, respectively (Fig. 1B). On the other hand placenta showed only the 4x variant.

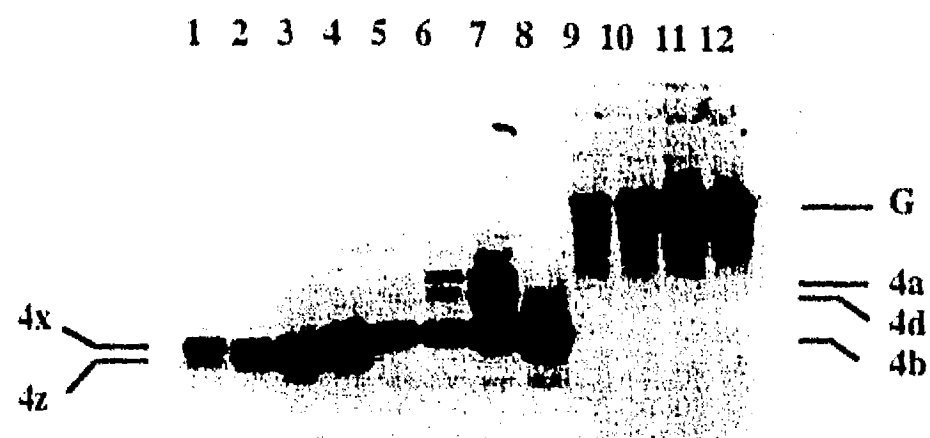
PMCA splice variants at site B/C

For the PMCA1 gene, PCR amplification of heart mRNAs with primer pairs for the splice site B/C yielded two abundant fragments of 629 and 716 bp, corresponding to the splice

A



B



C

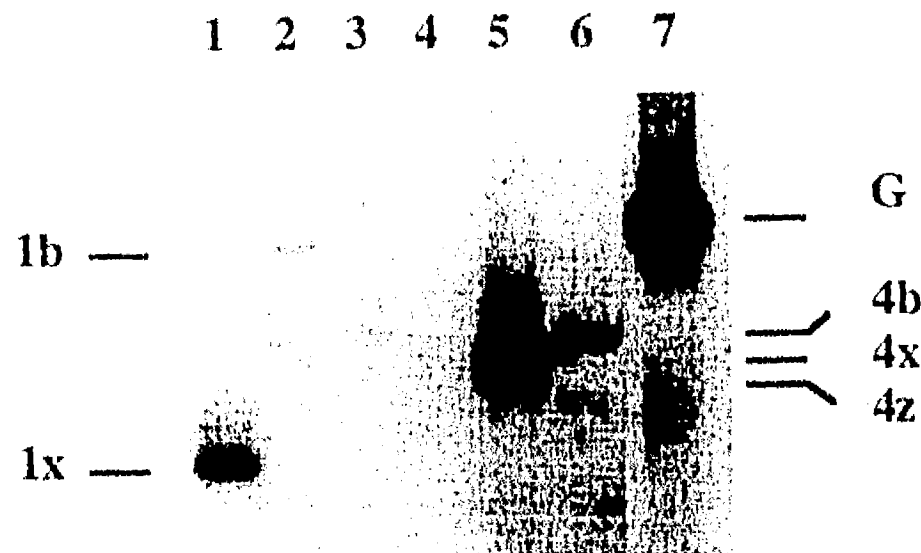


Fig. 1. PCR analysis of the PMCA splice variants in different developmental stages of human heart and in placenta. Poly(A)⁺ RNA from each of the indicated human tissues was reverse transcribed and used for PCR analysis as described under 'Materials and methods'. A) PCR products produced by amplification using primers for PMCA1 and PMCA2 at splicing sites A and B/C. Lanes 1-4, primers for PMCA1 site A; lanes 5-8, primers for PMCA1 splicing site B/C; lanes 9 and 11, primers for the PMCA2 splicing site A; lanes 10 and 12, primers for the PMCA2 site B/C. The tissues analyzed were: 12-week human fetal heart (lanes 1 and 5); 20-week human fetal heart (lanes 2 and 6); adult human heart (lanes 3, 7, 9 and 10); and human placenta (lanes 4, 8, 11 and 12). B) PCR products produced by amplification using primers for PMCA4 at splicing sites A and B/C and GAPDH. Lanes 1-4, amplification of PMCA4 mRNA at site A; lanes 5-8, amplification of PMCA4 mRNA at site B/C; lanes 9-12, amplification of GAPDH mRNA used as internal control. The tissues analyzed were: 12-week human fetal heart (lanes 1, 5 and 9); 20-week human fetal heart (lanes 2, 6 and 10); adult human heart (lanes 3, 7 and 11); and human placenta (lanes 4, 8 and 12). C) PCR analysis of the splice variants for PMCA1, PMCA2, and PMCA4 at sites A and B/C in 8-week human fetal heart using various primer pairs. Lane 1, PMCA1 site A; lane 2, PMCA1 site B/C; lane 3, PMCA2 site A; lane 4, PMCA2 site B/C; lane 5, PMCA4 site A; lane 6, PMCA4 site B/C; and lane 7, GAPDH. The position of the variants in the gel are indicated. The nucleotide sequence and position of the primers used in these experiments are indicated in Table 1.

variants 1b and 1c respectively, but only the splice variant 1b in the case of human placenta (Fig. 1A). In the 8-week fetal heart the only variant detected was 1b (Fig. 1C), whereas in the 12- and 20-week-old fetal hearts and adult heart the splice variants 1b and 1c were expressed at ratios 80:20, 46:54, and 68:32, respectively (Fig. 1A). Figure 1A also shows the PCR analysis for PMCA2 at site B/C and revealed two fragments one of 786 bp (2a-variant) and one of 559 bp (2b-variant) that lacks the 207 bp exon C at a ratio of 16:84, respectively. Figure 1A, B and C shows that the PCR products corresponding to variants PMCA 1b and 4b were constitutively expressed in fetal, adult heart and placenta, whereas variant 1c was observed only in cardiac tissue. Previous evidence demonstrated that splice variant 4a containing a 178 bp exon insertion, and

variant 4b lacking of that exon were expressed in a variety of tissues including heart [18, 22, 25]. Our PCR results using the primer pairs for splice at site B/C of PMCA4 showed three amplification products of 406 bp, 514 bp, and 584 bp in the heart, but only the 406 bp fragment in placenta (Fig. 1B). The 406 bp product corresponded to variant 4b and was expressed in 8-, 12-, and 20-week old fetal hearts as well as in adult heart and placenta (Figs. 1B and C). The 514 bp product corresponded to a new splice variant of the PMCA4 gene at site B/C, and it was present in 12- and 20-week fetal heart and adult heart but was not observed in 8-week fetal heart and placenta (Figs. 1B and C). The 584 bp product corresponding to the 4a variant was increasingly expressed in 12-, and 20-week fetal heart and in adult heart. The ratio of expression of the variants

4b, 4a and the new variant 4d (see below) was 81:8:11 in 12-week, 59:22:19 in 20-week fetal hearts and of 42:30:28 in the adult heart, respectively. The new splice variant and the 4a variant were not expressed in the 8-week fetal heart (Fig. 1C) and at very low levels in the 12-week fetal heart (Fig. 1B).

Because a third splice variant for the PMCA4 at site B/C has not been described in rat and human tissues [18, 22, 25], we decided to amplify, subclone and sequence the three DNA fragments using a set of primers containing an EcoRI-linker (Table 1). DNA sequence analysis demonstrated that the 406 bp fragment contained the complete exon (108 bp) spliced at site B and lacked of the alternatively spliced 178 bp exon at site C, therefore corresponding to variant 4b. The 584 bp fragment contained the exon at splice site B (encoding transmembrane domain 10) and the full length exon C (178 bp), thus corresponding to variant 4a. Nucleotide sequence analysis of the new PCR fragment (514 bp) demonstrated that it contained the exon at site B, spliced the exon at site C at the same acceptor site used for variant 4a but utilized an internal intron donor site located 108 bp from the beginning of exon C (Fig. 2A). This novel variant corresponded to the equivalent of the PMCA1d splice variant. Accordingly, we have named this splice variant as PMCA4d in agreement to the nomenclature previously established [16]. Figure 2B shows the deduced amino acid sequence of the amplified PCR products for variants hPMCA4a, b and d. A schematic diagram of the splicing pattern at site B/C for the PMCA4 gene is shown in Fig. 2C.

PCR amplification using primer pairs covering the splice sites B and C of PMCA4 did not reveal a product detectable by agarose gel electrophoresis for a splice variant at site B. However, direct cloning of DNA products obtained from PCR amplification mixture using primers covering the sites B and C revealed in addition to the splice variants 4a, 4b, and 4d, a DNA fragment of 476 bp which sequence lacked the region corresponding to the 108 bp exon B but included a full length exon C (178 bp) (Fig. 2A), corroborating a previous finding of cDNA clones which lacked the proposed last transmembrane segment of the enzyme (variant 4g) [27, 28].

Glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) mRNA was quantified in all tissues as internal control and showed increased level of expression during cardiac development as normalized with total RNA (Fig. 1B). In order to confirm that the amounts of the various PCR products were in the linear range of DNA synthesis, a titration curve using 1:3 to 1:100-fold cDNA dilutions was performed showing a linear rate of synthesis in function of the cDNA concentration (data not shown). Quantitative results for PMCA mRNAs have also been recently reported using a similar RT-PCR method [25].

Cloning of human fetal PMCA cDNAs

Approximately 1×10^6 independent cDNA clones from a 22-week-old human fetal heart cDNA library were screened at high stringency using $\alpha^{[32}\text{P}]$ -labeled cDNA from rPMCA2 [16]. Two positive clones were obtained, one clone (C-52) covered from nucleotide 1240–2573 of the hPMCA1 [20], and the other clone (C-35) covered from the nucleotide 2140–3530 of the hPMCA4 [17] (Fig. 3A). The cDNA of these clones was used to further screen the fetal heart library, resulting in the isolation of seven additional clones. The eight clones isolated for the hPMCA4 overlapped and covered from position 1108–3706 nt of cDNA for this isoform [17] (Fig. 3A). Interestingly, one clone (C-17) covered the region 3570–3706 nt of the hPMCA4 cDNA and included 1.3 kb of intron genomic sequence (Fig. 3B) [22]. This cDNA may be result of amplification of an incompletely processed pre-mRNA. DNA sequence comparison of clone C-17 with the human PMCA4 genomic sequence revealed complete homology at the exon/intron junction flanking sequence of splice site C [22].

Analysis of expression for SERCA2a, 2b and SERCA3 isoforms

We also analyzed the expression of the SERCA 2a, 2b, and SERCA 3 isoforms in fetal, adult heart and placenta. The results demonstrated that specific fragments corresponding to the SERCA2a (426 bp) and SERCA2b (402 bp) isoforms were expressed at all stages of heart development, although there was an increasing trend of expression for SERCA2a mRNA during fetal development (Fig. 4). In contrast SERCA2b and SERCA3 (89 bp fragment) mRNAs were expressed at relatively constant levels in all tissues examined. There was also difference in the expression level for SERCA2a and 2b isoforms between heart and placenta (Fig. 4). The level of expression of the isoform 2a was about three-fold higher in the heart compared to placenta, but expression of the isoform 2b was higher in placenta than heart in a relation close to 2:1 probably due to the high abundance of vascular smooth muscle cells. These results are in agreement to a previous study using S1 nuclease protection assay that demonstrated that SERCA2a was predominantly expressed in heart and slow-twitch skeletal muscle, whereas the SERCA2b isoform was expressed in muscle and non-muscle tissues (Lytton *et al.*, 1989). The expression of the SERCA3 was found to have similar levels of expression in all tissues tested (Fig. 4). In addition, these results indicate that the expression of SERCA genes occurs earlier than PMCA genes during cardiac muscle development.

A

↓

4a CGCAACATTATCTTCTGCTCTGTAGTCTTGGGCACATTCATCTGCCAGATTTTCATCGTGGAAATTTGGGGTAAACCCCTCAGTTGTACAAGCCTCAGCCTGTCTCAG
 4b CGCAACATTATCTTCTGCTCTGTAGTCTTGGGCACATTCATCTGCCAGATTTTCATCGTGGAAATTTGGGGTAAACCCCTCAGTTGTACAAGCCTCAGCCTGTCTCAG
 4d CGCAACATTATCTTCTGCTCTGTAGTCTTGGGCACATTCATCTGCCAGATTTTCATCGTGGAAATTTGGGGTAAACCCCTCAGTTGTACAAGCCTCAGCCTGTCTCAG
 4g CGCAACATTATCTTCTGCTCTGTAGTCTTGGGCACATTCATCTGCCAGATTTTCATCGTGGAAATTTGGGGTAAACCCCTCAGTTGTACAAGCCTCAGCCTGTCTCAG

↓

4a TGGCTGTGGTGTCTCTTCATTGGGATTGGAGAACTTCTGTGGGGCCAGTTCATCTCCGCAATACCTACCCGATCCCTGAAGTTCCTGAAGGAGGCTGGGCATGGCACC
 4b TGGCTGTGGTGTCTCTTCATTGGGATTGGAGAACTTCTGTGGGGCCAGTTCATCTCCGCAATACCTACCCGATCCCTGAAGTTCCTGAAGGAGGCTGGGCATGGCACC
 4d TGGCTGTGGTGTCTCTTCATTGGGATTGGAGAACTTCTGTGGGGCCAGTTCATCTCCGCAATACCTACCCGATCCCTGAAGTTCCTGAAGGAGGCTGGGCATGGCACC
 4g -----TTCATCTCCGCAATACCTACCCGATCCCTGAAGTTCCTGAAGGAGGCTGGGCATGGCACC

↓

4a ACCAAAGAGGAGATCACCAAGGATGCCGAGGGACTGGATGAGATTGACCATGCTGAGATGGAGCTGCCCGAGGCCAGATCCTCTGGTTCCGGGGCCTGAACCGTATC
 4b ACCAAAGAGGAGATCACCAAGGATGCCGAGGGACTGGATGAGATTGACCATGCTGAGATGGAGCTGCCCGAGGCCAGATCCTCTGGTTCCGGGGCCTGAACCGTATC
 4d ACCAAAGAGGAGATCACCAAGGATGCCGAGGGACTGGATGAGATTGACCATGCTGAGATGGAGCTGCCCGAGGCCAGATCCTCTGGTTCCGGGGCCTGAACCGTATC
 4g ACCAAAGAGGAGATCACCAAGGATGCCGAGGGACTGGATGAGATTGACCATGCTGAGATGGAGCTGCCCGAGGCCAGATCCTCTGGTTCCGGGGCCTGAACCGTATC

↓

4a CAGACTCAGATCGACGTAATTAACACATTCAGACGGGAGCCTCTTTTAAGGGAGTCTAAGGCGACAGAACAATGGGTCAACACCTTGATGTAAAACCTTGTTCCTAGT
 4b CAGACTCAG-----
 4d CAGACTCAGATCGACGTAATTAACACATTCAGACGGGAGCCTCTTTTAAGGGAGTCTAAGGCGACAGAACAATGGGTCAACACCTTGATGTAAAACCTTGTTCCTAGT
 4g CAGACTCAGATCGACGTAATTAACACATTCAGACGGGAGCCTCTTTTAAGGGAGTCTAAGGCGACAGAACAATGGGTCAACACCTTGATGTAAAACCTTGTTCCTAGT

↓

4a TCATCCTATGTAGCAGTTGCACCAGTCAAATCTTCCCCACCCTTCTGTTCCCTGCTGTTTCATCTCCTCCTATGGGCAATCAAAGTGGTCAAAGCGTTCCATAGTTC
 4b -----ATCAAAGTGGTCAAAGCGTTCCATAGTTC
 4d TCATCCTAT-----ATCAAAGTGGTCAAAGCGTTCCATAGTTC
 4g TCATCCTATGTAGCAGTTGCACCAGTCAAATCTTCCCCACCCTTCTGTTCCCTGCTGTTTCATCTCCTCCTATGGGCAATCAAAGTGGTCAAAGCGTTCCATAGTTC

↓

4a CCTCCACGAAAGCATTCAAGAACCTACAACCAAAAGTCCATCC
 4b CCTCCACGAAAGCATTCAAGAACCTACAACCAAAAGTCCATCC>>
 4d CCTCCACGAAAGCATTCAAGAACCTACAACCAAAAGTCCATCC>>
 4g CCTCCACGAAAGCATTCAAGAACCTACAACCAAAAGTCCATCC

B

4a RNIIFCSVVLGTFICQIFIVEFGGKPFSCSTLSLSQWLWCLFIGIGELLWQFISAIPTPSLFLKEAGHGTTKEEITKDAEGLDEIDHAEMELRRGQILWFRG
 4b RNIIFCSVVLGTFICQIFIVEFGGKPFSCSTLSLSQWLWCLFIGIGELLWQFISAIPTPSLFLKEAGHGTTKEEITKDAEGLDEIDHAEMELRRGQILWFRG
 4d RNIIFCSVVLGTFICQIFIVEFGGKPFSCSTLSLSQWLWCLFIGIGELLWQFISAIPTPSLFLKEAGHGTTKEEITKDAEGLDEIDHAEMELRRGQILWFRG
 4g RNIIFCSVVLGTFICQ-----FISAIPTPSLFLKEAGHGTTKEEITKDAEGLDEIDHAEMELRRGQILWFRG

M 10 CaM "A"

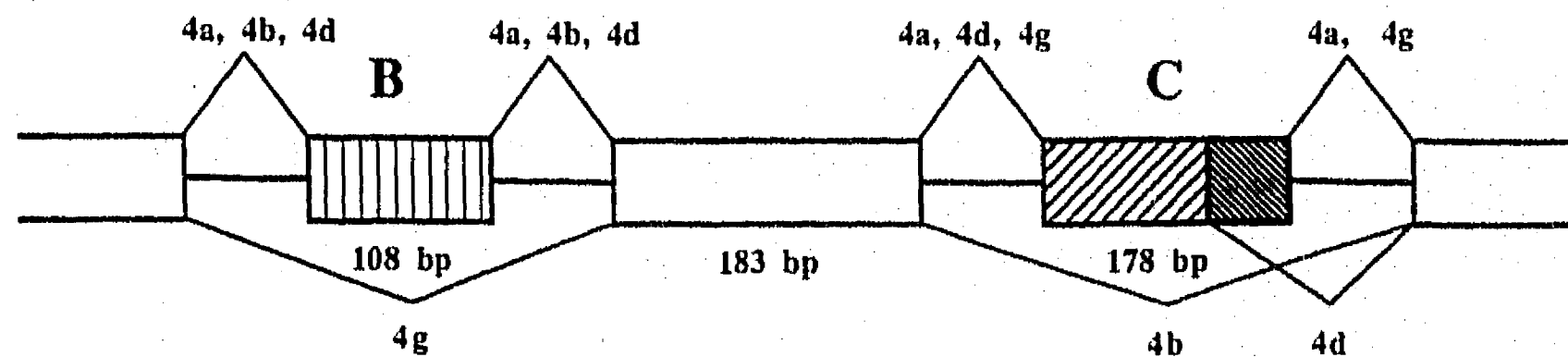
A

4a LNRIQTQIDVINTFQTGASFKGLRRQNMQHLDVLPSSSYVAVAPVKSSPTTSVPAVSSPPMGNQSGQSV*
 4b LNRIQTQ-----IKVVKAFHSSLHESIQKPNQKSIHSEMTHPFALEEE
 4d LNRIQTQIDVINTFQTGASFKGLRRQNMQHLDVLPSSSY-----IKVVKAFHSSLHESIQKPNQKSI
 4g LNRIQTQIDVINTFQTGASFKGLRRQNMQHLDVLPSSSYVAVAPVKSSPTTSVPAVSSPPMGNQSGQSV*
 PKC CaM "B"

A

4b LPRTPLLEEEENPKASKGTRVLLLDGEVTPYANTMNAVDCNOVOLPOSDSSLOSLETSV*
 CAMP-R

C



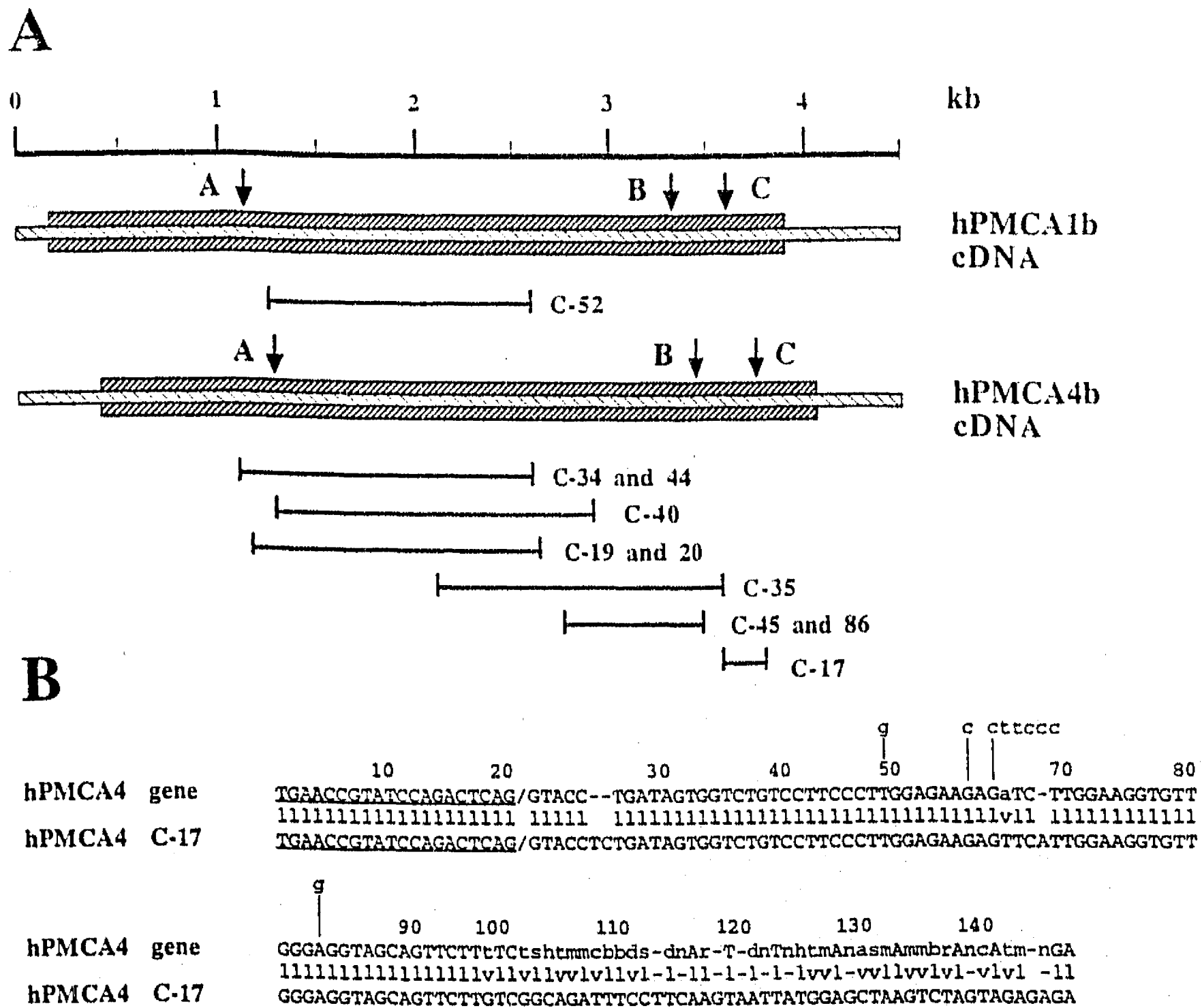


Fig. 3. Cloning strategy, mapping and sequencing of human fetal heart PMCA cDNA clones. A 22-week-old human fetal heart library in the lambda phage gt11 was screened using a full length rat PMCA2 cDNA as probe [16]. A) Schematic representation of the cDNA clones isolated for hPMCA1 and hPMCA4. The cDNA coding sequence is represented by double shaded bars. The splice sites A, B and C are indicated by arrows. The length and position of the cDNA clones isolated are indicated by solid lines. B) Nucleotide alignment of a human genomic clone ([22] and Genebank accession number M83365) and the cDNA clone C-17 was performed by a sequence homology matrix algorithm using the MacVector sequence analysis software. Nucleotide sequence of the cDNA coding sequence at positions 3687 to 3706 of the hPMCA4b cDNA [22] is indicated by underlined capital letters. A diagonal line indicates the intron/exon junction. The nucleotide sequence sharing identity between both sequences is indicated by a (I), and without identity by a (v). Regions of ambiguity within the genomic clone are indicated by lower case letters using the IUPAC-IUB code. The position of the nucleotide sequence gaps within the hPMCA4 genomic clone are indicated by lower case letters on-top of the aligned sequence. The nucleotide sequences for clone C-17 has been submitted to GenBank with accession number U42379.

Fig. 2. Alignment of the splice variants at sites B and C of hPMCA4. A) Nucleotide sequence of the PCR fragments of variants hPMCA4a, hPMCA4b, hPMCA4d and hPMCA4g containing the splice sites B and C. The nucleotide sequence corresponding to the primer pairs used for PCR amplification is underlined. The splice sites for exons B and C are indicated by arrows. The stop codon (TAG) and the internal intron donor sequence (GTA) within exon C are in bold letters. B) The deduced amino acid sequence of the PCR amplification products shown in panel A. The transmembrane amino acid domain M-10, CaM 'A' and CaM 'B', as well the acidic and basic amino acid domains are boxed. The carats indicate the putative Thr and Ser phosphorylatable residues for PKC and cAMP-K respectively. The underlined deduced amino acid sequence of the carboxyl terminal region of variant 4b was obtained from the previously reported sequence [22]. Asterisks designate stop codons. C) Scheme of splicing patterns for hPMCA4 at sites B and C. The organization of exons at the carboxyl-terminal region of the PMCA4 gene is represented by boxes. The exon spliced in the different variants are indicated by shaded bars and the size of exons B and C is indicated under the boxes. Diagonal lines indicate the splicing pattern for the corresponding variants. The nucleotide and amino acid sequences for the variants 4a, 4b, 4d and 4g have been submitted to GenBank with accession numbers U42061, U42026, U42378 and U42062, respectively.

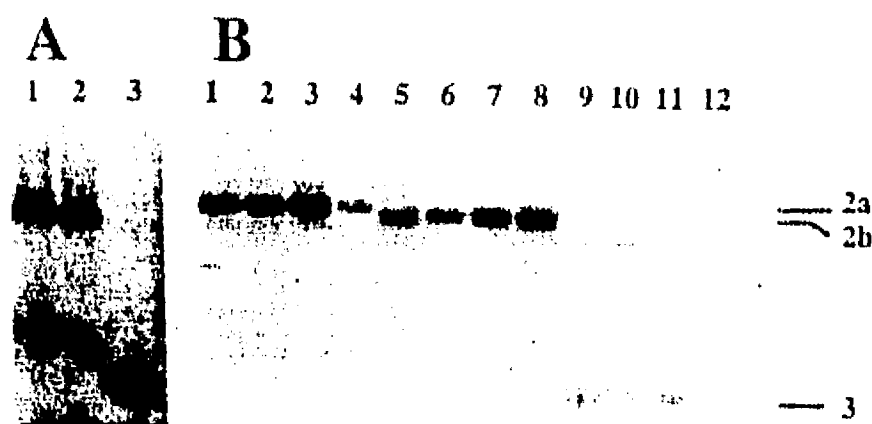


Fig. 4. PCR analysis of the expression pattern of SERCA isoforms, 2a, 2b and 3 during human heart development. Poly(A)⁺ RNA from each indicated human tissue was reverse transcribed and used for PCR analysis as described under 'Materials and methods'. A) PCR analysis of the expression of SERCA2a, SERCA2b, and SERCA3 in 8-week human fetal heart. Lane 1, amplification of SERCA2a mRNA; lane 2, amplification of SERCA2b mRNA; and lane 3, amplification of SERCA3 mRNA. B) PCR analysis of the expression of SERCA2a, SERCA2b, and SERCA3 in 12, 20-week fetal and adult heart and in placenta. Lanes 1–4, amplification of SERCA2a mRNA; lanes 5–8, amplification of SERCA2b mRNA; lanes 9–12, amplification of SERCA3 mRNA. The tissues analyzed were: 12-week human fetal heart (lanes 1, 5 and 9); 20-week human fetal heart (lanes 2, 6 and 10); adult human heart (lanes 3, 7 and 11); and human placenta (lanes 4, 8 and 12).

Discussion

In animal tissues the predominant variants of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase which have been shown to be constitutively expressed are PMCA 1b and 4b [18, 22, 25]. However, in specialized tissues like muscle additional spliced isoforms are expressed, and these seem to be regulated during development. Therefore, alternative splicing of PMCA mRNAs may be contingent on the developmental and physiological state of the muscle tissue. Our results demonstrate that in human cardiac muscle, in addition to PMCA 1b and 4b, the other alternatively spliced forms at site C of the PMCA mRNAs expressed are PMCA 1c, 4a and 4d. Alternative splicing at site C occurs in all four PMCA genes and leads to variations in both the CaM-binding domain and carboxyl terminus. However, the complexity of the splicing options and the number of exons involved vary among them. The variant-specific mRNAs 1b, 2b, 3b and 4b lacking the alternative exon in region C encode an amino acid sequence with several positively charged residues, and are presumed to have a higher CaM-binding affinity and may have a lower pump activity in the absence of the CaM compared with isoforms which include the complete exon C and produce the splicing product 'a' of PMCA variants 1–4 [1]. The splice acceptor site for exon C is identical for all four PMCA genes, but in the various variants it can be spliced to two or three different donor sites. Alternative mRNA splicing involving exon C produces four possible splice variants ('a–d') of the human PMCA1 gene [1]. It has been found that the mRNAs for

PMCA variants 1c, 1d, and 4a are newly expressed during myogenesis [29–31]. In agreement with the above observation, we have identified the expression of a new variant at site C in human cardiac muscle (hPMCA4d). In addition, using RT-PCR we have also detected the expression of mRNAs for PMCA4a, b and d variants in rat cardiac muscle and in mouse C2C12 and rat Sol8 myotubes (data not shown).

The carboxyl-terminal region of variants 1b and 4b contain a CaM binding domain with two contiguous homologous CaM domains (A and B) that are then followed by an acidic amino acid cluster sequence, a putative cAMP-kinase phosphorylation site (DKAS) (Fig. 2B). Recently it has been reported that phosphorylation of the CaM binding domain by protein kinase C at the threonine residue in the sequence (QTQ) reduces its interaction with CaM [32]. Interestingly, the splice-in site C is located immediately downstream from the QTQ sequence (Fig. 2B). In variant 1c (29 amino acid insertion) and in variants 1d (38 amino acid insertion) or 4d (36 amino acid insertion), the domain A of the original CaM binding site (LRRGQILWFRGLNRIQTQ) of variant 1b or 4b is followed by the spliced-in amino acid domain, which is then followed by domain B of the original CaM binding site (IKVVKAFHSS), the acidic amino acid cluster sequence (DEEEEE), and a putative cAMP-kinase phosphorylation site (DKAS) (Fig. 2B). Therefore, the spliced PMCA4d mRNA encodes the largest isoform containing 1241 amino acids. In contrast, in variants 1a and 4a and 4g the inclusion of the whole exon C leads instead to a mRNA species that encodes a protein differently not only in the CaM binding domain but also in the remainder of the carboxyl-terminal amino acid sequence that lacks the phosphorylation site and the acidic amino acid regions due to a shift in the reading frame (Fig. 2B) [1, 14, 16]. Further studies are necessary to understand the physiologic role of the proteins resulting from the splice variants 'c' and 'd' in the cardiac and skeletal muscle. In addition, the functional consequences of alterations in the carboxyl-terminal sequences following the CaM-binding domain are still mostly unknown. Another variant of interest is the one lacking the exon at splice site B (variant 4g) [27, 28]. The exclusion of exon B would produce a protein with 1134 residues and therefore 36 amino acids shorter than variant 4a. If this variant is really translated into protein, it is anticipated that the carboxyl-terminal region would be facing the extracellular face of the membrane having only nine transmembrane domains instead of ten. However, since it is believed the carboxyl-terminal region in the PMCA faces the intracellular region of the membrane, the possibility of having a nine transmembrane domains is highly improbable. Alternatively, the currently accepted model with ten transmembrane domains for the PMCA would have to be reviewed for one containing only eight transmembrane domains.

Acknowledgements

The kind gift of human adult heart surgical material from Dr. Edward Pascoe (St. Boniface General Hospital, Winnipeg, Manitoba) is greatly appreciated. This work was supported by grants to A.Z.-H. from the Manitoba Health Research Council of Canada, the Manitoba Medical Service Foundation; and to J.M.-O. and A.Z.-H. from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (grant 1456-N9207). A.Z.-H. is a Scholar from the Heart and Stroke Foundation of Canada. J.S.-G. was supported by a scholarship from DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Carafoli E, Stauffer T: The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol* 25: 312-324, 1994
- Lytton J, MacLennan DH: In: H.A. Fozzard, E. Haber, R.B. Jennings, A.M. Katz, H.E. Morgan (eds) *The Heart and the Cardiovascular System*. Raven Press, New York, 1991, pp 1203-1222
- Inesi G, Lewis D, Nikic D, Hussain A, Kirtley ME: Long-range intramolecular linked functions in the calcium transport ATPase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 65: 185-215, 1994
- Brandl CJ, deLeon S, Martin DR, MacLennan DH: Adult forms of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J Biol Chem* 262: 3768-3774, 1987
- Brandl CJ, Green NM, Korozak B, MacLennan DH: Two Ca²⁺ ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* 44: 597-607, 1986
- Korczak B, Zarain-Herzberg A, Brandl CJ, Ingles CJ, Green NM, MacLennan DH: Structure of the rabbit fast-twitch skeletal muscle Ca²⁺-ATPase gene. *J Biol Chem* 263: 4813-4819, 1988
- MacLennan DH, Brandl CJ, Korozak B, Green NM: Amino-acid sequence of a Ca²⁺ + Mg²⁺-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 316: 696-700, 1985
- Lytton J, Zarain Herzberg A, Periasamy M, MacLennan DH: Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* 264: 7059-7065, 1989
- Lytton J, MacLennan DH: Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca²⁺-ATPase gene. *J Biol Chem* 263: 15024-15031, 1988
- Burk SE, Lytton J, MacLennan DH, Shull GE: cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca²⁺ pump. *J Biol Chem* 264: 18561-18568, 1989
- Anger M, Samuel JL, Marotte F, Wuytack F, Rappaport L, Lompre AM: The sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase mRNA isoform, SERCA 3, is expressed in endothelial and epithelial cells in various organs. *FEBS Lett* 334: 45-48, 1993
- Wuytack F, Papp B, Verboomen H, Raeymaekers L, Dode L, Bobe R, Enouf J, Bokkala S, Authi KS, Casteels R: A sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 3-type Ca²⁺ pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. *J Biol Chem* 269: 1410-1416, 1994
- Greeb J, Shull GE: 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* 264: 18569-18576, 1989
- Strehler EE, Strehler-Page MA, Vogel G, Carafoli E: mRNAs for plasma membrane calcium pump isoforms differing in their regulatory domain are generated by alternative splicing that involves two internal donor sites in a single exon. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6908-6912, 1989
- Burk SE, Shull GE: Structure of the rat plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 3 gene and characterization of alternative splicing and transcription products. Skeletal muscle-specific splicing results in a plasma membrane Ca²⁺-ATPase with a novel calmodulin-binding domain. *J Biol Chem* 267: 19683-19690, 1992
- Shull GE, Greeb J: Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit similarity to Na⁺,K⁺- and other cation transport ATPases. *J Biol Chem* 263: 8646-8657, 1988
- Strehler EE, James P, Fischer R, Heim R, Vorherr T, Filoteo AG, Penniston JT, Carafoli E: Peptide sequence analysis and molecular cloning reveal two calcium pump isoforms in the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 265: 2835-2842, 1990
- Kecton TP, Burk SE, Shull GE: Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C termini of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms 1, 2, 3, and 4. *J Biol Chem* 268: 2740-2748, 1993
- Adamo HP, Penniston JT: New Ca²⁺ pump isoforms generated by alternative splicing of rPMCA2 mRNA. *Biochem J* 283: 355-359, 1992
- Verma AK, Filoteo AG, Stanford DR, Wieben ED, Penniston JT, Strehler EE, Fischer R, Heim R, Vogel G, Mathews S, Strehler-Page MA, James P, Vorherr T, Krebs J, Carafoli E: Complete primary structure of a human plasma membrane Ca²⁺ pump. *J Biol Chem* 263: 14152-14159, 1988
- Khan I, Grover AK: Expression of cyclic-nucleotide-sensitive and insensitive isoforms of the plasma membrane Ca²⁺ pump in smooth muscle and other tissues. *Biochem J* 277: 345-349, 1991
- Brandt P, Neve RL, Kammesheidt A, Rhoads RE, Vanaman TC: Analysis of the tissue-specific distribution of mRNAs encoding the plasma membrane calcium-pumping ATPases and characterization of an alternately spliced form of PMCA4 at the cDNA and genomic levels. *J Biol Chem* 267: 4376-4385, 1992
- Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989
- Stauffer TP, Hilfiker H, Carafoli E, Strehler EE: Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J Biol Chem* 268: 25993-26003, 1993
- Heim R, Hug M, Iwata T, Strehler EE, Carafoli E: Microdiversity of human-plasma-membrane calcium-pump isoform 2 generated by alternative RNA splicing in the N-terminal coding region. *Eur J Biochem* 205: 333-340, 1992
- Strehler EE: Recent advances in the molecular characterization of plasma membrane Ca²⁺ pumps. *J Membr Biol* 120: 1-15, 1991
- Carafoli E: The Ca²⁺ pump of the plasma membrane. *J Biol Chem* 267: 2115-2118, 1992
- De Jaegere S, Wuytack F, de Smedt H, Van den Bosch L, Casteels R: Alternative processing of the gene transcripts encoding a plasma-membrane and sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump during differentiation of BC3H1 muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1173: 188-194, 1993
- Hammes A, Oberdorf S, Strehler EE, Stauffer T, Carafoli E, Vetter H,

- Neyses L: Differentiation-specific isoform mRNA expression of the calmodulin-dependent plasma membrane Ca(2+)-ATPase. *FASEB J* 8: 428-435, 1994
31. Brandt P, Vanaman TC: Splicing of the muscle-specific plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoforms PMCA1c is associated with cell fusion in C2 myocytes. *J Neurochem* 62: 799-802, 1994
32. Hoffmann F, Anagli J, Carafoli E, Vorherr T: Phosphorylation of the calmodulin binding domain of the plasma membrane Ca²⁺ pump by protein kinase C reduces its interaction with calmodulin and its receptor site. *J Biol Chem* 269: 24298-24303

2140 G TGCATTCAGA GATTTTCCAG CAGGAGAACC
 2161 AGAACCAGAG TGGGATAATG AAAATGATAT TGTCACCGGC CTTACATGCA TTGCTGTTGT
 2221 GGGGATTGAA GATCCTGTGA GACCTGAGGT GCCAGATGCA ATTA AAAAGT GTCAGAGGGC
 2281 TGGAATTACT GTGCGGATGG TCACTGGTGA TAATATTAAT ACTGCTCGGG CCATTGCTAC
 2341 CAAATGTGGT ATTTTACATC CTGGGGAAGA TTTTCTGTGC CTAGAAGGTA AAGATTTTAA
 2401 CAGAAGAATA CGAAATGAAA AAGGAGAGAT TGAGCAAGAG AGGATAGACA AGATTTGGCC
 2461 AAAACTTCGA GTACTTGCAA GATCATCTCC TACTGATAAG CATACTGG TTAAGGTAT
 2521 AATTGACAGC ACTGTCTCAG ACCAACGCCA GGTTGTAGCT GTA ACTGGTG ATGGTACAAA
 2581 TGATGGCCCA GCACTAAAGA AAGCAGATGT TGGATTTGCA ATGGGTATTG CTGGA ACTGA
 2641 TGTAGCTAAA GAAGCATCCG ATATTATTCT CACAGATGAC AACTTTACAA GCATTGTTAA
 2701 AGCAGTTATG TGGGGACGAA ATGTCTATGA CAGCATCTCA AAATTCCTTC AGTTCCA ACT
 2761 TACTGTTAAT GTAGTAGCAG TGATTGTTGC TTTTACGGGC GCCTGCATTA CTC AAGACTC
 2821 ACCGCTTAAG GCTGTGCAGA TGCTGTGGGT AAACCTCATA ATGGATACAC TCGCTTCCCT
 2881 GGCTCTGGCA ACGGAACCAC CCACTGAGTC TCTCTTGCTT CGGAAACCTT ATGGTAGAAA
 2941 TAAGCCTCTC ATCTCACGTA CAATGATGAA GAATATTTTG GGTCATGCAT TCTATCAACT
 3001 TGTAGTAGTC TTTACACTCT TATTTGCTGG AGAAAAGTTT TTTGACATTG ATAGTGG AAG
 3061 AAATGCTCCT TTGCATGCTC CTCCTTCAGA ACATTATACT ATTGTTTTTA ATACCTTTGT
 3121 GCTGATGCAA CTTTTCAACG AAATAAATGC CCGGAAAATT CATGGTGAAA GAAATGTATT
 3181 CGAAGGAATC TTTAACAATG CCATCTTCTG CACAATTGTT TTAGGCACTT TTGTGGTACA
 3241 GATAATAATT GTGCAGTTTG GTGGAAAACC TTT CAGTTGT TCAGAACTTT CAATAGAACA
 3301 GTGGCTATGG TCAATATTCC TAGGAATGGG AACATTACTC TGGGGCCAGC TTATTTCAAC
 3361 AATTCCAACT AGCCGTTTAA AATTCCTCAA AGAAGCTGGT CATGGAACAC AAAAGGAAGA
 3421 AATACCTGAG GAGGAATTAG CAGAGGATGT TGAAGAGATT GATCACGCTG AAAGGGAGTT
 3481 GCGGCGTGGC CAAATCTTGT GGTTTAGAGG TCTGAACAGA ATCCAAACAC

Secuencia de la clona 52 que codifica para la isoforma 1 de la
 ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática, aislada a partir de la
 biblioteca de corazón fetal de humano.

1108 CTC TCTGACAGGG GAATCTGACC ATGTCAAGAA
 1141 GTCCCTGGAC AAAGACCCCA TGTTGCTCTC AGGGACCCAT GTCATGGAAG GTTCTGGCCG
 1201 GATGGTGGTG ACAGCTGTTG GTGTCAACTC TCAGACTGGA ATCATCCTTA CTCTCTGGG
 1261 GGTC AATGAG GATGACGAAG GGGAGAAAA GAAGAAAGGT AAAAAACAAG GAGTCCCTGA
 1321 AAATCGCAAC AAAGCAAAGA CCCAAGACGG AGTGGCCCTG GAAATCCAGC CACTCAACAG
 1381 CCAGGAGGGA ATCGACAATG AGGAAAAGGA CAAGAAGGCA GTCAAGGTGC CTAAAAAGGA
 1441 GAAGTCAGTG CTGCAGGGCA AGCTGACTCG CCTGGCTGTT CAGATTGGGA AAGCCGGTCT
 1501 GCTCATGTCT GCTCTCACGG TTTTCATCCT GATTCTATAC TTTGTGATTG ACAACTTTGT
 1561 GATAAATCGC AGACCATGGC TCCCTGAGTG TACTCCCATC TACATCCAGT ACTTTGTCAA
 1621 GTTCTTCATC ATCGGCATCA CTGTACTGGT GGTGGCTGTG CCAGAGGGGC TGCCTCTGGC
 1681 TGTCACCATC TCACTGGCCT ACTCTGTGAA GAAAATGATG AAAGACAATA ACCTAGTACG
 1741 GCACTTGGAT GCTTGTGAGA CCATGGGCAA CGCCACCGCC ATCTGCTCTG ATAAGACAGG
 1801 CACGTTGACC ATGAACCGCA TGACTGTGGT ACAAGCTTAT ATTGGGGGCA TCCATTACCG
 1861 TCAAATCCCA AGCCCTGATG TCTTCCTGCC CAAAGTCCTG GACCTCATTG TCAATGGCAT
 1921 TTCTATCAAC AGTGCTTATA CCTCCAAGAT TCTGCCTCCA GAGAAGGAGG GAGGCCTGCC
 1981 TCGGCAGGTG GGCAACAAGA CCGAGTGTGC TCTGCTAGGC TTTGTCACAG ATCTGAAGCA
 2041 GGATTATCAG GCTGTGCGTA ATGAAGTGCC CGAGGAGAAG CTCTACAAGG TGTACACCTT
 2101 TAACTCAGTG CGCAAGTCAA TGAGCACCGT CATCAGGAAT CCCAACGGTG GCTTCCGTAT
 2161 GTACAGCAAG GCGCCTCTG AGATCATCTT GCGCAAGTGT AATCGAATCC TGGACCGGAA
 2221 AGGGGAAGCA GTGCCATTCA AGAATAAAGA CAGAGATGAT ATGGTACGCA CTGTCATCGA
 2281 GCCCATGGCC TGTGATGGAC TCCGGACTAT CTGCATAGCT TACCGGGACT TCGATGACAC
 2341 AGAGCCCTCT TGGGACAATG AGAATGAGAT CCTCACCGAA CTGACCTGTA TCGCGGTGGT
 2401 GGGCATTGAG GACCCTGTGC GCCCAGAGGT GCCAGATGCT ATTGCCAAAT GCAAACAAGC
 2461 TGGCATTACT GTCAGAATGG TGACAGGTGA CAACATCAAC ACAGCCCAGG CCATTGCCAC
 2521 CAAATGTGGC ATTCTGACAC CTGGGGATGA CTTCTGTGC TTAGAAGGCA AAGAATTCAA
 2581 CCGGCTCATC CGCAACGAGA AAGGCGAGGT AGAGCAAGAA AAGCTGGACA AGATCTGGCC
 2641 TAAGCTTCGG GTCCTGGCGC GATCTTCTCC CACTGACAAG CACACCCTGG TGAAAGGCAT
 2701 AATTGACAGC ACTGTTGGGG AACACCGGCA GGTCGTGGCT GTCACTGGTG ATGGCACAAA
 2761 TGACGGGCCT GCTCTGAAGA AAGCGGATGT TGGTTTTGCC ATGGGCATCG CAGGCACAGA
 2821 TGTAGCAAAG GAGGCTTCAG ACATCATCCT AACAGATGAC AACTTCACCA GCATTGTGAA
 2881 GGCAGTGATG TGGGGACGAA ATGTCTATGA CAGCATCTCC AAGTTCCTGC AGTTCAGCT
 2941 CACTGTCAAT GTGGTGGCCG TGATTGTAGC CTTCACTGGA GCCTGTATCA CTCAGGATTC
 3001 CCCATTGAAA GCTGTGCAGA TGTGTGGGT TAATCTGATC ATGGACACTT TTGCTTCATT
 3061 GGCCCTGGCC ACAGAGCCCC CTACGGAATC TCTGTTGAAG CGGCGCCCCT ATGGCCGAAA
 3121 TAAGCCTCTG ATCTCACGCA CTATGATGAA GAACATCTTG GGCCATGCAT TCTATCAGCT
 3181 CATTGTCATC TTTATCCTTG TCTTTGCGGG TGAGAAATTC TTTGATATTG ATAGTGGGAG
 3241 GAAGGCACCT CTACATTCAC CACCCAGCCA GCACTATAACC ATTGTTTTTA ACACCTTCGT
 3301 GCTGATGCAG CTCTTCAATG AAATCAACTC CCGAAAGATC CATGGAGAGA AGAACGTCTT
 3361 TTCAGGCATC TACCGCAACA TTATCTTCTG CTCTGTAGTC TTGGGCACAT TCATCTGCCA
 3421 GATTTTCATC GTGGAATTTG GGGGTAAACC CTTCACTTGT ACAAGCCTCA GCCTGTCTCA
 3481 GTGGCTGTGG TGTCTCTTCA TTGGGATTGG AGAACTTCTG TGGGGCCAGT TCATCTCCGC
 3541 AATACCTACC CGATCCCTGA AGTTCCTGAA GGAGGCTGGG CATGGCACCA CCAAAGAGGA
 3601 GATCACCAAG GATGCCGAGG GACTGGATGA GATTGACCAT GCTGAGATGG AGCTGCGCCG
 3661 AGGCCAGATC CTCTGGTTCC GGGGCCTGAA CCGTATCCAG ACTCAG

Secuencia de las clonas que codifican para la isoforma 4 de la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática, aisladas a partir de la biblioteca de corazón fetal de humano.

AVANCES Y PERSPECTIVAS EN LA CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA ATPasa-Ca²⁺ DE LA MEMBRANA PLASMATICA

Juan Santiago García. Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México.
Apartado Postal 70-243, 04510, México, D F.

RESUMEN

La ATPasa-Ca²⁺ es una enzima constitutiva de la membrana plasmática de las células eucarióticas, la cual transporta el calcio del citoplasma hacia el espacio extracelular a expensas de la hidrólisis del ATP. En el presente artículo se revisan los avances más importantes en la caracterización molecular de la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática (ACMP). Esta enzima pertenece a una familia multigénica, formada por cuatro genes, donde la edición alterna de los mensajeros de cada uno de estos genes, puede a su vez generar una gran diversidad de isoformas. El análisis y la comparación de las secuencias de varias isoformas de la ACMP con diversas ATPasas tipo P, sugiere un patron estructural común entre estas enzimas, lo que ha permitido establecer y localizar la secuencia de regiones importantes para la función de estas ATPasas.

PALABRAS CLAVE: ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática, edición alterna, isoformas, homología de secuencia, ATPasas-P.

ABSTRACT

The plasma membrane Ca²⁺-ATPase (PMCA) is an ubiquitous enzyme of eukaryotic cells which couples the hydrolysis of ATP to calcium transport from the cytoplasm to the extracellular space. In this article, the main advances in the molecular characterization of the PMCA are reviewed. This enzyme belongs to a multigene family codified by four genes where alternative splicing of the mRNAs from each of these genes can generate several isoforms. Sequence analysis and alignment between the PMCA isoforms and several P type ATPases, suggest a similar structural pattern. These studies have also allowed to establish the sequence of regions functionally important in these ATPases.

KEY WORDS: Plasma membrane Ca²⁺-ATPase, alternative splicing, isoforms, sequence homology, P type ATPases.

I. INTRODUCCION

La membrana plasmática es altamente impermeable al calcio, por lo que se mantiene un gradiente de concentración entre el interior y el exterior. La concentración del ión calcio (Ca²⁺) en el espacio extracelular es de 1 a 3 x 10⁻³ M, mientras que su concentración en el citoplasma es de 10⁻⁷ M. Como respuesta a diversos estímulos hormonales, eléctricos y químicos, la célula permite la entrada masiva de calcio a través de canales localizados en la membrana plasmática. Así mismo, se induce la liberación de Ca²⁺ de varios reservorios intracelulares. El aumento en la concentración citoplásmica de este catión constituye la señal para disparar una gran variedad de respuestas celulares como son: la liberación de neurotransmisores, la contracción muscular, liberación de hormonas, etc. Para recuperar su condición basal, la célula debe restablecer su concentración intracelular de calcio a niveles submicromoleculares, de otra forma permanecería constantemente activada y eso la conduciría a la muerte. Las células cuentan con varios mecanismos para remover el exceso de Ca²⁺ del citoplasma como son: la ATPasa-Ca²⁺ localizada en la membrana del retículo sarco(endo)plásmico y que transporta el Ca²⁺ del citoplasma al lumen del retículo a expensas de la hidrólisis del ATP. También se han descrito sistemas de transporte de calcio en la mitocondria, orgánulo que parece participar como amortiguador de las concentraciones de este catión.

Por otro lado, en la membrana plasmática existen dos mecanismos que permiten la salida de Ca²⁺ de las células, un intercambiador Na⁺-Ca²⁺ (acoplado a la

ATPasa- Na^+/K^+) y la ATPasa- Ca^{2+} , enzima que bombea el exceso de Ca^{2+} hacia el exterior de la célula a expensas de la hidrólisis del ATP. El intercambiador es un sistema de baja afinidad y alta capacidad (presente sólo en algunos tipos celulares), mientras que la ATPasa- Ca^{2+} es de alta afinidad pero baja capacidad.

La importancia de la ACMP radica en su capacidad de remover el exceso de calcio del citoplasma hasta restablecer los niveles encontrados en el estado de reposo (10^{-7} M), debido a que tiene una afinidad 10 veces mayor para el Ca^{2+} en relación a la ATPasa- Ca^{2+} del retículo sarco(end)plásmico.

II. CARACTERISTICAS GENERALES DE LA ATPasa- Ca^{2+} DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Desde la demostración de su existencia en eritrocitos de humano en 1966, la ACMP ha sido caracterizada y purificada a partir de una gran diversidad de tejidos y tipos celulares. Estos estudios sugieren que la ATPasa- Ca^{2+} es una enzima constitutiva de la membrana plasmática de las células eucarióticas (1 y 2). Esta enzima, transporta o bombea el Ca^{2+} del citoplasma al espacio extracelular a expensas de la hidrólisis del ATP, con una estequiometría $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ cercana a uno (3). La ACMP está formada por un solo polipéptido con una masa molecular aproximada de 130 a 140 kDa. Durante su ciclo catalítico forma un intermediario fosforilado, por la transferencia del fosfato gamma del ATP a un residuo específico de ácido aspártico y su actividad es inhibida por el ortovanadato. Debido a estas dos características, esta enzima ha sido clasificada dentro del grupo de las ATPasas tipo P.

La $K_{0.5}$ para el Ca^{2+} es de aproximadamente 10^{-6} M; sin embargo, la enzima alcanza una activación máxima entre 10^{-5} a 10^{-4} M, las concentraciones mayores de este catión provocan inhibición. Su actividad depende de las concentraciones micromoleculares de Mg^{2+} libre y tiene una alta especificidad por el ATP como sustrato. Una propiedad distintiva de la ACMP es su estimulación por interacción directa con calmodulina, propiedad que ha sido aprovechada para purificar a la enzima de diversos tipos celulares por medio de columnas de calmodulina-sefarosa. En presencia de concentraciones óptimas de calmodulina (1 nM), la K_m (Ca) disminuye de $20 \mu\text{M}$ a cerca de $0.5 \mu\text{M}$ y la V_{max} aumenta. En ausencia de calmodulina la

ATPasa es estimulada por fosfolípidos ácidos o ácidos grasos poliinsaturados (2 y 3), tratamiento con enzimas proteolíticas (1 a 3), fosforilación por proteína cinasa A, o proteína cinasa C (3). Cuando la enzima se trata con tripsina pierde su respuesta a la calmodulina, debido al corte del extremo carboxilo terminal (ver sección V), por lo que la enzima se mantiene permanentemente activada (1 a 3). A diferencia de la tripsina, la proteasa calpaina puede tener efectos importantes *in vivo*, debido a que la calpaina ataca preferencialmente proteínas que presentan dominios de unión a calmodulina (3). En ausencia de calmodulina, la calpaina corta un fragmento del carboxilo terminal que contiene los dominios de unión a la calmodulina y genera una enzima activada de 127 kDa (3). Sin embargo la presencia de calmodulina retrasa la proteólisis por calpaina y altera el patrón de corte (para una revisión más detallada de las propiedades de la ACMP consultar referencias 1 a 4).

III. DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA ATPasa- Ca^{2+} Y LA IDENTIFICACION DE DIVERSAS ISOFORMAS

La determinación de la secuencia de aminoácidos de los fragmentos tripticos que continen los sitios de unión al isotiocianato de fluoresceína (FITC), que se considera el sitio de unión al ATP y de las ATPasas tipo P y la secuencia del sitio de unión de calmodulina de la bomba de calcio de eritrocitos de humano, constituyeron el punto de partida para iniciar la clonación y determinación de la secuencia de la ACMP. En 1988, se publicó la secuencia completa de dos isoformas de esta enzima a partir de una biblioteca de ADNc de cerebro de rata (5). En el mismo año se reportó la secuencia de una isoforma de esta enzima, deducida a partir de una biblioteca de ADNc de un teratoma de humano (6).

El análisis de diversas bibliotecas de ADNc de rata, humano, conejo y bovino, así como la determinación de secuencias de péptidos pequeños de la ATPasa- Ca^{2+} de eritrocitos de humano, han permitido deducir la secuencia completa de aminoácidos de tres isoformas de la ACMP de rata, tres isoformas en humano, una en conejo y la secuencia parcial de una isoforma en bovino (5 a 11).

Las ACMP de células de mamífero varían en tamaño, entre 1,159 y 1,258 residuos de amino-

ácidos, con masas moleculares calculadas entre 127.3 a 138 kDa (Tabla I). Las isoformas correspondientes entre humano y rata muestran una similitud del 97 al 99%, mientras que los productos de los genes diferentes en una misma especie muestran de 75 a 85% de similitud en su secuencia (4). En conjunto con estos reportes, el análisis de bibliotecas de ADN genómico, así como los estudios de reacción en cadena de la polimerasa, han permitido establecer la existencia de cuatro genes que codifican para esta enzima.

La edición alterna de los mensajeros de cada uno de estos genes puede generar, a su vez, una gran diversidad de isoformas (3, 4, 11 a 14, Tabla I y Fig 1). Esto ha demostrado que la ACMP pertenece a una familia multigénica y sugiere la posibilidad de que la actividad de la ATPasa-Ca²⁺ observada en la membrana plasmática puede ser el resultado combinado de los productos de varios de estos genes.

TABLA I

Isoformas de la ATPasa-Ca²⁺ de la Membrana Plasmática

Isoforma	Especie	Variantes	Número de residuos	Masa Molecular calculada
ACMP1	Rata, conejo cerdo y humano	1a	1,176	129,500
		1b	1,220	134,700
		1c	1,249	137,800
		1d	1,258	138,800
ACMP2	Rata y humano	2f	1,198	132,600
		2g	1,243	136,800
		2h	1,212	134,000
ACMP3	Rata	3a	1,159	127,300
ACMP4	humano	4a	1,170	129,400
		4b	1,205	133,900
		4g	1,169	130,300
?	Bovino	?	71	7,700

Modificada de la referencia 3.

La edición alterna de los mensajeros puede ocurrir en cuatro sitios denominados A, B, C y D (Fig 1), pero principalmente se ha observado en los sitios A y C. El sitio A se localiza hacia el extremo amino terminal y está próximo al sitio de interacción o regulación por fosfolípidos. Todos los genes, excepto el gen de la ACMP1 presentan edición alterna a nivel

del sitio A. Para el gen 2 existen tres exones de 33, 60 y 42 pb. que pueden incluirse en el ARNm maduro en varias combinaciones, que generan tres posibles variantes denominadas: 2z, 2x y 2w, las cuales tienen inclusiones de 0, 42 y 135 pb respectivamente (12 y Fig 1B). En humanos, el exón de 42 pb se inserta de manera separada, mientras que los exones de 60 y 33 pb se usan o insertan en conjunto con el exón de 42 pb (Fig 1B). En el caso de la rata (en algunos tejidos), los exones de 33 y 60 pb se pueden incluir en el ARNm sin el exón de 42 pb, de esta manera se genera una cuarta variante denominada 2y (14). Para el gen 3 de la ACMP, se ha encontrado un exón de 42 pb que puede ser incluido (variante 3x), o excluido del ARNm (variante 3z). Para el gen 4 de la ACMP, la edición alterna puede generar dos posibles variantes (4z y 4x), por la exclusión o inclusión de un exón de 36 pb (Fig 1B).

El sitio C se localiza en la región carboxilo terminal de la enzima y comprende a uno de los dominios de interacción con calmodulina (Fig 1A). Para el gen 1, la edición alterna en este sitio incluye a un exón de 154 pb que presenta tres sitios donadores internos que puede generar un total de 5 variantes denominadas 1a, 1b, 1c, 1d y 1e (Fig 1C). Para el gen 2, existe un exón de 227 pb cuya exclusión o inclusión genera dos posibles variantes, 2b y 2a respectivamente (Fig 1C). Para el caso del gen 3, la edición es más compleja, incluye 2 exones de 154 y 68 pb que al editarse diferencialmente pueden generar tres variantes (3b, 3a y 3g). La variante 3b no presenta inclusión alguna, la variante 3a incluye el exón de 154 pb, mientras que la variante 3g incluye el exón de 154 y 68 pb. En la rata se ha detectado una variante adicional, debido a que el exón de 154 pb presenta un sitio donador interno (13). En relación al gen 4, en humanos se pueden generar dos posibles variantes (4a y 4b), por la presencia o ausencia de un exón de 154 pb (Fig 1C).

Sin embargo, en el laboratorio identificamos y clonamos una tercera variante que se denominó 4d, que se genera por la presencia de un sitio donador interno en el exón de 154 pb. Esta nueva variante incluye solamente 108 pb, lo que provoca un cambio en el marco de lectura, para dar origen a una proteína más grande. La edición alterna a nivel del sitio C, puede dar origen a proteína con una sensibilidad o respuesta diferente a la calmodulina.

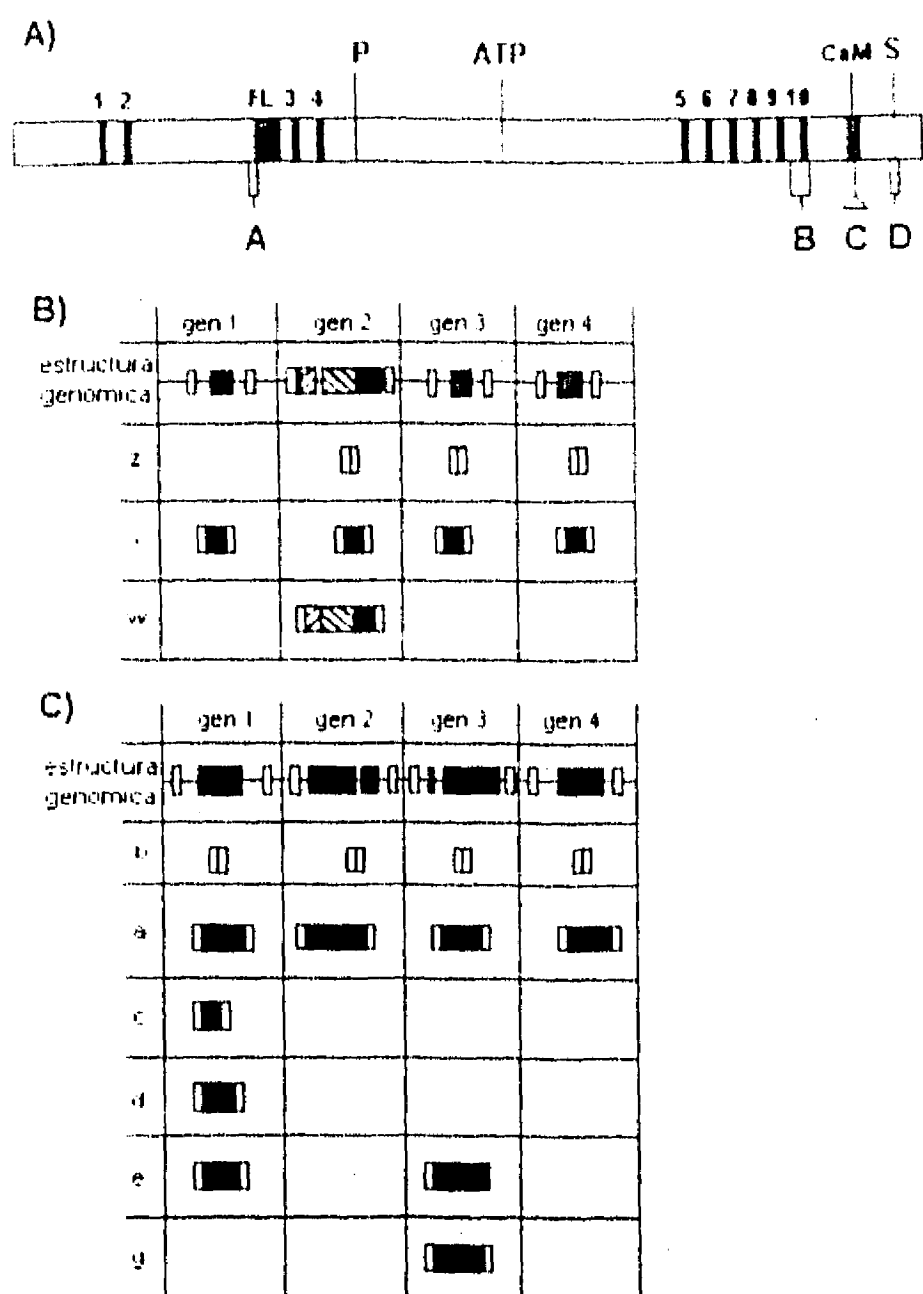


Figura 1. Edición alterna de los mensajeros que codifican para la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática. A) Representación esquemática de la secuencia de la ACMP, donde se indican los sitios de edición alterna A, B, C y D, los 10 cruces membranales, sitio de fosforilación (P), sitio de unión de FITC/ATP, dominios A y B de unión a calmodulina, región de estimulación por fosfolípidos (FL) y sitio de fosforilación por proteína cinasa A (S). B) y C) Edición alterna y generación de las posibles variantes a nivel de sitio A y sitio C respectivamente, para los cuatro genes de la ACMP de humano. Los rectángulos corresponden a exones, las líneas horizontales a intrones y las letras a-e, w-z indican las posibles variantes.

Las variantes generadas a nivel del sitio B únicamente se han observado de manera aislada para el ARNm del gen 4 (4). La edición alterna en este sitio es de gran interés para la topología de la enzima, debido a que incluye un exón que codifica para el dominio transmembranal 10. De tal manera que si se excluye este exón originaría proteínas que carecen del cruce membranal 10. Si esta isoforma se sintetiza y es funcional, entonces habría que modificar el modelo propuesto para la estructura de la ACMP. Es decir, se tendría que proponer un modelo con 8

cruces membranales, debido a que es improbable que la enzima cruce la membrana un número impar de veces, básicamente por que el carboxilo terminal, donde se encuentra el sitio de interacción con la calmodulina y los sitios de fosforilación por proteínas cinasas, se han ubicado en la parte citoplásmica (ver sección de topología de la enzima). La edición a nivel del sitio D incluye una secuencia que constituye el sustrato para una proteína cinasa A, que está ausente en la ACMP1a de rata, así como en la isoforma 4a de eritrocitos de humano (3 y 4).

Es importante resaltar que la edición alterna de los mensajeros se da en sitios importantes para la regulación de la ATPasa (sitio de interacción con fosfolípidos y sitio de interacción con calmodulina), mientras que las regiones que participan en la catálisis no sufren edición alterna y el patrón de plegamiento parece estar altamente conservado entre las diversas ATPasas de tipo P (3). Sin embargo, el significado funcional de toda esta gran diversidad de isoformas aún no está claro. Lo que en la actualidad se ha demostrado es que las isoformas 1b y 4b se expresan de manera constitutiva en todos los tejidos estudiados, mientras que la expresión de las otras isoformas es tejido específica (12).

IV. DETERMINACION DE SECUENCIAS Y REGIONES CONSERVADAS ENTRE LA ATPasa-Ca²⁺ Y ATPasas TIPO P

Diversos estudios de marcaje directo, seguidos de proteólisis y o ruptura con bromuro de cianógeno, purificación y secuencia de péptidos, han permitido identificar la secuencia de aminoácidos del sitio de formación del intermediario fosforilado y del sitio de unión de la FITC (considerado el sitio de unión al ATP). Asimismo, han permitido determinar la secuencia del sitio de unión de algunos análogos del ATP no hidrolizables como lo son: el 5'-[p-(fluoro-sulfonil)benzoil]adenosin (FSBA) y el gamma-[4-(N-2-cloroetil-N-metilamino)bencil] ATP (CIRATP)), considerado como el sitio de unión del ATP de baja afinidad. Otros estudios similares han permitido deducir las secuencias de la ATPasa-Ca²⁺ que interaccionan con la calmodulina. De manera complementaria a estos estudios, la comparación y análisis de las secuencias de diversas isoformas de la ACMP con las secuencias de otras ATPasas tipo P, han permitido determinar y establecer las secuencias de aminoácidos que participan en la

unión del ATP, sitio de fosforilación y otros (Fig 2).

La Figura 2A muestra la comparación de la secuencia del sitio de unión a FITC (sitio de unión al ATP) de tres isoformas de la ACMP y otras tres ATPasas tipo P. Es importante destacar el alto grado de similitud de las secuencias en torno a este sitio, hay cuatro residuos que se conservan, lisina (K) (residuo al que se une el FITC), glicina (G), alanina (A) y ácido glutámico (E).

A)

ACMP1h	M	Y	S	K	G	A	S	E	I	L	R	
ACMP1r	I	F	S	K	G	A	S	E	I	L	K	
ACMP2r	M	Y	S	K	G	A	S	E	I	V	L	K
ACRS	M	F	V	K	G	A	P	E	G	V	I	D
ANaK	L	V	M	K	G	A	P	E	R	I	L	E
AHK	L	V	M	K	G	A	P	E	R	V	L	E

B)

ACMP1h	M	G	N	A	T	A	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T	M
ACMP1r	M	G	N	A	T	A	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T	M
ACMP2r	M	G	N	A	T	A	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T	T
ACRS	L	G	C	T	S	V	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T	T
ANaK	L	G	S	T	S	T	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T	Q
AHK	L	G	T	C	S	V	I	C	S	D	K	T	G	T	L	T	Q

C)

ACMP1r	697	C	Q	R	A	G	I	T	V	R	M	V	T	G	D	N	I	N	I	T	A	R	A	I	A	719
ACMP1r	787	E	Q	R	Q	-	V	V	-	A	V	T	G	D	G	T	N	D	G	P	I	A	L	K	806	
ACRS	690	L	Q	S	F	D	E	I	T	-	A	M	T	G	D	G	V	N	D	A	P	I	A	L	K	711
ANaK	698	C	Q	R	Q	G	A	I	V	-	A	V	T	G	D	G	V	N	D	S	P	I	A	L	K	719
AHK	714	C	Q	R	L	Q	A	I	V	-	A	V	T	G	D	G	V	N	D	S	P	I	A	L	K	735
AKEc	505	Y	Q	A	E	G	R	L	V	-	A	M	T	G	D	G	T	N	D	A	P	I	A	L	K	527
AHL	623	Q	N	R	-	G	Y	L	V	-	A	M	T	G	D	G	V	N	D	A	P	S	L	K	643	
AHNe	623	Q	Q	R	-	G	Y	L	V	-	A	M	T	G	D	G	V	N	D	A	P	S	L	K	643	

Figura 2. Comparación de secuencias de las ACMP con secuencias de otras ATPasas tipo P. A) Comparación de secuencias correspondientes al sitio de unión de FITC/ATP. B) Comparación de secuencias correspondientes al sitio de fosforilación o de formación del intermediario fosforilado. C) Comparación de secuencias correspondientes al sitio de unión de análogos del ATP no hidrolizables (FSBA y CIRATP). Las abreviaturas corresponden a: ACMP1h, ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática isoforma 1 de humano; ACMP1r, ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática isoforma 1 de rata; ACMP2r, ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática isoforma 2 de rata; ACRS ATPasa-Ca²⁺ de retículo sarco(end)plásmico; ANaK, ATPasa-Na⁺/K⁺; AHK, ATPasa-H⁺/K⁺; AKEc, ATPasa-K⁺ de *Escherichia coli*; AHL, ATPasa-H⁺ de levadura; AHNe, ATPasa-H⁺ de *Neurospora crassa* (tomado de la referencia 5).

De manera similar, la Figura 2B muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos del sitio de formación del intermediario fosforilado. Al igual que el sitio de unión al FITC, esta región está altamente conservada en las ATPasas tipo P y se puede observar la secuencia característica **ICSDKTGTLTM**, donde el residuo de ácido aspártico (D) es el responsable de formar la unión covalente con el fosfato gamma del ATP.

Por otro lado, las evidencias Bioquímicas sugieren la existencia de dos sitios de unión para el ATP en diversas ATPasas tipo P, un sitio de alta afinidad que tiene función catalítica y un sitio de baja afinidad con función regulatoria (1). Uno de estos sitios corresponde a la región de unión al FITC y el otro puede corresponder a la región de unión del FSBA y del CIRATP (análogos del ATP no hidrolizables). La Figura 2C muestra la comparación de la secuencia de aminoácidos correspondiente al sitio de unión al FSBA/CIRATP, la similitud en esta región es menor a la presentada en la figura 2A y 2B. Sin embargo, la secuencia TGD (Thr-Gly-Asp) responsable de esta unión, está totalmente conservada en todas las ATPasas comparadas.

V. ORGANIZACION TRANSMEMBRANAL Y TOPOLOGIA DE LA ATPasa-Ca²⁺ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

La secuencia de aminoácidos de la ACMP y otras ATPasas del tipo P se han analizado de acuerdo al algoritmo de Kyte y Doolittle (6) y otros algoritmos para predecir hélices transmembranales. Los resultados predicen 10 hélices o cruces transmembranales. Es notorio que varias de las ATPasas tipo P muestran un patrón estructural muy similar, a pesar de sus diferencias a nivel de secuencia (Fig 3).

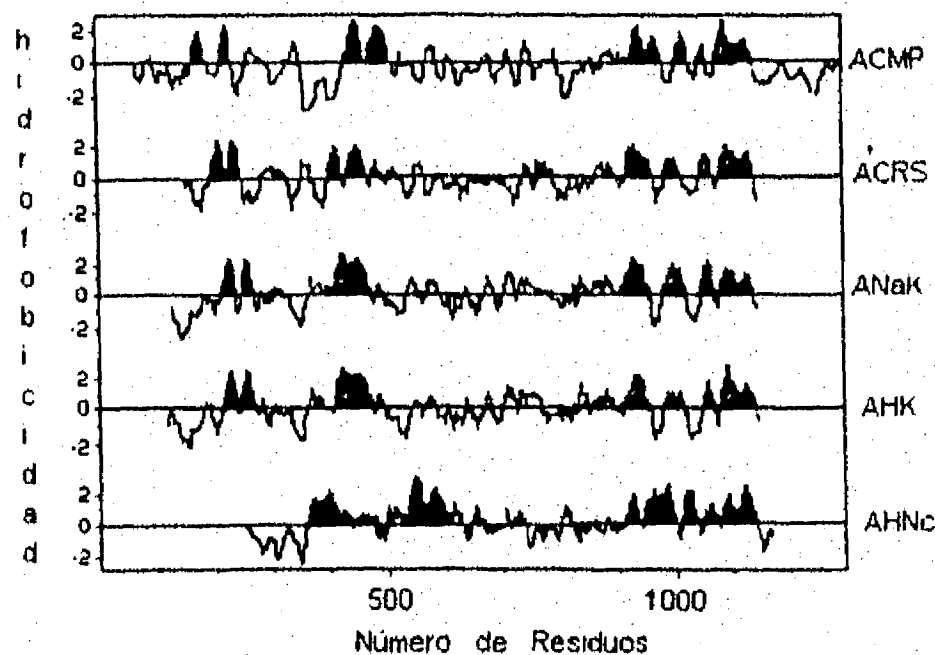


Figura 3. Gráficas de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de cinco ATPasas tipo P, obtenidas por medio del algoritmo de Kyte y Doolittle. Las abreviaturas corresponden a las citadas en la figura 2 (tomado de la referencia 6).

En la figura 4 se presenta un modelo planar de la posible estructura de la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática. Este modelo toma como base el propuesto

para la ATPasa- Ca^{2+} de retículo sarco(endo)plásmico, en conjunto con las predicciones de la estructura secundaria, las evidencias obtenidas por secuencia directa de péptidos, así como la información acumulada de comparar la secuencia de las ACMP con varias ATPasas tipo P. El modelo muestra los 10 dominios o cruces membranales, un gran dominio citoplásmico de estructura alfa-beta entre los cruces membranales 4 y 5, donde se localiza el sitio de fosforilación y el sitio de unión para el ATP. Así mismo, muestra un pequeño dominio citoplásmico entre los cruces membranales 2 y 3, donde se ubica la región que participa en la interacción con los fosfolípidos. Por otro lado, en el extremo carboxilo terminal se localizan los dominios de unión a la calmodulina, el sitio de fosforilación por proteína cinasa C y los sitios de corte por calpaina (Fig 4). El modelo sugiere que la mayor parte de la ACMP se localiza en la cara citoplásmica de la membrana, mientras que en la cara extracelular sólo se encuentran asas muy pequeñas que conectan los segmentos membranales.

A diferencia de otras ATPasas tipo P, una característica sobresaliente de la ACMP es su capacidad de interacción y regulación por calmodulina. Por esta razón, se ha dedicado un gran esfuerzo a tratar de identificar la secuencia o regiones que participan en la interacción con la calmodulina. Por medio de estudios de proteólisis controlada se demostró que el sitio de unión a la calmodulina se localiza dentro de un fragmento de 12 kDa, cercano al carboxilo terminal (2). Al comparar la secuencia de las ACMP con secuencias de diversas enzimas que son reguladas por calmodulina, se han identificado dos dominios de unión a la calmodulina. El dominio A y el dominio B, de aproximadamente 15 residuos cada uno (Fig 4), cuya secuencia presenta una abundancia de aminoácidos básicos y aminoácidos hidrofóbicos, capaces de formar hélices alfa anfífilas. Es decir, un lado o cara de la hélice es rica en residuos polares (arginina), mientras que la otra cara es rica en residuos hidrofóbicos, rasgo característico de las secuencias de unión a la calmodulina de diversas enzimas (5).

Los trabajos de proteólisis limitada, también sugieren la posibilidad de que la región de unión a la calmodulina puede funcionar como un represor de la actividad de la ACMP, debido a que el corte de esta región provoca una activación de la enzima.

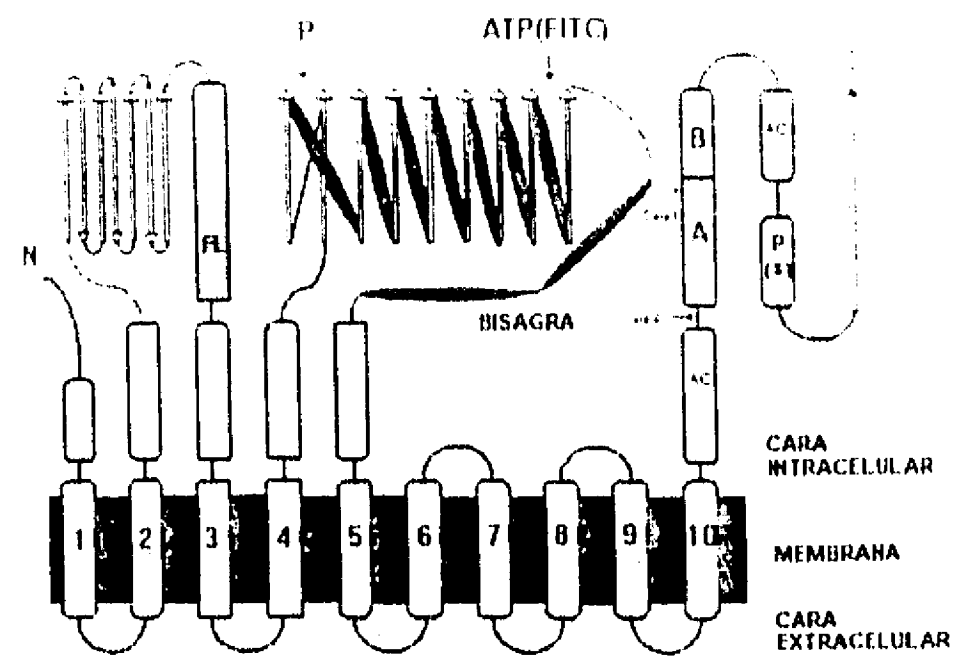


Figura 4. Modelo topológico de la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática. Los sitios indicados son: sitio de unión a fosfolípidos (FL); sitio de fosforilación (P); sitio de unión a FITC/ATP; dominios A y B de unión a calmodulina; secuencias ricas en aminoácidos (AC); sitio de fosforilación por proteína cinasa A (PS); sitios de corte por calpaina en ausencia (Calp1) y en presencia de calmodulina (Calp2); 1 a 10, los diez dominios transmembranales; N y C, amino y carboxilo terminales (adaptado de la referencia 4).

Algunos estudios recientes realizados con péptidos sintéticos correspondientes a los dominios de unión a la calmodulina, demuestran que estos péptidos no sólo se unen a la calmodulina, sino también a otra región de la enzima cercana al sitio de interacción con fosfolípidos (3). Esto sugiere la posibilidad de que el dominio de unión a la calmodulina podría doblarse y unirse a una secuencia identificada en el dominio citoplásmico pequeño (ubicado entre los cruces membranales 2 y 3, Fig 4) y de esta manera reprimir la actividad de la enzima. La unión de calmodulina a la enzima evita de esta manera la autoinhibición (3).

VI. PERSPECTIVAS

La determinación de la secuencia de diversas isoformas de la ACMP y el avance en los sistemas de expresión de proteínas *in vitro* han permitido la expresión de esta enzima en células de mamífero (COS-1) y en células de insecto. La expresión de la ACMP en células COS-1 ha demostrado que la afinidad para el calcio depende de la edición alterna; es decir las diversas isoformas tienen una sensibilidad diferente al calcio (15). Esto ofrecerá la posibilidad de realizar un sinnúmero de estudios de mutagénesis dirigida, con la intención de identificar los residuos importantes para la catálisis de esta enzima. Así mismo, abrirá la posibilidad de construir proteínas

quiméricas, donde se intercambien ciertas regiones de una isoforma por otra, o regiones de la ACMP por secuencias de otras ATPasas tipo P y de esta manera poder establecer el papel que tienen dichas regiones en la estructura y función de la ACMP.

Por otro lado, será de gran interés el conocer los elementos que regulan la edición alterna de los mensajeros que codifican para las diversas isoformas de la ACMP y comprender el significado funcional de

la gran diversidad de isoformas. Es decir, qué isoformas se expresan realmente en proteína; cuándo se expresan y cuáles son las diferencias funcionales entre cada una de ellas. Todo esto hace suponer que durante los próximos años se darán avances importantes en la caracterización de la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática y tal vez en un futuro no muy lejano se obtengan evidencias del mecanismo molecular que acopla la hidrólisis del ATP y el transporte de calcio.

REFERENCIAS

1. Rega A F y Garrahan P J (1985) The calcium pump of plasma membranes. CRC press, Boca Raton FL; 173 pp.
2. Carafoli E (1987) Intracellular calcium homeostasis. *Ann Rev Biochem* 56:395-433.
3. Carafoli E (1992) The Ca²⁺ pump of the plasma membrane. *J Biol Chem* 267:2115-2118.
4. Strehler E E (1991) Recent advances in the molecular characterization of plasma membrane Ca²⁺ pumps. *J Membr Biol* 120:1-15.
5. Shull G E y Greeb J (1988) Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase from rat Brain. *J Biol Chem* 263:8646-8657.
6. Verma A K, Liloteo A G, Stanford D R, Wiehen E D, Penniston J T, Strehler E E, Fischer R, Heim R, Vogel G, Mathews S, Strehler-Page M A, James P, Vorherr T, Krebs J y Carafoli E (1988) Complete primary structure of a human plasma membrane Ca²⁺ pump. *J Biol Chem* 263:14152-14159.
7. Greeb J y Shull G E (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* 264:18569-18576.
8. Strehler E E, James P, Fischer R, Heim R, Vorherr T, Filoteo A G, Penniston J T y Carafoli E (1990) Peptide sequence analysis and molecular cloning reveal two calcium isoforms in the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem* 265:2835-2842.
9. Heim R, Hug M, Iwata T, Strehler E E y Carafoli E (1992) Microdiversity of human plasma-membrane calcium-pump isoform 2 generated by alternative RNA splicing in the N-terminal coding region. *Eur J Biochem* 205:333-340.
10. Brandt P, Neve R, Kammesheidt A, Rhodas R E y Vanaman T C (1992) Analysis of the tissue-specific distribution of mRNAs encoding the plasma membrane calcium-pumping ATPases and characterization of an alternative spliced form of PMCA4 at cDNA and genomic levels. *J Biol Chem* 267:4376-4385.
11. Khan I y Grover A K (1991) Expression of cyclic-nucleotide-sensitive and insensitive isoforms of the plasma membrane Ca²⁺ pump in smooth muscle and other tissues. *Biochem J* 277:345-349.
12. Stauffer T P, Hilfiker H, Carafoli E y Strehler E E (1993) Quantitative analysis of alternative splicing options of human plasma membrane calcium pump genes. *J Biol Chem* 268:25993-26003.
13. Keeton T P, Burk S E y Shull G E (1993) Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C-termini of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms 1, 2, 3, and 4. *J Biol Chem* 268:2740-2748.
14. Adamo H P y Penniston J T (1992) New Ca²⁺ pump isoforms generated by alternative splicing of rPMCA2 mRNA. *Biochem J* 283:355-359.
15. Enyedi A, Verma A K, Heim R, Adamo H P, Filoteo A G, Strehler E E y Penniston J T (1994) The Ca²⁺ affinity of the plasma membrane Ca²⁺ pump is controlled by alternative splicing. *J Biol Chem* 269:41-43.

DISCUSION

I. ANALISIS TERMICO DEL EFECTO DEL COLESTEROL Y EL CALCIO EN LA ESTABILIDAD DE LA ATPasa-Ca²⁺

Los resultados señalan que el aumento en el contenido de colesterol estabiliza a la ATPasa Ca²⁺/Mg²⁺ de microsomas cardíacos contra la inactivación y la desnaturalización térmica. El aumento en el contenido de colesterol en las membranas microsomales provoca que las curvas de inactivación de la ATPasa Ca²⁺/Mg²⁺ se desplacen a temperaturas más altas, por lo tanto, la T_i que corresponde a la temperatura donde la enzima muestra 1/2 de la actividad inicial se alcanza a temperaturas más altas. Además, el colesterol provoca una disminución en las velocidades de inactivación de la enzima. Este no es un efecto exclusivo para esta enzima, también se ha demostrado que el colesterol provoca un aumento en la estabilidad térmica de la ATPasa-Ca²⁺ de retículo sarcoplásmico (Cheng y col, 1987), así como otras proteínas membranales como el receptor para acetil colina (Artigues y col, 1989), la banda 3 del eritrocito (Maneri y Low, 1988) y la UDP-glucoronil transferasa (Rotenberg y Zakim, 1991). Por otro lado, los perfiles de desnaturalización de membranas control y membranas enriquecidas en colesterol, obtenidos por medio de calorimetría diferencial de barrido, muestran un pico con una temperatura de transición cercana a los 60°C, la cual se desplaza aproximadamente 2°C en las membranas enriquecidas con colesterol. Este componente puede corresponder o contener a la ATPasa Ca²⁺/Mg²⁺, debido a que su temperatura de transición es muy cercana a la temperatura de inactivación de la enzima. La diferencia en la T_m es mayor (2°C), en relación a la diferencia de la temperatura de inactivación de la enzima (1-1.4°C), en membranas control y membranas enriquecidas con colesterol. Aunque los cambios observados son pequeños, son significativos, lo que indica que los cambios inducidos por el colesterol pueden ser

DISCUSION

I. ANALISIS TERMICO DEL EFECTO DEL COLESTEROL Y EL CALCIO EN LA ESTABILIDAD DE LA ATPasa-Ca²⁺

Los resultados señalan que el aumento en el contenido de colesterol estabiliza a la ATPasa Ca²⁺/Mg²⁺ de microsomas cardíacos contra la inactivación y la desnaturalización térmica. El aumento en el contenido de colesterol en las membranas microsomales provoca que las curvas de inactivación de la ATPasa Ca²⁺/Mg²⁺ se desplacen a temperaturas más altas, por lo tanto, la T_i que corresponde a la temperatura donde la enzima muestra 1/2 de la actividad inicial se alcanza a temperaturas más altas. Además, el colesterol provoca una disminución en las velocidades de inactivación de la enzima. Este no es un efecto exclusivo para esta enzima, también se ha demostrado que el colesterol provoca un aumento en la estabilidad térmica de la ATPasa-Ca²⁺ de retículo sarcoplásmico (Cheng y col, 1987), así como otras proteínas membranales como el receptor para acetil colina (Artigues y col, 1989), la banda 3 del eritrocito (Maneri y Low, 1988) y la UDP-glucoronil transferasa (Rotenberg y Zakim, 1991). Por otro lado, los perfiles de desnaturalización de membranas control y membranas enriquecidas en colesterol, obtenidos por medio de calorimetría diferencial de barrido, muestran un pico con una temperatura de transición cercana a los 60°C, la cual se desplaza aproximadamente 2°C en las membranas enriquecidas con colesterol. Este componente puede corresponder o contener a la ATPasa Ca²⁺/Mg²⁺, debido a que su temperatura de transición es muy cercana a la temperatura de inactivación de la enzima. La diferencia en la T_m es mayor (2°C), en relación a la diferencia de la temperatura de inactivación de la enzima (1-1.4°C), en membranas control y membranas enriquecidas con colesterol. Aunque los cambios observados son pequeños, son significativos, lo que indica que los cambios inducidos por el colesterol pueden ser

suficientes para contribuir en un aumento de la resistencia de la enzima a la inactivación y desnaturalización.

El proceso de inactivación de la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ es irreversible, por lo que este fenómeno puede ser explicado por un modelo de dos pasos $\text{N} \rightarrow \text{D}$, donde no existen estados intermediarios y tampoco existe un equilibrio entre el estado nativo y el estado desnaturalizado o inactivo. En estas condiciones, la desnaturalización causada por la temperatura provoca cambios en la estructura de la proteína, de tal manera que al enfriar la muestra, la enzima ya no es capaz de recuperar su conformación nativa. Las diferencias en las temperaturas de inactivación y las temperaturas de transición durante la desnaturalización se pueden entender de la siguiente manera, la pérdida de actividad puede estar asociada al desdoblamiento de algún dominio esencial para la catálisis de esta ATPasa. La otra interpretación posible es que la inactivación de la enzima es el resultado de un estado parcialmente desdoblado generalizado. Los resultados también demuestran que el aumento en el contenido de colesterol provoca que la desnaturalización de la enzima se alcance a temperaturas más altas, al igual que la inactivación. Los experimentos de calorimetría diferencial de barrido, realizados con el fin de demostrar reversibilidad en la desnaturalización de la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, demuestran que se trata de un proceso fuertemente irreversible. Después de calentar las muestras a 100°C , enfriar y calentar nuevamente, ya no se observa transición alguna, sugiriendo que no existe repliegamiento de las proteínas membranales. Tampoco se encontró renaturalización después de calentar en intervalos de 50 a 70°C . Por lo tanto, la desnaturalización de esta enzima se ajusta a un modelo de transición de dos o posiblemente tres estados, donde la desnaturalización es precedida de un intermediario desdoblado inestable, que pasa al estado desnaturalizado. Este último paso de la reacción es totalmente irreversible, desplazando la reacción hacia el estado desnaturalizado.

Por otro lado, los perfiles de desnaturalización térmica de las membranas microsomales, obtenidos por medio de calorimetría diferencial de barrido, sugieren que el colesterol puede tener un efecto estabilizador no solo en la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, sino también en varias proteínas membranales. Al incorporar colesterol en las membranas, el perfil de desnaturalización se desplaza hacia temperaturas más altas, pero además se observa un cambio en la forma de estos perfiles, lo que sugiere que el colesterol induce cambios en la desnaturalización de diversas proteínas membranales.

El mecanismo por el cual el colesterol promueve una estabilidad en la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ de microsomas cardíacos por el momento se desconoce. Sin embargo, los resultados se pueden explicar en varios contextos. Experimentos realizados con bicapas lípidas han demostrado que la inclusión de colesterol provoca un aumento en el grosor de las bicapas (McIntosh, 1978). La actividad de la ATPasa- Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico, la ATPasa- Na^+, K^+ y el transportador de glucosa del eritrocito muestran una fuerte dependencia en la longitud de los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos empleados para reconstituir a estas proteínas (Carrutera y Melchior, 1986; Johannsson y col, 1981a; 1981b). Cadenas hidrocarbonadas más cortas o más largas de 18 carbonos, producen una disminución en la actividad. Por otro lado, también se ha encontrado que la desnaturalización de proteínas como la banda 3 del eritrocito y la citocromo oxidase, tiene una dependencia del tamaño de los ácidos grasos. Los ácidos grasos de cadena larga y saturados provocan que las temperaturas de desnaturalización se alcancen a temperaturas más altas (Maneri y Low, 1988; Rigell y Freire, 1987; Morin y col, 1990). Por lo tanto, una posible hipótesis puede ser que el aumento en la estabilidad de la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ en las membranas enriquecidas con colesterol, se debe a un aumento en el grosor de las membranas.

La inclusión de colesterol en membranas modelo reduce la hidratación y la penetración de agua en la bicapas (Simon y col, 1982). Estudios realizados en micelas invertidas con proteínas membranales y solubles,

demuestran que al disminuir el contenido de agua, las enzimas son más estables a la inactivación térmica (Ayala y col, 1986; Garza-Ramos y col, 1989). Es posible que el aumento en el contenido de colesterol en la membranas microsomales reduzca la hidratación de estas membranas, propiciando una mayor estabilidad de la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ y otras proteínas membranales. Por otro lado, estudios realizados con el receptor de acetil colina y con varias proteínas de la membrana del eritrocito, demuestran que al aumentar el contenido de colesterol en las membranas aumenta el contenido de α -hélice en estas proteínas (Fong y McNamee, 1987; Rooney y col, 1984). Para el receptor de acetil colina se ha encontrado que existe una interacción directa colesterol-proteína, de tal manera que el receptor se inactiva y muestra una alta sensibilidad al ser reconstituido en liposomas carentes de colesterol (Fong y MacNamee, 1988). Por medio de análisis térmico también se ha demostrado que la interacción del colesterol con el receptor de acetil colina es directa (Artigues y col, 1989). Por lo tanto, la interacción directa del colesterol con la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ puede constituir otro mecanismo potencial que promueva una mayor estabilidad de esta enzima. Los experimentos realizados con la enzima aislada, donde se encuentra en dispersiones de fosfolípidos pero no incorporada en liposomas apoyan esta última posibilidad. En esas condiciones, la presencia de colesterol en las dispersiones de fosfolípidos propicia que las velocidades de inactivación de la ATPasa- Ca^{2+} aislada disminuyan, al igual que los valores aparentes de ΔH y ΔS . En presencia de este esteroide la ΔH aparente de transición disminuye aproximadamente 14 kcal/mol y la ΔS aparente disminuye cerca de 50 cal/mol. La disminución del cambio entálpico puede indicar una menor energía liberada durante la transición de la enzima de activa a inactiva, que a su vez podría estar asociado con un menor desdoblamiento o desnaturalización de esta proteína. La otra opción es que el colesterol induzca una transición menos cooperativa, reflejada en una

disminución en la entalpía. Los valores de ΔS sugieren que la interacción con colesterol podría inducir un estado más ordenado de la enzima. Con base en estos cambios observados y en la sensibilidad diferente que la enzima muestra a la temperatura, es posible pensar que existan interacciones ATPasa- Ca^{2+} -colesterol. Sin embargo, la posibilidad de que varios de estos mecanismos potenciales esten participando en la estabilidad de la enzima, no se puede descartar.

Al llevar a cabo experimentos con la ATPasa- Ca^{2+} aislada a partir de sarcolema cardíaco, se encontró que la enzima se inactiva por completo a temperaturas cercanas a los 50°C . En esas condiciones donde la enzima esta soluble, muestra una alta sensibilidad a la temperatura, mientras que en las membranas microsomales nativas, la enzima muestra una gran estabilidad. En las membranas la enzima se inactiva por arriba de los 60°C . En general se ha encontrado que en condiciones nativas y en extractos crudos, la estabilidad de las proteínas es mayor (Segel, 1975). Para proteínas de membrana como la citocromo oxidasa y la fosfodiesterasa alcalina, se ha observado que en estado soluble muestran una menor estabilidad, en relación a cuando se encuentran en las membranas (Rigell y col, 1985; Belli y col, 1994). Esto sugiere que la integridad de la membrana es una parte esencial para mantener la estructura, función y estabilidad de estas proteínas. Es probable que ciertas áreas de la proteína se desdoblen o el plegamiento no sea el mismo, en relación al estado nativo en las membranas, lo que puede desestabilizar a la proteína, por esta razón se requiere menos energía para pasar de un estado activo a un estado inactivo. En la ATPasa- Ca^{2+} aislada, el colesterol también propicia una disminución en las velocidades de inactivación. La interacción con este esteroles propicia cambios en la entalpía y la entropía durante la transición. Esto último podría sugerir que este lípido podría estar interaccionando con la enzima y propiciar cambios en su estructura reflejados en una sensibilidad diferente a la temperatura.

Sin embargo, encontramos que para la enzima aislada, más que el colesterol, la unión de calcio es un factor muy importante en la estabilidad de esta ATPasa. En ausencia de Ca^{2+} la temperatura de inactivación es de 46.4°C , mientras que en presencia del catión 48.8°C . La unión de Ca^{2+} a la enzima provoca que la T_i aumente 2.4°C , este es un cambio considerable para una proteína aislada. Además de provocar cambios en las temperaturas de inactivación, experimentos realizados a diferentes temperaturas demuestran, que la unión del Ca^{2+} provoca una disminución en las velocidades de inactivación de la enzima, observándose a cada temperatura y tiempo de preincubación mayor estabilidad de la enzima. Estos experimentos nos permitieron calcular diferentes parámetros termodinámicos aparentes (ΔH , ΔS y ΔG). La inactivación térmica de la ACMP en presencia de calcio muestra un ΔH aparente de 90.8 kcal/mol , mientras que en ausencia de este catión el valor es de 83.6 kcal/mol . Esto sugiere que la salida del Ca^{2+} de la enzima va acompañado de un fuerte cambio entálpico del orden de 7 kcal/mol . El calcio también induce un aumento en el cambio entrópico durante la inactivación térmica de la enzima, que a su vez puede estar dado por la liberación del catión de la enzima al medio.

Los valores aparentes de ΔH y ΔS de activación son similares a los reportados para la desnaturalización reversible de la tripsina y quimotripsina (Privalov, 1982). Esto podría indicar que la inactivación de la ATPasa- Ca^{2+} es comparable cinéticamente a la desnaturalización reversible de una proteína de aproximadamente 25 kDa . Si consideramos que la ATPasa- Ca^{2+} es una proteína de $137\text{-}140 \text{ kDa}$, entonces estos valores podrían sugerir que la inactivación se debe al desdoblamiento de algún dominio de la enzima o a una desnaturalización parcial generalizada. La unión de este catión al sitio activo de la enzima podría inducir cambios estructurales, lo que a su vez puede provocar una mayor estabilidad de la enzima. Es probable que la unión de calcio favorezca un estado más "empacado" de la enzima, un

estado que requiere más energía para desdoblarse. La otra posible interpretación es que la presencia del Ca^{2+} propicie que la transición activo-inactivo sea más cooperativa, es decir que ocurra en un intervalo más pequeño de temperatura. Las curvas de inactivación en función de la temperatura sugieren que esta puede ser una posible interpretación. Debido a que en presencia de Ca^{2+} , aunque la inactivación de la enzima se alcanza a temperaturas más altas, el cambio es más agudo en comparación con las curvas obtenidas en ausencia de Ca^{2+} . Para proteínas globulares pequeñas, se ha encontrado que su transición durante la desnaturalización es muy cooperativa, ya que se trata de proteínas con estructuras muy empacadas, donde existen diferentes interacciones que contribuyen a mantener la estructura globular nativa (Privalov, 1979). Para la ATPasa- Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico se ha observado que la unión de calcio provoca cambios en el perfil de desnaturalización de la proteína. En presencia del catión, la desnaturalización muestra dos componentes o dominios, mientras que en ausencia de calcio la desnaturalización muestra un solo componente (Lepock, 1990). Para otras proteínas también se ha encontrado que el calcio induce cambios estructurales que llevan a una mayor estabilidad, como es el caso de la fosfodiesterasa alcalina (Belli y col, 1994), subtilisina (Pantoliano y col, 1988), lisozima (Kuroki y col, 1989) y la α -lactoglobulina (Mitani y col, 1986). Para estas proteínas se ha demostrado, por medio de cristalografía que la unión de calcio provoca cambios estructurales que conducen a una mayor estabilidad.

Cuál puede ser el significado funcional de los resultados encontrados?

Estudios realizados con diversos organismos procariontes han demostrado que como respuesta a los cambios de temperatura, estos microorganismos son capaces de cambiar la composición de ácidos grasos de sus membranas. Al crecer en temperaturas altas, muestran un alto contenido de ácidos grasos de cadena larga y saturados, mientras que al crecer a

temperaturas bajas, la proporción de ácidos grasos de cadena corta y el número de insaturaciones aumenta (para revisión de este tema ver McElhaney, 1985). Esto indica que estos microorganismos son capaces de regular las propiedades de sus membranas, por medio de la síntesis *de novo* de fosfolípidos. Por su parte, las bacterias termófilas, presentan en sus membranas lípidos ramificados y de cadenas hidrocarbonadas largas, lo que les permite mantener la integridad de sus membranas y vivir a temperaturas sumamente altas (Langworthy, 1982). En el caso de las células de mamífero, se piensa que el colesterol lleva a cabo parte de este efecto amortiguador de las propiedades físicas de las membranas con respecto a los cambios de temperatura. Por arriba de la temperatura de transición de los fosfolípidos, el colesterol puede actuar como un agente condensante, mientras que por debajo de la temperatura de transición de las membranas, el colesterol tiene un efecto fluidizante (Demel y de Kruffy, 1976). Al parecer los mamíferos han escogido al colesterol como una molécula que puede regular las propiedades físicas de las membranas en un intervalo amplio de temperatura sin tener que recurrir a la síntesis *de novo* de fosfolípidos.

Estudios realizados con varias líneas celulares de murino demuestran que a mayor contenido de colesterol en la membrana plasmática la muerte celular por hipertermia disminuye (Cress y Gerner, 1980). Para varias líneas celulares cancerosas se ha encontrado que el contenido de colesterol de sus membranas está elevado, por consiguiente las propiedades físicas y funcionales de sus membranas están alteradas (Shinitzky, 1978; Galeoti y col, 1986; Coleman, 1986). En esas condiciones patológicas se podría pensar que la estabilidad de las proteínas membranales puede ser mayor. Al parecer en este tipo de células existe una paradoja, porque niveles altos de colesterol en las membranas correlaciona con una inhibición de la ATPasa- Ca^{2+} (Ortega y Mas-Oliva, 1984, 1986), la ATPasa- Na^+, K^+ (Yeagle, 1983) y otras proteínas membranales. Esto sugiere la posibilidad de que en las membranas de

algunas células cancerosas estas enzimas tienen baja actividad, lo que explicaría en parte el nivel alto de calcio citoplásmico que se ha encontrado en varios tipos de células cancerosas. Pero también, es posible que el nivel alto de colesterol en las membranas de algunos tipos de células neoplásicas, contribuya a que la estabilidad de diversas proteínas membranales sea mayor. Existen otros tipos celulares que de manera natural presentan concentraciones altas de colesterol en sus membranas, como el eritrocito, los hepatocitos y los túbulos transversos de la células musculares. En estas membranas sería interesante extraer colesterol y estudiar la actividad y estabilidad de sus proteínas. Esto permitirá comprobar si los efectos del colesterol encontrados en el presente trabajo pueden ser extensivos a otras proteínas membranales.

II. ANALISIS MOLECULAR DE LA ATPasa-Ca²⁺ DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Se relizaron múltiples análisis (screenings) de la biblioteca de corazón fetal de humano, pero no fue posible obtener la secuencia completa del ADNc que codifica para la ACMP. Se obtuvieron clonas que contienen secuencias del extremo 3' y de la parte central del mensajero, sin embargo no fue posible aislar clonas que contuvieran secuencias del extremo 5' del mensajero que codifica para esta enzima. Esto sugiere que los mensajeros a partir de donde se construyó la biblioteca podrían estar parcialmente degradados. El otro factor puede ser que se trata de una enzima muy poco abundante, en la membrana plasmática la ATPasa-Ca²⁺ constituye del 0.05 al 0.1% del total de proteína, dependiendo del tipo celular. Por lo tanto, la probabilidad de encontrar mensajeros que codifiquen para esta enzima es sumamente baja. Debido a la imposibilidad de concluir con la secuencia del ADNc que codifica para la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática, decidimos dar otro enfoque

al proyecto y estudiar la expresión de los genes que codifican para esta enzima durante el desarrollo fetal del corazón de humano.

IIa. Análisis de la expresión de los mensajeros que codifican para la ACMP en el corazón de humano

Los resultados obtenidos por medio de PCR muestran que existen cambios evidentes en el patrón de expresión de los mensajeros que codifican para la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática durante el desarrollo fetal del corazón de humano. La comparación de la distribución de las variantes de la ACMP1, nos permite concluir que la variante 1b se expresa de manera constitutiva a lo largo del desarrollo del músculo cardíaco, mientras que la variante 1c se expresa a partir de las 12 semanas de desarrollo fetal. Es posible que esta variante este relacionada con funciones específicas en el corazón, sin embargo por el momento se desconoce. La distribución de las variantes generadas a partir del gen 2 (2a, 2b y 2c), muestran un patrón de expresión más específico, debido a que únicamente se detectaron en muestras de corazón de adulto. Las variantes generadas a partir de este gen no se detectaron en corazón en estados fetales y tampoco en placenta. El significado funcional de la presencia de mensajeros provenientes del gen 2 en el tejido cardíaco adulto no es claro, principalmente porque la abundancia de estos mensajeros es sumamente baja. Los mensajeros correspondientes a este gen, constituyen menos del 10% del total de los mensajeros que codifican para la ACMP (Stauffer y col, 1993).

Los resultados de PCR, también nos permiten concluir que las variantes generadas a partir del gen 3 no se expresan en el tejido cardíaco de humano en ninguna de las etapas de desarrollo estudiadas, al igual que en placenta de humano. Estos resultados estan de acuerdo a estudios previos reportados en la literatura, que demuestran que los mensajeros correspondientes a este gen únicamente se detectan en cerebro y en músculo esquelético fetal en humano (Stauffer y col, 1993). Para el caso de la rata,

también se han detectado en cerebro, músculo esquelético y testículo (Greeb y Shull, 1989).

De manera análoga a la variante 1b, la variante 4b se expresa constitutivamente en los tejidos analizados, tanto en corazón, como en placenta de humano. La variante 4a y la nueva variante 4d, no se detectaron en corazón fetal de 8 semanas, y su nivel de expresión es apenas detectable a las 12 semanas. Sin embargo, su expresión va en aumento a medida que progresa el desarrollo. En la etapa adulta, cada una de estas variantes constituye aproximadamente el 30% de los mensajeros provenientes del gen 4. La expresión de estas variantes, puede responder a la presencia de factores de transcripción específicos para músculo cardíaco. En el estado indiferenciado de células musculares en cultivo (C2C12 y Sol 8), únicamente se expresa la variante 4b, mientras que al inducir la diferenciación de estas células a miotubos, se expresan las variantes 4a y 4d. Así mismo, al transfectar fibroblastos con factores de transcripción miogénicos, se induce la expresión de las variantes 4a y 4d (Dr. Zarain-Herzberg, comunicación personal).

Estudios previos realizados con tejidos de humano y de rata, han demostrado que las variantes 1b y 4b se expresan en todos los tejidos, por lo que se ha sugerido que estas variantes se expresan de manera constitutiva en todas las células. Mientras que la expresión de las otras variantes de los genes 1 y 4, así como la expresión de los genes 2 y 3 es exclusiva de algunos tejidos y estados diferenciados de algunas líneas celulares (Stauffer y col, 1993; Brandt y col, 1992a; Keeton y col, 1993; Hammes y col, 1994). Nuestros resultados confirman nuevamente estos hallazgos, debido a que las variantes 1b y 4b se detectaron, en todos los estadios de desarrollo del corazón y en placenta. Sin embargo, las variantes 1a, 4a y 4d se expresan después de 12 semanas de desarrollo, mientras que las variantes generadas a partir del gen 2, se expresan únicamente en tejido cardíaco adulto.

Sin duda alguna, el resultado más sobresaliente del presente trabajo corresponde a la descripción de una nueva variante codificada por el gen 4, denominada 4d. Esta variante se origina por el corte y empalme alternativo del exón C de 178 pb, codificado por el gen 4. A diferencia de la variante 4b donde se excluye este exón, o de la variante 4a donde se incluye completamente el exón C, en la variante 4d únicamente se incluyen 108 pb del exón C. Este fenómeno se da por la presencia de una secuencia GTA que funciona como donador interno, localizada a 108 pb del inicio del exón C. Esto provoca un cambio en el marco de lectura de la proteína, lo que puede dar origen a un polipéptido más grande en 36-37 residuos en relación al producto codificado por la variante 4b. Sin embargo, lo interesante de esta nueva variante (4d), no es simplemente que constituye la proteína más grande codificada por el gen 4, sino que la región de unión a calmodulina y el resto del carboxilo terminal de la proteína son diferentes en relación a las variantes 4a, 4b o 4g. En la secuencia del mensajero proveniente del gen 4 existe otro sitio donador interno potencial (GTA), localizado 25 nucleótidos antes de donde se lleva a cabo el corte y empalme de la variante 4d. Este sitio donador interno potencial podría dar origen a una variante similar a la variante 1c; sin embargo, esta variante no se detectó en este estudio y tampoco se ha encontrado en trabajos realizados por otros autores. Aunque existe el sitio potencial para corte y empalme, la posible variante 4c no se genera. Lo que confirma una vez más que el proceso de corte y empalme es altamente específico. La presencia de sitios donadores internos en el exón C, no es exclusivo del gen 4, este proceso también se observa en el corte y empalme del mensajero del gen 1, de esta manera se generan las variantes 1c, 1d y 1e (Stauffer y col, 1993).

No obstante toda esta diversidad de variantes que se generan por el corte y empalme alternativo de los mensajeros, es posible establecer un patrón común o constante en el procesamiento de cada uno de los productos de estos genes. A nivel de sitio A, el corte y empalme se da básicamente por la

inclusión o exclusión de un exón de aproximadamente 40 pb en los 4 genes, con excepción del gen 1 donde únicamente se expresa el ARNm que incluye este exón. A nivel de sitio C, la generación de variantes, está dada por un exón de 154 pb para los genes 1 y 3, 178 pb para el gen 4 y 225 pb para el gen 2. Sin embargo, en este sitio el corte y empalme es más complejo, debido a la presencia de secuencias que funcionan como donadores internos en los genes 1 y 4, lo que genera una mayor cantidad de variantes.

También es importante comentar que el corte y empalme de los mensajeros y por consiguiente las diferencias entre variantes, se da en regiones o sitios involucrados en la regulación de la actividad de la enzima. El sitio A, que se encuentra cerca de la región de regulación por fosfolípidos ácidos y el sitio C, que comprende la región de interacción con calmodulina y parte del carboxilo terminal. Estas regiones son específicas de la ACMP y no se encuentran en otras ATPasas transportadoras de iones del tipo P. El corte y empalme alternativo de los mensajeros de la ACMP no incluye regiones o secuencias altamente conservadas en las ATPasas de tipo P, como son: sitio de unión de ATP, sitio de formación del intermediario fosforilado, o en otras regiones que están involucradas directamente en la catálisis de la enzima. La explicación parece muy simple, la exclusión de una secuencia que codifica para el sitio de unión al ATP, o al sitio de fosforilación, daría como resultado una proteína no funcional. Esto ha quedado demostrado categóricamente en un gran número de estudios de mutagénesis dirigida, realizados con algunas ATPasas tipo P. Las mutaciones en las secuencias involucradas en la unión de ATP o de formación del intermediario fosforilado, producen proteínas no funcionales (Maruyama y MacLennan, 1988; Ohtsubo y col, 1990; Rao y Slayman, 1993).

Iib. Posibles implicaciones funcionales del corte y empalme alternativo de los mensajeros que codifican para la ACMP

La región de corte y empalme A se encuentra adyacente al sitio o secuencia de la enzima que interacciona con fosfolípidos (Strehler, 1991; Carafoli y Stauffer, 1994). Sin embargo, los efectos del corte y empalme alternativo a nivel de sitio A, aun no han sido estudiados a nivel de proteína, pero se podría pensar que la inserción de aminoácidos en esta región, podría provocar un cambio estructural, lo que a su vez pudiera tener efectos en la interacción de la enzima con los fosfolípidos (Carafoli y Stauffer, 1994). La forma de probar esta hipótesis será la expresión *in vitro* de diversas variantes de esta enzima, que incluyan o excluyan el exón a nivel de sitio A, y estudiar la regulación de la actividad de la ACMP por fosfolípidos.

El corte y empalme alternativo a nivel de sitio C provoca cambios en la región donde la enzima se une a la calmodulina, así como en el extremo carboxilo terminal. Debido a que la regulación de la ACMP por calmodulina es una característica que distingue a esta enzima de otras ATPasas tipo P, un gran número de estudios se han enfocado en caracterizar la región donde la calmodulina se une a la ACMP. Estudios iniciales de proteólisis controlada demostraron que el corte del extremo carboxilo terminal provoca una enzima truncada, totalmente activa e insensible a la calmodulina (Carafoli y Zurini, 1982; Benaim y col, 1984). Al deducir la estructura primaria de la ACMP y con toda la información acumulada de diferentes proteínas que unen calmodulina, fue relativamente fácil asignar la secuencia de aminoácidos involucrados en la unión con calmodulina. El sitio de unión a calmodulina de la ACMP está comprendido por 28-30 aminoácidos, dividido en dos subdominios A y B, de aproximadamente 15 residuos cada uno (Shull y Greeb, 1988; Enyedi y col, 1989, 1991). Estas secuencias son ricas en aminoácidos básicos y aminoácidos hidrofóbicos, y tienden a formar hélices alfa anfífilas, por lo que cumplen las características de las secuencias que unen calmodulina (O'Neil y DeGrado, 1988).

El subdominio A de unión a calmodulina está comprendido por 18 aminoácidos y tiene la misma secuencia en todas las variantes generadas a partir de los genes 1 y 4 (Fig. 7). Es interesante, que al final del subdominio A (secuencia QTQ), se lleva a cabo la inserción parcial o total del exón C (variantes 4d y 4a, respectivamente), o la exclusión de este exón (variante 4b). Esto provoca que la secuencia contigua al sitio de corte y empalme difiera, en especial la secuencia del subdominio B de unión a calmodulina. Para las variantes 4a, 4g y 4d esta secuencia es la misma, mientras que para la variante 4b es diferente (Fig.7). La diferencia principal consiste en el remplazo de dos lisinas por un aspártico y una asparagina, lo que provoca un cambio en la carga neta del subdominio B. El subdominio B de las variantes 4a, 4g y 4d tiene una carga de -1, mientras que para la variante 4b +2.

Estudios realizados con péptidos sintéticos, han demostrado que la secuencia de aminoácidos contigua al sitio de corte y empalme del exón C es muy importante y participa en la regulación de la unión de calmodulina. El péptido sintético C28R2, cuya secuencia es similar a la secuencia de la región de unión a calmodulina de la variante 4b (Fig.7), tiene una K_D de interacción péptido-calmodulina de 1 μM ; mientras que el péptido sintético C28R1, cuya secuencia es similar a las variantes 4a, 4g y 4d (Fig. 7), tiene una K_D de 15 μM (Enyedi y col, 1991). Al parecer, la presencia de un ácido aspártico y un residuo de asparagina en lugar de una lisina y una arginina en el subdominio B, provoca una disminución en la afinidad por calmodulina (Enyedi y col, 1991).

Estudios muy recientes realizados con varias isoformas y mutantes truncadas de la ACMP4 han aportado información muy valiosa en este sentido. La concentración de calmodulina para producir 1/2 de la activación máxima de la ACMP4a es 7 veces mayor que la requerida por la variante 4b, con $K_{0.5}$ para calmodulina de 125.9 y 17.8 μM respectivamente. En presencia de calmodulina la variante 4b muestra una mayor afinidad por el Ca^{2+} en relación a la variante 4a; con una $K_{0.5}$ para el calcio de 0.25 y 0.8 μM

respectivamente (Enyedi y col, 1994). Es decir la variante 4b tiene una mayor afinidad por calmodulina y por Ca^{2+} en comparación con la variante 4a.

Sitio 1		
ACMP4a/4d/4g	<u>LRRGQILWFRGLNRIQTQ</u>	<u>IDVINTFOTG</u>
ACMP4b	LRRGQILWFRGLNRIQTQ	IKVVKAFHSS
ACMP1a/c/d	<u>LRRGQILWFRGLNRIQTQ</u>	<u>MDVVNAFQSG</u>
ACMP1b	LRRGQILWFRGLNRIQTQ	IRVVNAFRSS
	Subdominio A	Subdom. B
Sitio 2		
ACMP4d	<u>LRRQNMGOHLDVKLVPSSSY</u>	IKVVKAFHSS
ACMP4a/g	<u>LRRQNMGOHLDVKLVPSSSYVAVAPVKSSPTTSVP</u>	
ACMP1c	<u>LRRQPSIASOHHD</u>	IRVVNAFRSS
ACMP1d	<u>LRRQPSIASOHHDVTNISTPTH</u>	IRVVNAFRSS
ACMP1a	<u>LRRQPSIASOHHDVTNISTPTHVVFSSSTASTTVG</u>	

PEPTIDOS SINTETICOS

C28W	LRRGQILWFRGLNRIQTQIKVVNAFSSS
C28R2	LRRGQILWFRGLNRIQTQIRVVKAFRSS
C28R1	LRRGQILWFRGLNRIQTQMDVVNAFQSG
I31	SGSIQALRRQPSIASOHHDVTNISTPTHI

Fig.7. Secuencia de los sitios de unión para la calmodulina de diferentes variantes de la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática (ACMP) y algunos péptidos sintéticos empleados en la caracterización de esta enzima.

Además de las diferencias en la secuencia del subdominio B, un estudio reciente realizado con péptidos correspondientes al COOH terminal de las variantes 1a, 1b, 1c y 1e, ha sugerido que el corte y empalme alternativo del exón C en los mensajeros de la ACMP1 puede provocar la "duplicación" del sitio de unión a la calmodulina (Kessler y col, 1992). Este nuevo sitio (sitio 2), está formado por un nuevo subdominio A, combinado con el subdominio original B para las variantes 1c y 1d (Fig.7). La secuencia del "sitio 2" presenta una serie de histidinas, que determinan que la unión de

calmodulina sea pH dependiente, a pHs ácidos los péptidos 1a y 1c muestran afinidades por debajo de 11 nM; mientras que a pH neutro, la variante 1c muestra una mayor afinidad por la calmodulina en relación a la variante 1d. El péptido sintético I31, cuya secuencia es similar a la variante 1a, también muestra dependencia de pH en su unión a la calmodulina, pero tiene una menor afinidad por esta proteína. Para el péptido 1b, el cual no contiene secuencias correspondientes al exón C, la unión de calmodulina es prácticamente independiente del pH (Kessler y col, 1992).

Basado en estas evidencias, para las variantes 4a, 4b, 4d y 4g se puede realizar un análisis similar. De acuerdo a la secuencia, las variantes 4a, 4d y 4g podrían presentar un dominio duplicado de unión a la calmodulina (Fig.7). La expresión *in vitro* de la variante 4a y diferentes mutantes de esta proteína han permitido contestar esta pregunta. Para observar una alta afinidad de unión a calmodulina se requieren 21 aminoácidos adicionales del carboxilo terminal, en combinación con los 28 aminoácidos de los subdominios A y B (Verma y col, 1996) (Fig. 8). Mutantes como la 4a(ct56) que carece de 56 aminoácidos del COOH terminal y por consiguiente del denominado sitio 2 de interacción con calmodulina, tiene una $K_{0.5}$ de activación por calmodulina de 0.3 μM , mientras que la variante 4a tiene una $K_{0.5}$ de 0.102 μM . La mutante 4a(ct44) que presenta únicamente 6 residuos del sitio 2, tiene una $K_{0.5}$ de 0.18 μM (Verma y col, 1996). Esto sugiere que para una activación máxima y para la unión con alta afinidad a calmodulina se requieren 49 aminoácidos incluyendo los 28 residuos del sitio 1 y 21 residuos del sitio 2 (Fig. 7 y 8). Es decir, ambos sitios cooperan en la unión de calmodulina. Este fenómeno también se ha observado para la subunidad γ de la fosforilasa cinasa, donde la unión de la calmodulina se lleva a cabo a través de dos sitios comprendidos en un segmento de 70 aminoácidos (Dasgupta y col, 1989; Trewella y col, 1990).

A diferencia de la variante 4a, para la variante 4b se ha encontrado que para la unión de calmodulina se requieren unicamente los 28 residuos correspondientes a los subdominios A y B del sitio 1 (Fig. 7 y 8). La expresión de mutantes truncadas de la variante 4b ha probado que la presencia de más aminoácidos en el extremo carboxilo del dominio de unión a calmodulina, no contribuye a la unión con calmodulina (Verma y col, 1994). El punto donde el COOH terminal tiene un papel importante es en el fenómeno de autoinhibición de la enzima, como se menciona a continuación.

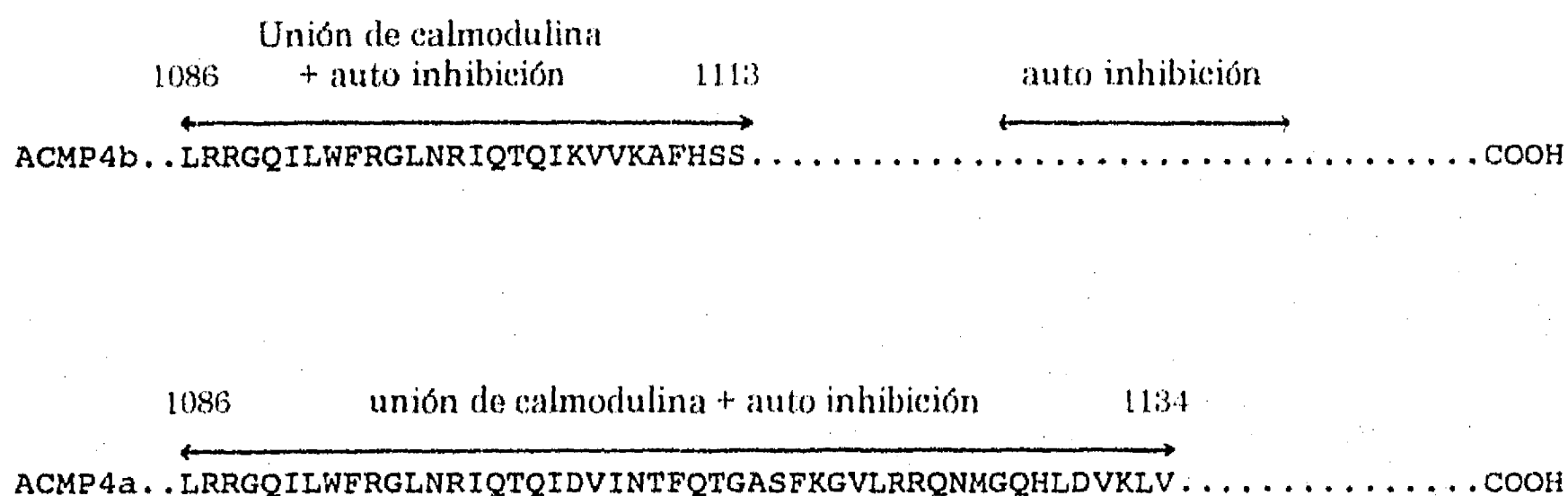


Fig. 8. Diferencias estructurales entre las regiones de unión de calmodulina y autoinhibición de la ACMP4a y ACMP4b. En la ACMP4a la región de unión a calmodulina y auto-inhibición esta comprendida por 49 residuos, mientras que en la variante 4b el dominio de unión de calmodulina consiste de 28 residuos, pero para la autoinhibición completa de la enzima se requieren varios residuos del carboxilo terminal.

Iic. Las secuencias de unión a calmodulina funcionan como autorepresores de la actividad de la ACMP

Diversos estudios realizados con enzimas que son reguladas por calmodulina han demostrado que las secuencias de unión a calmodulina pueden funcionar como autorepresoras de la actividad. Por ejemplo, para la

cinasa de la cadena ligera de miosina, la proteólisis provoca que la actividad de la enzima se estimule (Pearson y col, 1988; Lukas y col, 1986). Al purificar y secuenciar los péptidos obtenidos por proteólisis, se encontró que los péptidos responsables de la autoinhibición corresponden al dominio de unión a calmodulina (Lukas y col, 1986; Blumental y col, 1985).

Para el caso de la ACMP, los experimentos iniciales de proteólisis controlada, demostraron que el corte del carboxilo terminal da como resultado una enzima truncada, totalmente activa e insensible a la calmodulina (Zurini y col, 1984; Benaim y col, 1984; Wang y col, 1989). Esto dió la pauta para suponer que en la región carboxilo terminal de la ACMP se encuentran secuencias que reprimen la actividad de la enzima. Al disecar y probar péptidos pequeños de la región carboxilo terminal, se demostró que en ausencia de calmodulina los dominios de unión a esta proteína funcionan como represores de la actividad de la ACMP (James y col, 1989). Por esta razón la actividad de la enzima en ausencia de calmodulina es menor.

La evidencia experimental también se apoya en el uso de péptidos sintéticos. La adición de péptidos correspondientes a los dominios de unión a calmodulina, provoca una inhibición de la actividad de la enzima truncada, carente del carboxilo terminal. La capacidad de inhibir a la ACMP, está en relación directa con la secuencia de estos péptidos. El péptido C28R2, cuya secuencia es similar a la secuencia del dominio de unión a calmodulina de la variante 4b, tiene una constante de inhibición de 0.1 nM; mientras que el péptido C28R1, cuya secuencia es similar al dominio de las variantes 4a, 4g y 4d, tiene una constante de inhibición de 1 nM (Enyedi y col, 1989, 1991; Vorherr y col, 1992).

Los trabajos recientes, realizados con mutantes truncadas en diferentes partes del carboxilo terminal han venido a confirmar los resultados obtenidos con péptidos sintéticos, pero han aportado información nueva debido que se trata de proteínas funcionales capaces de transportar calcio. Para la variante 4a la región de unión a calmodulina y la secuencia

que produce la autoinhibición se encuentran comprendidas en 50 aminoácidos que incluye los 28 residuos del sitio 1 de unión a calmodulina y 21 residuos extras del carboxilo terminal (Verma y col, 1996). Mientras que para la variante 4b, además de los 28 residuos que participan en la unión de calmodulina, para la autoinhibición se requieren varios aminoácidos más del carboxilo terminal (Verma y col, 1996) (Fig. 8).

La pregunta es, cómo se lleva a cabo la auto inhibición de la ACMP por secuencias que se encuentran en el carboxilo terminal, y que participan en la unión de calmodulina?. Estudios de entrecruzamiento con péptidos modificados, correspondientes a las secuencias de unión a calmodulina, han permitido mapear los sitios donde el carboxilo terminal de la ACMP podría interactuar con otra parte de la enzima para reprimir su actividad. Estos sitios se localizan entre la región donde se forma el intermediario fosforilado y la región de unión de ATP (Falcheto y col, 1992). Esto hace suponer, que al plegarse la ACMP el dominio de unión a calmodulina puede estar lo suficientemente próximo a los dominios citoplásmicos de la enzima e interactuar con estos para bloquear la actividad de la enzima. Al haber calmodulina en el medio se puede unir con el carboxilo terminal de la ACMP y evitar de esta manera que el carboxilo terminal de la enzima se una a los dominios citoplásmicos, evitando con esto la autoinhibición. Esto explica porque la actividad de la enzima en presencia de calmodulina es mayor, y podríamos decir que en realidad la calmodulina es un desrepressor de la actividad de la ACMP, más que un activador de la enzima.

IId. Implicaciones del corte y empalme alternativo en la actividad de la ACMP

Además de las diferencias en la afinidad por calmodulina y el papel del carboxilo terminal en la autoinhibición de las variantes 4a y 4b. Estudios de expresión de estas variantes y de diversas mutantes truncadas en el carboxilo terminal, han demostrado que el corte y empalme alterno de los

mensajeros provenientes del gen 4, puede dar origen a proteínas con afinidad y actividad de transporte de calcio diferente. La variante 4b tiene una afinidad mayor para el calcio en relación a la variante 4a, con una $K_{0.5}$ de 0.25 y 0.84 μM respectivamente (Verma y col, 1994a). Sin embargo, la V_{max} de transporte de calcio de la variante 4b en ausencia de calmodulina es solamente 19% en relación a la observada en presencia de calmodulina, mientras que para la variante 4a es de 42%. La autoinhibición de la variante 4b, observada en ausencia de calmosulina es del 80%, mientras que para la variante 4a es del 58%. Esto indica que en ausencia de la proteína reguladora, la variante 4b muestra solamente un 20% de su actividad, mientras que la variante 4a un 42%. Sin embargo, la variante 4b puede vencer esta adversidad, debido a que tiene una afinidad por calmodulina 10 veces mayor y una afinidad para el calcio casi 3 veces mayor en relación a la variante 4a (Enyedi y col, 1994; Enyedi y col, 1993; Verma y col, 1996). Esto implica que cambios muy pequeños en las concentraciones citoplásmicas de calcio pueden activar preferencialmente a la variante 4b, mientras que para activar a la variante 4a se requiere un aumento mayor en el calcio citoplásmico. Esto explicaría el porque la variante 4a se encuentra únicamente en tejidos excitables, como los son: cerebro, músculo esquelético y cardíaco, que son tejidos que manejan niveles más altos de calcio durante el proceso de excitación celular que antecede ya sea, a la contracción muscular o a la liberación de neurotransmisores. En esas condiciones la ACMP4a puede ser fácilmente activada. Esto también podría explicar el porque la variante 4b se encuentra en todos los tejidos y tipos celulares analizados hasta la fecha. En tejidos no excitables que manejan niveles de calcio bajos, cambios menores en la concentración citoplásmica de calcio pueden activar a la ACMP4b, debido a su gran afinidad por este catión, permitiendo el bombeo del calcio al espacio extracelular. Un caso similar puede darse para las variantes 1b, 1a y 1c, la variante 1b se ha detectado en todos los tejidos estudiados, mientras que las variantes 1a y 1c se detectan solo en algunos

tejidos. Los resultados de PCR indican que a las 8 semanas de desarrollo fetal, únicamente se detectan las variantes 1b y 4b, pero a partir de las 12 semanas se empiezan a detectar las variantes 1a, 4a y 4d. Es posible pensar que en etapas tempranas del desarrollo del corazón (estadios poco diferenciados), los niveles de calcio que este órgano maneja pueden ser bajos en comparación a estados diferenciados. Desafortunadamente no existe información en la literatura que muestre los niveles del calcio citoplásmico en las células cardíacas a lo largo del desarrollo fetal.

Ile. Variante 4d

La variante 4d ofrece características peculiares en la región de unión a calmodulina, debido a que sólo incluye 108 pb del exón C, lo que provoca que la secuencia del subdominio B de unión a calmodulina del "sitio 1" sea idéntica a la variante 4a (Fig. 7). Sin embargo, al no incluir totalmente al exón C, el corte y empalme alternativo provoca que la secuencia del subdominio B del "sitio 2" de unión a calmodulina sea idéntica al subdominio B de la variante 4b (IKVVKAFHSS>) (Fig. 7). Esto sugiere la posibilidad de que el sitio de unión a calmodulina de la variante 4d puede estar formado por 3 subdominios, comprendidos en un espacio de aproximadamente 60 aminoácidos. La otra posibilidad es que la variante 4d pueda unir 2 moléculas de calmodulina en una secuencia comprendida por aproximadamente 60 residuos. Por el momento no se tiene información acerca de las constantes de afinidad para el Ca^{2+} , de unión a la calmodulina y capacidad de autoinhibición para esta variante. Por lo tanto resultará muy interesante expresar la variante 4d para determinar todas sus propiedades cinéticas y constantes de afinidad para Ca^{2+} y calmodulina, debido a que presenta características tanto de la variante 4a, como de la variante 4b en el la región de unión a calmodulina. También resultará interesante demostrar cuantas moléculas de calmodulina une esta variante y como se lleva a cabo el fenómeno de autoinhibición.

IIf. Otras implicaciones del corte y empalme alternativo de los mensajeros que codifican para la ACMP

Además de las diferencias en las secuencias de unión a la calmodulina, las variantes 4a, 4b y 4d, presentan diferencias en la región carboxilo terminal. En el extremo carboxilo terminal de las variantes 4b y 4d, existe una gran abundancia de residuos ácidos (aspárticos y glutámicos), que pudieran tener alguna participación en la unión de calmodulina y en la regulación de la actividad de la enzima. Para la ACMP1b, en el extremo carboxilo terminal se han identificado tres sitios que unen Ca^{2+} con alta afinidad. Estos sitios no tienen una función catalítica, pero se ha pensado que pueden estar involucrados en regular la unión de calmodulina (Hofmman y col, 1994). Esto resulta interesante, debido a que una característica sobresaliente de la calmodulina, es que su unión es dependiente de las concentraciones de Ca^{2+} . Existe la posibilidad de que estas secuencias ácidas tengan algún papel en determinar la mayor afinidad para el calcio y para la calmodulina que muestra la variante 4b, en relación a la variante 4a que carece de estas secuencias. Para poder unirse a las enzimas que regula, la calmodulina requiere calcio, una vez que el calcio se ha unido, la calmodulina expone áreas hidrofóbicas que le permiten interactuar con sus proteínas blanco. Es posible que las secuencias de aminoácidos ácidos del extremo carboxilo terminal de la variante 4b permitan que el calcio sea más fácilmente accesible para la calmodulina. Esto explicaría en parte la mayor afinidad que la variante 4b tiene para la calmodulina.

La actividad de las ACMP también se puede regular por medio de cinasas dependientes de AMPc. El corte y empalme alternativo provoca que únicamente las variantes 4b y 4d presenten una secuencia consenso (**DKAS**) de fosforilación por estas cinasas. La presencia de este sitio de fosforilación puede tener repercusiones importantes en la regulación de la actividad de la

enzima, aunque por el momento no ha sido demostrado. En las variantes 4a y 4g, como producto de la inclusión total del exón C, el marco de lectura encuentra un codon de termino pocos residuos después de concluir este exón, en consecuencia la proteína es más corta y además carece de las secuencias ricas en aminoácidos ácidos y del sitio de fosforilación por cinasas dependientes de AMPc.

Ilg. Variante 4g

La otra variante de interés, encontrada en el presente estudio, es la variante 4g. Esta variante había sido reportada en un estudio previo (Strehler y col, 1990), sin embargo, como no se ha detectado en otros estudios, se interpretó como un artificio de clonación (Keeton y col, 1993; Strehler, 1991; Carafoli, 1992). Lo interesante de la variante 4g es que carece del exón denominado B, el cual codifica para lo que se ha postulado como la secuencia del cruce membranal 10 en el modelo de la ACMP. Si esta variante se expresa en proteína, entonces existen dos posibilidades; una que el carboxilo terminal se encuentre en el espacio extracelular (Fig. 9), lo cual parece poco probable, debido a que la región del carboxilo terminal, donde se encuentra la región de unión a calmodulina, se piensa que está en el citoplasma. La segunda posibilidad consiste en que el modelo de 10 cruces transmembranales, no es el modelo correcto para la ACMP. Es probable entonces, que la enzima cruce solamente 8 veces la membrana, suponiendo que el carboxilo terminal está en la parte citoplásmica (Fig. 9). Una controversia similar se ha desencadenado para otras ATPasas tipo P, en especial para la ATPasa-H⁺ de la levadura y para la subunidad alfa de la ATPasa-Na⁺/K⁺ (Serrano, 1980; Silver y col, 1989). Por lo tanto, en el futuro, el estudio de la variante 4g o de mutantes de las variantes 4a, 4b carentes del supuesto cruce membranal 10, podrían ser de gran utilidad para establecer la posible organización membranal de la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática.

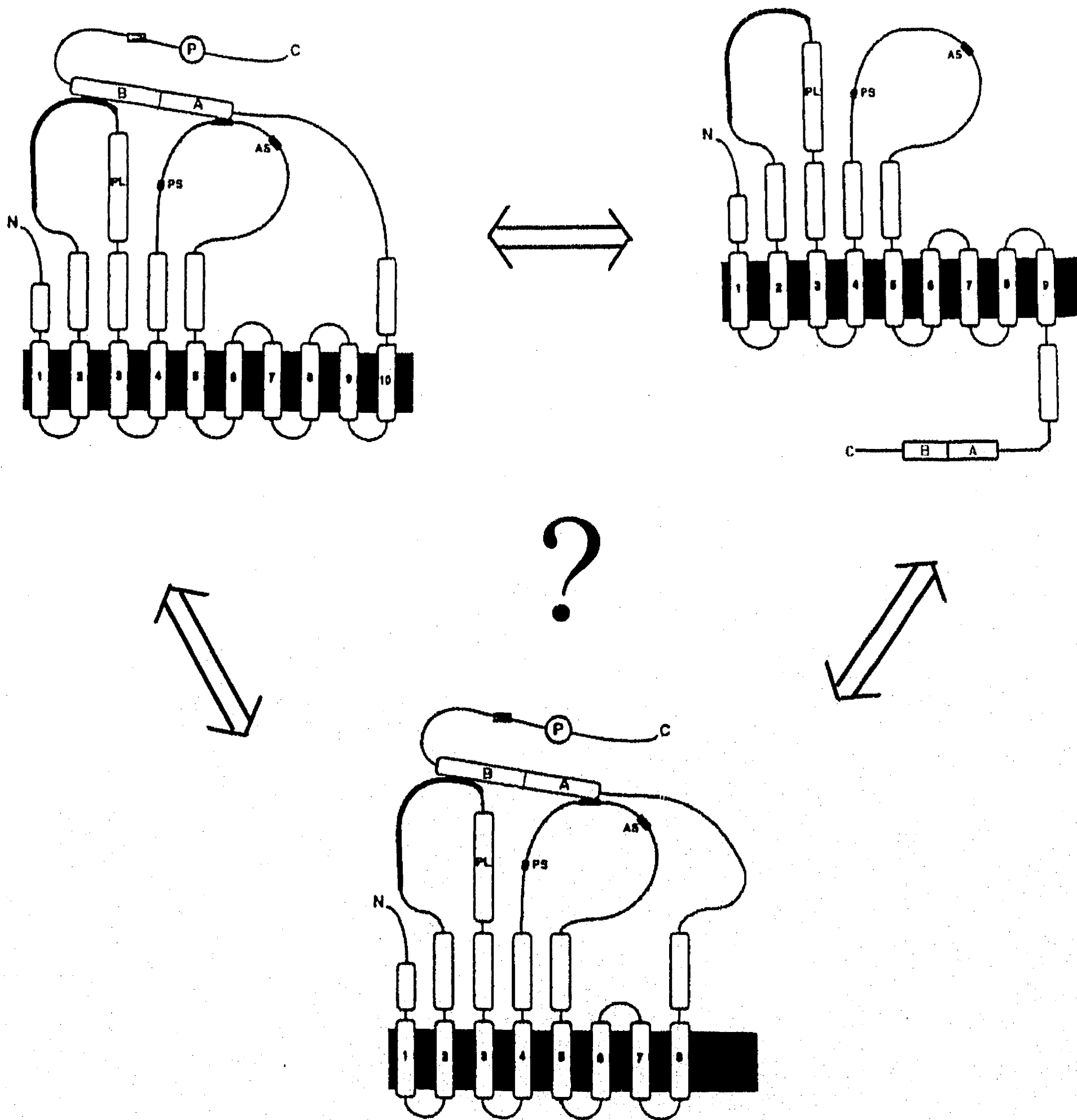


Fig. 9. Posibles modelos para la estructura de la ACMP. Las predicciones de cómputo sugieren que la enzima presenta 10 cruces membranales. Sin embargo, la variante 4g, propone otras dos alternativas; 1) que la enzima cruce 9 veces la membrana y el carboxilo terminal se encuentre en el espacio extracelular; 2) que la ACMP cruce solamente 8 veces la membrana.

CONCLUSIONES

1. La incorporación de colesterol en membranas microsomales de músculo cardíaco provoca un aumento en las temperaturas de inactivación y desnaturalización de la ATPasa $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$.
2. La extracción de la ATPasa- Ca^{2+} de las membranas provoca un incremento en sensibilidad de la enzima por la temperatura.
3. Las temperaturas de inactivación de la enzima aislada son de 10 a 15°C menores en relación a las obtenidas para la enzima contenida en su membrana nativa.
4. El Ca^{2+} estabiliza a la ATPasa- Ca^{2+} aislada de sarcolema cardíaco contra la inactivación térmica.
5. Al encontrarse la enzima aislada en dispersiones de fosfolípidos, el Ca^{2+} provoca un aumento en la entalpía de 7 kcal/mol, mientras que para la enzima presente en dispersiones de fosfolípidos/colesterol el aumento es de aproximadamente 14 kcal/mol.
6. La presencia de Ca^{2+} provoca un incremento en la entropía durante la transición térmica de la ACMP.
7. La inclusión de colesterol en las dispersiones de fosfolípidos provoca una disminución en la entropía durante la transición térmica de la ACMP.
8. Las isoformas PMCA1b y PMCA4b se expresan en todos los estados de desarrollo fetal del corazón de humano.
9. El gen PMCA2 se expresa en corazón de adulto, pero no en estados fetales.
10. El gen PMCA3 no se expresa en corazón de humano.
11. El corazón de humano expresa una nueva variante del gen 4 de la ACMP, denominada por nosotros como 4d. El análisis de las secuencias muestra que esta variante se produce por la inclusión parcial del exón C.
12. La expresión de las variantes 1a, 4a y 4d, se manifiesta a partir de las 12 semanas de desarrollo fetal y el nivel de su expresión aumenta a medida que progresa el desarrollo.

13. La secuencia de los productos de PCR, demuestra que a partir del gen 4, se puede producir una variante que carece del exón B que codifica para el cruce membranal 10, denominada 4g.

14. Las isoformas de la ATPasa- Ca^{2+} de retículo sarco(endo)plásmico, ACRSE2a, ACRSE2b y ACRSE3, se expresan en el tejido cardíaco en todos los estados de desarrollo a nivel constante.

PERSPECTIVAS

Los resultados de desnaturalización térmica sugieren la posibilidad de que el colesterol pueda participar en la estabilidad de varias proteínas membranales. Por lo tanto, resultará interesante estudiar el efecto de este lípido en la actividad y estabilidad de otras proteínas de membrana, sobre todo en sistemas membranales que por naturaleza presentan niveles altos de colesterol, como los túbulos transversos, membranas de eritrocitos y de hepatocitos. La idea será demostrar que el papel del colesterol puede ser extensivo a otras proteínas de membrana. Con base en los resultados encontrados, acerca del efecto del Ca^{2+} en la estabilidad térmica de la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática, pensamos que el análisis térmico, en conjunto con otras metodologías nos podrían aportar información con la intención de mapear y localizar el sitio o sitios de unión para el calcio en esta enzima. En este sentido, la experiencia adquirida en biología molecular podría ser de gran utilidad para pensar en el futuro en la posibilidad de expresar a la ACMP, así como en la posibilidad de construir mutantes que nos permitan mapear estos y otros sitios importantes en la actividad y estabilidad de la enzima.

En el presente trabajo encontramos que las variantes de la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática, presentan diferencias de secuencia, fundamentalmente en el extremo carboxilo terminal. Las diferencias involucran la región de unión a calmodulina, así como regiones ricas en aminoácidos básicos y sitio de fosforilación por proteínas cinasas dependientes de AMPc. Estudios recientes, realizados con proteínas expresadas *in vitro* han demostrado que el corte y empalme alternativo de los mensajeros da origen a variantes con diferente afinidad por el Ca^{2+} y la calmodulina. La variante 4b muestra una mayor afinidad tanto por el calcio, como por la calmodulina, en relación a la variante 4a (Enyedi y col, 1993; 1994; Verma y col, 1994; 1996). Por lo tanto, resultará atractivo el poder

expresar la nueva variante 4d y determinar cuáles son sus características cinéticas, cuáles son sus constantes de afinidad para el calcio y la calmodulina, y qué diferencias presenta en relación a las variantes 4a y 4b. La variante 4g, que carece del exón B que codifica para el propuesto cruce membranal 10, es también de gran interés. La expresión de esta variante, o de mutantes de las variantes 4a o 4b carentes del exón B aportaría información valiosa para determinar la organización membranal de la ACMP. Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la ACMP de células neoplásicas muestra una actividad hidrolítica muy baja, sin embargo presenta una actividad de transporte de Ca^{2+} similar a la encontrada en células normales (Mas-Oliva y col, 1991). Otros reportes en la literatura demuestran que la ACMP de células hepáticas tiene un peso molecular mayor que otros tejidos y es insensible a la calmodulina. Con la experiencia acumulada, hemos iniciado el proyecto para aislar el ADNc que codifica para la ACMP de hepatocitos normales y del hepatoma AS-30D. La finalidad será expresar esta enzima y demostrar porque es insensible a la calmodulina y porque presenta un peso molecular mayor, también demostrar si la propiedades cinéticas alteradas de la enzima en células neoplásicas está relacionada con alguna mutación en la enzima.

BIBLOGRAFIA

- Adamo, H.P. y Penniston, J.T. (1992) *Biochem. J.* 283, 355-359.
- Anger, M., Samuel, J-L., Marotte, F., Wuytack., F., Rappaport, L. y Lompré, A-M. (1993) *FEBS Lett.* 334, 45-48.
- Artigues, A., Villar, M.T., Fernández, J., Farragut, J.A. y González-Ros, J.M. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 985, 325-330.
- Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Darzon, A. (1986) *FEBS Lett.* 203, 41-43.
- Belli, S.I., Sali, A. y Goding, J.W. (1994) *Biochem. J.* 304, 75-80.
- Benaim, G., Zurini, M. y Carafoli, E. (1984) *J. Biol. Chem.* 263, 18184-18189.
- Blaustein, M.P. y Nelson, M.I. (1982) In: *Membrane Transport of Calcium* (Carafoli, E. ed.). pp. 217-236. Academic Press, London
- Blumenthal, D.K., Takoi, K., Edelman, A.M., Charbonneau, H., Titani, K., Walsh, K.A. y Krebs, E.G. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3187-3191.
- Brandl, C.J., Green, N.M., Korczak, B. y MacLennan, D.H. (1986) *Cell* 44, 597-607.
- Brandl, C.J., deLeon, E., Martin, D.R. y MacLennan, D.H. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 37-68.
- Brandt., P., Zurini, M., Neve, R.L., Rhodas, R.E. y Vanaman, T.C. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2914-2918.
- Brandt, P., Neve, R.L., Kammesheidt, A., Rhodas, R.E. y Vanaman, T. (1992a) *J. Biol. Chem.* 267, 4376-4385.
- Brandt, P., Ibrakin, E., Bruns, G.A.P. y Neve, R.L. (1992b) *Genomics* 14, 484-487.
- Brodin, P., Falcheto, R., Vorherr, T. y Carafoli, E. (1992) *Eur. J. Biochem.* 204, 939-946.
- Burk, S.E., Lytton, J., MacLennan, D.H. y Shul, G.E. (1989) 264, 18561-18568.
- Burk, S.E. y Shull, G.E. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 19683-19690.
- Carafoli E (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56: 395-433.
- Carafoli, E. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 2115-2118.
- Carafoli, E. y Crompton, M. (1978) *Curr. Top. Memb. Transp.* 10, 151-216.
- Carafoli, E. y Stauffer, T.P. (1994) *J. Neurobiol.* 25, 312-324.
- Carafoli, E. y Zurini, M. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 683, 279-301.
- Carruthers, A. y Melchior, D.L. (1988) En: *Lipid Domains and Relationship to Membrane Function* (Aloia, R.C., Curtain, C.C. y Gordon, L.M. Ed.) Alan R. Liss, New York. pp. 201-225.
- Carruthers, A. y Melchior, D.L. (1986) *Trends Biochem. Sci.* 11, 331-335.
- Cheng, K-H., Hui, S.W. y Lepock, J.R. (1987) *Cancer Res.* 47, 1255-1261.
- Chlebowski, J.F., Mabrey, S. y Falk, M.C. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 5745-5753.
- Coleman, P.S. (1986) *Ann. NY Acad. Sci.* 488, 451-467.

- Cress, A.E. y Gerner, E.W. (1980) *Nature (London)* 283, 677-679.
- Dasgupta, M., Honeycutt, T. y Blumenthal, D. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 17156-17163.
- DeJaegere, S., Wuytack, F., Eggermont, J.A., Verddomen, H. y Casteels, R. (1990) *Biochem. J.* 271, 655-660.
- Dekruyff, B., Demel, R.A. y van Deenen, L.L.M. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 255, 331-347.
- Enyedi, A., Filoteo, A.G., Gardos, G. y Penniston, J.T. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 8952-8956.
- Enyedi, A., Vorherr, T., James, P., McCormick, D.J., Filoteo, A.G., Carafoli, E. y Penniston, J.T. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 12313-12321.
- Enyedi, A., Verma, A.K., Filoteo, A.G. y Penniston, J.T. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 10621-10626.
- Enyedi, A., Verma, A.K., Heim, R., Adamo, H.P., Filoteo, A.G., Strehler, E.E. y Penniston, J.T. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 41-43.
- Esser, A.F., Bartolomew, P.M., Parce, J.W. y McConell, H.M. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1768-1770.

- Falchetto, R., Vorherr, T., Brunner, J. y Carafoli, E. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 2930-2936.
- Fong, T.M. y McNamee, M.G. (1987) *Biochemistry* 26, 3871-3880.
- Flaherty, J.O. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 401, 177-183.
- Galeoti, T., Borrello, S., Minoto, G. y Masotti, L. (1986) *Ann. NY Acad. Sci.* 488, 468-480.
- Garza-Ramos, G., Darzon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1989) *Biochemistry* 28, 3177-3182.
- Gietzen, K., Tejcka, M. y Wolf, H.W. (1980) *Biochem. J.* 189, 81-86.
- Grunze, M., Forst, B. y Deuticke, B. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 600, 861-869.
- Greeb, J. y Shull, G.E. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 18569-18576.
- Hammes, A., Oberdorf, S., Strehler, E.E., Satuffer, T., Carafoli, E., Vetter, H. y Neyses, L. (1994) *FASEB J.* 8, 428-435.
- Heim, R., Hug, M., Iwata, T., Strehler, E.E. y Carafoli, E. (1992) *Eur. J. Biochem.* 205, 333-340.
- Hesketh, T.R. y col. (1976) *Biochemistry* 15, 4145-4151.
- Hofmann, F., James, P., Vorherr, T. y Carafoli, E., (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 10252-10259.
- Inesi, G. (1985) *Ann. Rev. Physiol.* 47, 573-601.
- James, P., Vorherr, T., Krebs, J., Morelli, A., Castello, G., McCormick, D.J., Penniston, J.T., Deflora, A. y Carafoli, E. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 8289-8296.
- Johannsson, A., Keightley, C.A., Smith, G.A., Richards, C.D., Hesketh, T.R. y Metcalfe, J.C. (1981a) *J. Biol. Chem.* 256, 1643-1650.
- Johannsson, A., Smith, G.A. y Metcalfe, J.C. (1981b) *Biochim. Biophys. Acta* 641, 416-421.

- Johannsson, A., Keithley, c., Smith, G.A. y Metcalfe, J.C. (1981c) *Biochem. J.* 196, 55-511.
- Keeton, T. P., Burk, S.E. y Shull, G.E. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 2740-2748.
- Keeton, T.P. y Shull, G.E. (1995) *Biochem. J.* 306, 779-785.
- Keitel, T., Meldgaard, M. y Heinemann, U. (1994) *Eur. J. Biochem.* 222, 203-214.
- Kessler, F., Falchetto, R., Heim, R., Meili, R., Vorherr, T., Strehler, E.E. y Carafoli, E. (1992) *Biochemistry* 31, 11785-11792.
- Khan, I. y Grover, A.K. (1991) 277, 345-349.
- Korczak, B., Zarain-Herzberg, A., Brandl, C.J., Ingles, C.J., Green, N.M. y MacLennan, D.H. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 4813-4819.
- Kroes, J. y Ostwald, R. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 249, 647-650.
- Kuroki, R., Taniyama, Y., Seko, C., Nakamura, H., Kiruchi, M. y Ikehara, M. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6903-6907.
- Kuroki, R., Kawakita, S., Nakamura, H. y Yutani, K. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6803-6807.
- Kyte, J. y Doolittle, R.F. (1982) *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Langworthy, T.A. (1982) *Curr. Top. Membr. Transp.* 17, 45-77.
- Lepock, J.R., Rodahl, A.M., Zhang, C., Heynen, M.L., Waters, B. y Cheng, K-H., (1990) *Biochemistry* 29, 681-689.
- Lukas, T.J., Burgess, W.H., Prendergast, F.G., Lau, W. y Watterson, D.M. (1988) 25, 1458-1464.
- Lytton, J. y MacLennan, D.H. (1988) 263, 15024-15031.
- Lytton, J., Zarain-Herzberg, A., Periasamy, M. y MacLennan, D.H. (1989) 264, 7059-7065.
- MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B. y Green, N.M. (1985) *Nature* 316, 696-700.
- Madden, T.D., Chapman, D. y Quinn, P.J. (1979) *Nature* 279, 538-541.
- Madden, T.D., King, M.D. y Quinn, P.J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 641, 265-269.
- McElhaney, R.N. (1985) *En: Membrane Fluidity in Biology. Vol. 4. Academic Press. USA.* pp 147-208.
- McNamee, M.G. y Fong, T.M. (1988) *En: Lipid domains and the relationship to membrane function, Vol. 2. (Aloia, R.C., Curtain, C.C. y Gordon, L.M. Ed.) Alan Liss, New York, pp. 43-62.*
- Maneri, L.R. y Low, P.S. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 16170-16178.
- Mas-Oliva, J. y Santiago-García, J. (1990) *Biochem. Int.* 21, 233-241.
- Mas-Oliva, J., Pérez-Montfort, R., Rivas-Duro, M. y Cárdenas -García, M. (1991) *Mol. Cell. Biochem.* 100, 39-50.
- McIntosh, T.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 513, 43-58.
- Maruyama, K. y MacLennan, D.H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3314-3318.
- Melchior, D.L. y Czech, M. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8744-8747.

- Missiaen, L., Raermackers, L. Wuytack, F., Vrolix, M., de Smedt, H. y Casteels, R. (1989) *Biochem. J.* 263, 687-694.
- Mitani, M., Harushima, Y., Kuwajima, K., Ikeguchi, M. y Sugai, S. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 8824-8829.
- Morin, P.E., Diggs, D. and Freire, E. (1990) *Biochemistry* 29, 781-788.
- Niggli, V., Penniston, J.T. y Carafoli, E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9955-9958.
- Niggli, V., Adunyah, E.S. y Carafoli, E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8588-8592.
- Oakley, R.B., Kirsch, R.D. y Morris, R.N. (1980) *Anal. Biochem.* 105, 361-363.
- Ohtsubo, M., Naguchi, S., Takeda, K., Morohashi, M. y Kawamura, M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1021, 157-160.
- Olson, S., Wang, M.G., Carafoli, E., Strehler, E.E. y McBride, O.W. (1991) *Genomics* 9, 629-641.
- O'Neil, K.T. y DeGrado, W.F. (1990) *Trends Biochem. Sci.* 15, 59-64.
- Ordaz, H., Sosa, A., Romero, I. y Celis, H. (1992) *Int. J. Biochem.* 24, 1633-1638.
- Ortega, A. y Mas-Oliva, J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 773, 231-236.
- Ortega, A. y Mas-Oliva, J. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 868-874.
- Pantoliano, M.W., Whitlow, M., Wood, J.F., Rollence, M.L., Finzel, B.C., Gilliland, G.L., Poulos, T.L. y Bryan, P.N. (1988) *Biochemistry* 27, 8311-8317.
- Papahajoupoulos, D., Gowden, M., y Kimlberg, H. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 330, 8-26.
- Pearson, R.B., Wettenhall, R.E.H., Means, A.R., Hartshorne, D.J. y Kemp, B.E. (1988) *Science* 241, 970-973.
- Pedersen, P.L. y Carafoli, E. *Trends Biochem. Sci.* 12, 146-150.
- Privalov, P.L. (1979) *Adv. Protein Chem.* 33, 167-241.
- Privalov, P.L. (1982) *Adv. Protein Chem.* 35, 1-104.
- Rao, R. y Slayman, C.W. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 6708-6713.
- Rega, A.F. y Garrahan, P.J. (1985) *The calcium pump of plasma membranes.* CRC press, Boca Raton FL; 173 pp.
- Rigell, C.W. y Freire, E. (1987) *Biochemistry* 26, 4366-4371.
- Richards, D.E., Vidal, J.C., Garrahan, P.J. y Rega, A.F. (1977) *J. Memb.r. Biol.* 35, 137.
- Roe, J.A., Butler, A., Scholler, D.M., Valentine, J.S., Marky, L. y Breslauer, K.J. (1988) *Biochemistry* 27, 950-958.
- Roelofsen, B. y Schatzmann, H.J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 464, 17-26.
- Ronner, P., Gazzoti, P. y Carafoli, E. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179, 578-583.
- Rooney, M.W., Lange, Y. y Kauffman, J.W. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 8281-8285.
- Rotenberg, M. y Zakim, D. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 4159-4161.
- Scarpa, A. y DeGier, J. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 241, 789-797.

- Segel, I. (1975) Enzyme kinetics. John Wiley & Sons, U.S.A. pp. 926-934.
- Serrano, R. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 947, 1-28.
- Shinitzky, M. (1978) *FEBS Lett.* 85, 317-320.
- Silver, S., Nucifora, G. y Misra, K.T. (1989) *Trends Biochem. Sci.* 14, 76-80.
- Simon, S.A., McIntosh, T.J. y Latorre, R. (1982) *Science* 216, 65-67.
- Stauffer, T.P., Hilfiker, H., Carafoli, E. y Strehler, E.E. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 25993-26003.
- Sautter, T. P., Guerini, D. y Carafoli, E. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 12184-12190.
- Strehler, E.E., Strehler-Page, M.A., Vogel, G. y Carafoli, E. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6908-6912.
- Strehler, E.E., James, P., Fischer, R., Heim, R., Vorherr, T., Filoteo, A.G., Penniston, J.T. y Carafoli, E. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 2835-2842.
- Strehler, E.E. (1991) *J. Membrane Biol.* 120, 1-15.
- Shull, G.E. y Greeb, J. (1988) 263, 8646-8657.
- Trewhella, K., Blemental, D.K., Rokop, S.E. y Seeger, P.A. (1990) *Biochemistry* 29, 9316-9324.
- Tsalkora, T.N. y Privalov, P.L. (1985) *J. Mol. Biol.* 181, 533-544.
- Verma A K, Filoteo A G, Stanford D R, Wieben E D, Penniston J T, Strehler, E E, Fischer R, Heim R, Vogel G, Mathews S, Strehler-Page M A, James P, Vorherr T, Krebs J y Carafoli, E (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 14152-14159.
- Verma, A.K., Enyedi, A., Filoteo, A.G. y Penniston, J.T. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 1687-1691.
- Verma, A.K., Enyedi, A., Filoteo, A.G., Strehler, E.E. y Penniston, J.T. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 3714-3718.
- Vorherr, T., Kessler, F., Hofmann, F. y Carafoli, E. (1991) 266, 22-27.
- Wang, K.K., Villalobo, A. y Rufogalis, B.D. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 260, 696-704.
- Wang, K., Wright, L.C., Madian, C., Allen, B.G., Conigrave, A.D. y Rufogalis, B.D. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 9078-9085.
- Wang, M.G., Yi, H., Hilfiker, H., Carafoli, E., Strehler, E.E. y McBride, O.W. (1994) *Cytogenet. Cell. Genet.* 67, 41-45.
- Warren, G.B., Housley, M.D., Metcalfe, J.C. y Birsau, N.J.M. (1975) *Nature* 255, 684-687.
- Wrzosek, A., Famulsky, K.S., Lehotsky, J. y Piluka, S. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 986, 263-270.
- Wuytack, F., Papp, B., Verboomen, H., Raeymaeskers, L., Dode, L., Bobe, R., Enouf, J., Bokkala, S., Authi, K.S. y Casteels, R. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 1410-1416.
- Yeagle, P.L. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 727, 39-44.
- Zvaritch, E., James, P., Vorherr, T., Falchetto, R., Modyanov, N. y Carafoli, E. (1990) *Biochemistry* 29, 8070-8076.