

03062



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

14
2e1

FALLA DE ORIGEN

*Regulación por colesterol de la actividad de la
ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de sarcolema cardiaco*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

JUAN D. SANTIAGO GARCIA



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.

I N D I C E

	Pag.
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
1. Características de la ATPasa-Ca ²⁺ de la membrana plasmática	4
a) Ciclo catalítico de la ATPasa-Ca ²⁺ de la membra- na plasmática	6
2. Regulación de las propiedades y funciones membra- nas por la composición lipídica	7
a) Composición lipídica y propiedades físicas de las membranas	8
b) Regulación de la actividad enzimática membranar por la composición lipídica	12
c) Regulación de la actividad de la ATPasa-Ca ²⁺ por lípidos	13
3. Efecto de la temperatura en el funcionamiento celular	16
a) Efecto de la temperatura en la composición lipídica y funciones membranales	17
b) Efecto de la temperatura en la estabilidad de las enzimas	18
c) Análisis térmico de las actividades enzimáticas	20
II. OBJETIVOS	23
III. MATERIALES Y METODOS	24
IV. RESULTADOS	32
V. DISCUSION	50
VI. CONCLUSIONES	62

VII. REFERENCIAS	63
VIII. ANEXO	68

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPasa	Adenosin trifosfatasa
COL	Colesterol
DTT	Ditiotreitol
E_a	Energía de activación
EDTA	Acido etilén diamino tetraacético
EGTA	Acido etilenglicol bis (amino-etil-eter) NN'-tetraacético
EPR	Resonancia paramagnética del electrón
HEPES	Acido N-2-hiroxyetilpiperazin-N'-2-etanosulfónico
MOPS	Acido morfolino propano sulfónico
NMR	Resonancia magnética nuclear
PA	Acido fosfatídico
PC	Fosfatidil-colina
PC/COL	Fosfatidil-colina/colesterol
PE	Fosfatidil-etanolamina
Pi	Fosfato inorgánico
PIP	Fosfatidil-inositol monofosfato
PIP ₂	Fosfatidil-inositol difosfato
PS	Fosfatidil-serina
RS	Retículo sarcoplásmico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tris	Tris (hidroximetil) amino metano

RESUMEN

La actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de membrana plasmática, al igual que otras enzimas membranales, es regulada por el ambiente lipídico. Se ha encontrado que el colesterol regula la actividad de esta enzima, de tal manera que al aumentar los niveles de colesterol en la sarcolema cardíaca, la ATPasa se inhibe; mientras que al extraer este lípido de las membranas, la actividad se estimula. Recientemente se le ha dado un interés especial, a la posibilidad de que el colesterol puede conferir estabilidad térmica a algunas líneas celulares en cultivo, así como a ciertas proteínas membranales.

Con la intención de tener una mayor comprensión acerca del papel del colesterol en la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) y tratando de probar la hipótesis de que el colesterol confiere estabilidad térmica a proteínas membranales, se estudió el efecto del colesterol en la estabilidad térmica de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de sarcolema cardíaco, así como en una ATPasa-Mg²⁺ de membranas microsomales cardíacas. Los resultados obtenidos señalan que un aumento en los niveles de colesterol en las membranas, protege a ambas ATPasas contra la inactivación térmica. Los datos sugieren una correlación positiva entre el contenido de colesterol en las membranas y la estabilidad térmica de estas enzimas. Con la intención de investigar posibles cambios en la estructura de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), inducidos por cambios en los niveles de colesterol membranar, se encontró que la Km para el ATP no cambia, mientras que la Vmax disminuye al aumentar el contenido del esteroles en las membranas. Sin embargo, el efecto inhibitorio del colesterol, únicamente se observó cuando la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) se encuentra en la sarcolema, ya que al aislar esta enzima y ser reconstituida en liposomas, se pierde el efecto inhibitorio de este lípido.

I. INTRODUCCION

El control del Ca^{2+} libre citoplásmico es un paso esencial en la regulación metabólica. La concentración de Ca^{2+} libre en el espacio extracelular es de $1 - 3 \times 10^{-3}$ M, aproximadamente 4 ordenes de magnitud mayor a su concentración en el citoplasma (10^{-7} M). El calcio puede entrar a las células por difusión pasiva, en favor de su gradiente químico, o por transporte mediado. Dentro de la célula el Ca^{2+} se une reversiblemente a una serie de ligandos aniónicos, o es secuestrado temporalmente por dos organelos que amortiguan las concentraciones de Ca^{2+} : la mitocondria y el retículo endoplásmico (fig. 1). Sin embargo, para mantener por un tiempo largo ese gradiente de concentración de 10.0000 veces de diferencia en presencia de un influjo pasivo de Ca^{2+} , se requieren sistemas que bombeen el Ca^{2+} hacia el espacio extracelular a través de la membrana plasmática (1-3).

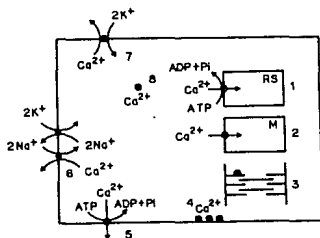


Fig. 1. Mecanismos de regulación de las concentraciones intracelulares de calcio. 1) retículo sarco(endoplásmico; 2) mitocondria; 3) sistema miofibrilar; 4) calcio unido a la membrana plasmática; 5) ATPasa- Ca^{2+} ; 6) intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ acoplado a la ATPasa- Na^+/K^+ ; 7) intercambiador $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$, y 8) moléculas citoplásmicas que unen calcio. (tomado de la ref. 4)

Se ha demostrado la existencia de dos mecanismos separados que median la salida de Ca^{2+} de las células, un intercambiador $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ (5-8) y una ATPasa específica para Ca^{2+} (9-12). Estos dos sistemas de transporte de Ca^{2+} tienen propiedades cinéticas específicas, el intercambiador es un sistema de transporte de baja afinidad y alta capacidad, y la ATPasa- Ca^{2+} tiene una alta afinidad pero baja capacidad (12).

En células excitables, se da un incremento rápido en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} como producto de la despolarización de la membrana. Este aumento transitorio en las concentraciones de Ca^{2+} esta acoplado a la excitación-contracción en las células musculares y a la liberación de neurotransmisores en las células nerviosas (13,14). El proceso de contracción-relajación en el músculo es regulado a través de cambios en la concentración de calcio dentro de la célula muscular. Al inicio de una contracción muscular, el potencial de acción generado en la unión neuromuscular se propaga o es conducido de la sarcolema (SL) a las fibras musculares a través de los túbulos transversos (túbulos-t), que son invaginaciones de la SL. Por un mecanismo aún desconocido, la despolarización de la membrana de los túbulos-t dispara la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico (RS) y la apertura de canales sensibles a voltaje localizados en la membrana de estos túbulos (15-18). El calcio liberado difunde, se une a la troponina C y la contracción muscular se lleva a cabo. El músculo se relaja cuando se restablecen las concentraciones basales de calcio en el citoplasma, por la acción de tres mecanismos. Por una parte la ATPasa-($\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$) localizada en el RS bombea el calcio del

citoplasma al lumen de este organelo (19). Por otro lado, en la membrana plasmática se tiene al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (5-8) y a una ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ (10-12), sistemas que transportan el calcio del citoplasma al espacio extracelular.

1. Características de la ATPasa- Ca^{2+} de la membrana plasmática.

La ATPasa- Ca^{2+} , una enzima constitutiva de la membrana plasmática de las células eucariontes, bombea Ca^{2+} hacia el exterior de la célula a expensas de la hidrólisis de ATP. Esta enzima ha sido caracterizada y purificada a partir de varios tejidos y tipos celulares (10-12). Las propiedades que caracterizan a la bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática son:

1. En condiciones óptimas de ensayo (presencia de Mg^{2+} , calmodulina, pH 7.4), la K_{Ca} para Ca^{2+} es 10^{-6} M o menos.
2. Su actividad depende de concentraciones micromolares de Mg^{2+} .
3. Tiene especificidad por el ATP como sustrato.
4. Tiene un peso molecular aproximado de 138.000 Da, determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.
5. La formación de una fosfoenzima estable al ácido y de recambio rápido es dependiente de Ca^{2+} , con un Mr de 130.000 a 150.000.
6. La enzima une calmodulina, la cual aumenta la afinidad aparente para el Ca^{2+} y su actividad. La remoción o extracción de la calmodulina disminuye dicha actividad. La alta afinidad de la calmodulina por la enzima se ha empleado para purificarla por medio de columnas de calmodulina-sefarosa.
7. En presencia de Mg^{2+} y K^+ (concentraciones milimolares), el ortovanadato inhibe a la enzima.
8. Los efectos activadores de Ca^{2+} , Mg^{2+} y ATP se llevan a cabo

en su región citoplásmica.

9. Con base en su sensibilidad al vanadato y a la formación de un intermediario fosforilado (aspartil-fosfato), esta enzima se ha clasificado dentro del grupo de las ATPasas aspartil-fosfato o tipo P. (Los nueve puntos anteriores han sido tomados de las referencias 10-12)

Aunque la $K_{0.5}$ para el Ca^{2+} es de aproximadamente 10^{-6} M, una activación máxima se alcanza entre 10^{-5} a 10^{-4} M (10). Concentraciones mayores de este catión provocan inhibición. Un efecto bifásico similar en la actividad de la enzima, se observa con el Mg^{2+} , calmodulina y cationes monovalentes; los cuales activan a concentraciones relativamente bajas, y tienen un efecto inhibitorio a concentraciones altas. Se ha sugerido la existencia de dos sitios de unión para el ATP, un sitio de alta afinidad que al estar ocupado, la enzima muestra baja actividad y un sitio de baja afinidad que provoca una actividad alta (10-12).

Recientemente se ha obtenido la secuencia de aminoácidos de la ATPasa- Ca^{2+} de membrana plasmática de cerebro de rata (para la cual se reportan dos isoformas) (20), y de la membrana plasmática de células de un teratoma humano (21). Al comparar estas secuencias, con la secuencia de aminoácidos de la ATPasa- Ca^{2+} de RS, subunidad α de la ATPasa- $Na^+ . K^+$, ATPasa- H^+ de Neurospora crassa y otras ATPasas tipo P, se ha encontrado un alto grado de similitud en la secuencia de aminoácidos en torno al sitio de fosforilación, al sitio de unión a la fluoresceína isotiocianato (FITC) y al sitio de unión al 5 'p-fluorofosfonil-benzoil adenosina (FSBA) (ambos análogos no hidrolizables del ATP), que

sugieren la existencia de dos sitios de unión para el ATP (20,21). Por otro lado, los análisis de hidropatía sugieren la presencia de 10 cruces transmembranales, una organización transmembranal muy similar a la ATPasa-Ca²⁺ de RS, a la subunidad alfa de la ATPasa-Na⁺-K⁺ y a la ATPasa-H⁺ de Neurospora crassa (20,21). Finalmente, se predice la existencia de dos o tres posibles sitios de unión para Ca²⁺, resultado obtenido de comparar las secuencias de la ATPasa-Ca²⁺ de membrana plasmática con proteínas que unen Ca²⁺, como son: la calmodulina, la parvalbúmina y la troponina C, así como con la secuencia de la ATPasa-Ca²⁺ de RS (21,22).

a) Ciclo catalítico de la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática.

En la figura 2 se ilustra la secuencia de reacciones del ciclo catalítico de la ATPasa-Ca²⁺, propuesta para el eritrocito y sarcolema de músculo cardíaco, aparentemente también aplicable a las ATPasas-Ca²⁺ de la membrana plasmática de otros tipos celulares (23). En este esquema la enzima presenta dos conformaciones diferentes E₁ y E₂. Aparentemente estas dos conformaciones tienen diferente afinidad por el Ca²⁺, ATP, así como una orientación diferente en el plano de la membrana (12). La formación de E₁-P es dependiente de Ca²⁺ y ATP, y el Mg²⁺ parece estimularlo. Esta reacción es endérgica, pero debido al carácter fuertemente exérgico del paso E₂-P a E₂ + Pi, la reacción se lleva a cabo principalmente en dirección de la formación de E₂ + Pi. El paso E₂-P a E₂ + Pi parece acelerarse con Mg²⁺ y ATP, y la transición de E₂ a E₁ parece estar favorecida por el ATP (10). Mientras que las concentraciones

bajas de Ca^{2+} favorecen la hidrólisis de ATP, la reacción en reversa es favorecida utilizando concentraciones milimolares de Ca^{2+} y fosfato inorgánico (10.24).

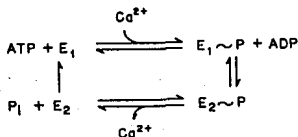


Fig. 2. Ciclo catalítico de la ATPasa-Ca^{2+} de la membrana plasmática. (Tomado de la ref. 12).

II. Regulación de las propiedades y funciones membranales por la composición lipídica.

La composición lipídica de las membranas difiere entre especies, entre órganos de la misma especie y entre organelos de una célula. Las grandes diferencias encontradas en la composición lipídica entre diferentes membranas implica que las propiedades físicas necesarias de las bicapas se pueden alcanzar de maneras distintas, o que cada membrana requiere propiedades lipídicas específicas para sus funciones. Es más, existen evidencias que señalan que en una misma membrana hay una distribución heterogénea de sus componentes, formando dominios que difieren en composición lipídica y proteica. Por lo tanto, una membrana biológica puede ser considerada como una colección de microdomi-

nios, cada uno de los cuales exhibe propiedades físicas únicas y diferentes. Además, cada uno de estos dominios contribuye de manera diferente a las propiedades del sistema (25-27). Los ejemplos más representativos de este concepto lo constituyen la membrana plasmática del hepatocito, dividida en tres regiones: canalicular, sinusoidal y contigua (28). La membrana plasmática de las células del epitelio intestinal y renal, esta dividida en dos regiones: basolateral y la dirigida hacia el lumen (29-31). Por su parte, la membrana plasmática de las células musculares, esta dividida en dos regiones: sarcolema y túbulos transversos (32). Cada una de estas regiones tiene una composición lipídica y proteica diferente, y es funcionalmente diferente. Esto sugiere que para cada tipo de membrana, inclusive para cada dominio en la membrana, se requiere un determinado estado físico-químico de sus componentes, para que las funciones asociadas a ellas se lleven a cabo de manera adecuada.

a) Composición lipídica y propiedades físicas de las membranas.

A través de varias metodologías físicas, en las que se han medido diferentes parámetros (coeficiente de difusión, parámetro de orden, transición de fase, etc.), se ha encontrado que los cambios en la longitud y grado de insaturación de los ácidos grasos, las cabezas polares de los fosfolípidos, el contenido de colesterol y la temperatura cambian las propiedades físicas, tanto en membranas modelo como en membranas biológicas. Un alto contenido de ácidos grasos saturados de cadena larga provoca que las temperaturas de transición de las membranas (gel a líquido-cristalino) se alcancen a temperaturas relativamente altas.

mientras que un alto contenido de ácidos grasos de cadena corta e insaturaciones, provoca disminución en dichas temperaturas de transición.

Un interés especial se le ha dado al colesterol, un lípido constitutivo de la membrana plasmática de las células animales. En general se ha aceptado, que en las membranas el colesterol tiene un efecto solidificante o condensante a temperaturas por arriba de la transición de los lípidos, y un efecto fluidizante a temperaturas por debajo de dichas temperaturas. Sin embargo esto debe tomarse con reserva, ya que varios estudios en los que se ha empleado resonancia paramagnética del electrón (EPR) y resonancia magnética nuclear (NMR), han revelado que el grado de movimiento o de orden de las cadenas hidrocarbonadas en presencia de colesterol es altamente dependiente de la posición de la sonda en la cadena. En la región cercana al glicerol, las cadenas hidrocarbonadas están muy ordenadas (hasta el C-8 - C-10); sin embargo, hacia el centro de la bicapa las cadenas hidrocarbonadas experimentan una considerable libertad de movimiento (33-35). Esto se puede deber a la posición que adopta el colesterol en las bicapas, donde el OH-3' está cercano a los grupos carbonilo de los ácidos grasos y la cadena lateral se dirige hacia el centro de la bicapa (fig. 3). Por lo tanto, la porción de la cadena hidrocarbonada de los fosfolípidos que está en contacto con el núcleo del esteroide (que es relativamente plano y rígido) reduce su movimiento; mientras que las regiones que están en contacto con la cadena lateral del colesterol, no son afectadas (33-38).

Paralelamente a los cambios en la fluidez, el colesterol disminuye la temperatura y entalpía de transición de los

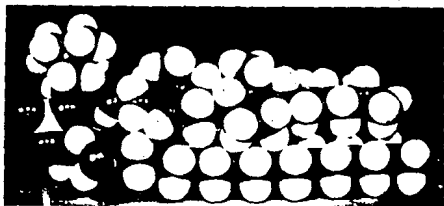


Fig. 3. Posición que adopta el colesterol en las bicapas lipídicas. (Tomado de la ref. 37).

fosfolípidos en bicapas modelo, de una manera lineal con respecto a la concentración, hasta 20 mol %. Por arriba de esta concentración, el colesterol ya no produce un cambio en la temperatura de transición de los lípidos, pero sí reduce la entalpía de la transición. A 50 mol % esta transición desaparece (39-43). A temperaturas por debajo de la transición de los fosfolípidos, y concentraciones de colesterol menores a 20 mol %, el coeficiente de difusión de varias sondas fluorescentes, de EPR y NMR aumenta; mientras que a temperaturas por arriba de la transición, el incremento en el contenido de colesterol disminuye su coeficiente de difusión; con un marcado decremento a 20 mol % de colesterol (44,45). Las concentraciones críticas para producir estos efectos están entre 20 mol % y 33 mol % de colesterol en las membranas, debido a que por arriba de estas concentraciones se pierden los dominios de fosfolípido puro y se empiezan a formar zonas ricas en colesterol, con lo que desaparece el efecto cooperativo de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos

(25,36-38,46). Debido a la posición que adopta el colesterol en las bicapas (fig. 3), se puede unir a los fosfolípidos a través de puentes de hidrógeno entre el OH-3' y el grupo carbonilo de la posición 2 del fosfolípido, y a través de interacciones de van der Waals (36,37). Estas interacciones entre fosfolípidos y colesterol pueden ser las responsables de los cambios en las propiedades físicas de las membranas, debido a que el comportamiento de los fosfolípidos unidos al colesterol cambia en comparación a las membranas formadas únicamente con fosfolípidos.

Por otro lado, se ha reportado que la adición de colesterol a bicapas formadas por fosfolípidos con ácidos grasos menores de 16 carbonos, provoca un aumento en las configuraciones trans de las cadenas hidrocarbonadas de estos ácidos. Como consecuencia de esto, el grosor de la bicapa puede aumentar. Sin embargo, en bicapas formadas por fosfolípidos con ácidos grasos de una longitud mayor o igual a 18 carbonos, el colesterol provoca una disminución del grosor de la bicapa. Aparentemente porque hacia el centro de la bicapa las cadenas hidrocarbonadas se doblan para llenar los espacios dejados por el colesterol, cuya longitud es menor que la de los ácidos grasos de 18 o más carbonos. (38,47,48). Los cambios en el empaquetamiento y orden de las membranas, así como en las temperaturas de transición dados por el colesterol, se pierden al emplear epicolesterol, lanosterol y otros análogos del colesterol (37,38), lo que sugiere que tanto la posición β del OH-3', como el resto de la molécula son responsables de dichos cambios.

b) Regulación de las funciones membranales por la composición lipídica.

Una extensa variedad de estudios realizados con membranas biológicas y membranas modelo han señalado que los cambios en sus propiedades físicas, pueden tener una relación directa con las actividades enzimáticas y de transporte en dichas membranas.

Numerosos estudios realizados con organismos procariontes, en los que se han variado las temperaturas de crecimiento, adicionado ácidos grasos saturados, insaturados, de cadena larga y corta, anestésicos locales y colesterol (agentes que varían las propiedades físicas de las membranas); señalan que estos organismos son capaces de responder a estos cambios ambientales, cambiando o modificando la composición lipídica de sus membranas para mantenerlas en estado líquido-cristalino. Al parecer los cambios en la composición de ácidos grasos, fluidez y temperaturas de transición de los lípidos membranales, no tienen un efecto importante en las actividades enzimáticas y de transporte asociadas a estas membranas, siempre y cuando los lípidos membranales se mantengan en estado líquido-cristalino (que al parecer es la fase biológicamente importante). Sin embargo, cuando las membranas pasan a un estado de gel, o a estados "hiperfluídos", son incapaces de mantener el crecimiento celular, así como las actividades enzimáticas y de transporte (para revisión de este tema, ver la ref. 49).

Los cambios en las propiedades físicas de las membranas dados por el colesterol, parecen jugar un papel importante en la regulación de las funciones membranales, y se han relacionado con: el transporte de azúcares (49-52), el transporte de

aminoácidos (49), el transporte activo (53,54), la permeabilidad (51,55-57), inmunológica (58), diversas funciones de los eritrocitos (59); y otras actividades enzimáticas y de transporte en las membranas.

Aunque una gran cantidad de reportes sugiere que los cambios en la fluidez de membrana afectan una variedad de funciones membranales, en muy pocos de estos estudios se ha probado rigurosamente esta suposición. Lo que realmente se ha demostrado es que cambios en la composición de ácidos grasos, contenido de colesterol, cambios en la temperatura, o la adición de anestésicos locales afectan ciertas funciones de membrana, y se supone que este o estos efectos se llevan a cabo a través de cambios en la organización de los lípidos. Sin embargo, la posibilidad de una acción directa de estos agentes en el sistema de interés, rara vez se considera.

c) Regulación de la actividad de la ATPasa-Ca²⁺ por lípidos.

La actividad de la ATPasa-Ca²⁺ 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-(Ca²⁺, Mg²⁺) sin embargo, la actividad se restablece al adicionar lípidos exógenos (60-62). Un efecto similar se observa al solubilizar a la enzima con detergentes y adicionar fosfolípidos al medio de solubilización, lo cual impide la inactivación de la enzima (63,64). 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 controlada, facilitan los estudios de interacción de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) 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. Por otra parte, los efectos de calmodulina sí parecen depender de las propiedades físico-químicas del ambiente lipídico (10). De esta manera, 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) (12.65). Los fosfolípidos ácidos incrementan la V_{max}, la afinidad para el calcio y ligeramente la cooperatividad por Ca²⁺ de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de la membrana plasmática. Los efectos combinados en la V_{max}, la K_{0.5} y la cooperatividad para el Ca²⁺ dan como resultado una estimulación en la actividad específica de la enzima a bajas concentraciones de Ca²⁺ (12.66). La potencia relativa de los fosfolípidos ácidos en la estimulación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) es la siguiente: fosfatidilinositol difosfato (PIP₂) > fosfatidilinositol monofosfato (PIP) > ácido fosfatídico (PA) > fosfatidil inositol (PI) - PS > PC. El PIP, PIP₂ y el PA tienen un efecto bifásico, produciendo estimulación a bajas concentraciones y un efecto inhibitorio a concentraciones altas; mientras que PS y PI tienen un efecto estimulador que es dependiente de la concentración (66). Parece que los efectos, pero no la unión de calmodulina a la enzima se pierden en presencia de lípidos ácidos, ya que la ATPasa estabilizada con PS es retenida por columnas de

calmodulina-sefariosa con la misma eficiencia que al estar estabilizada por PC (63,64). Un estudio reciente, en el que se empleó dicroismo circular, señala que la calmodulina y la PS inducen cambios estructurales diferentes en la enzima (67).

Por otro lado, los niveles de colesterol en la membrana plasmática pueden modular la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺). Se ha observado que el incremento de los niveles de colesterol en la sarcolema cardíaca tiene un efecto inhibitorio en la actividad de esta enzima, mientras que la extracción de este lípido de las membranas estimula la actividad (68,69). Para la ATPasa-Na⁺/K⁺ aislada a partir de la membrana plasmática de células renales y reconstituida en liposomas de PC y 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 (70). Esto sugiere que para esta enzima y otras proteínas membranales, como se menciona más adelante, se requiere la presencia de colesterol en las membranas para una actividad óptima.

No obstante los resultados antes comentados, la mayor parte de los estudios del papel de los lípidos se han realizado con la ATPasa-Ca²⁺ de RS, debido a la abundancia de esta proteína en dicho organelo, donde llega a constituir entre el 85 y 95 % de la proteína total. Para esta enzima, la remoción parcial de fosfolípidos por medio de fosfolipasas, así como la delipidación por adición de cantidades crecientes de desoxicolato, causan pérdida de la actividad, la cual se puede recuperar por la adición de lípidos exógenos (71-74). Al recambiar los lípidos

endógenos del RS asociados a la enzima por especies lipídicas conocidas, se encontró que para mantener la actividad ATPasa se requieren lípidos con ácidos grasos de 18 carbonos, encontrándose una actividad máxima con dioleil-PC, las fosfatidilcolinas con ácidos grasos más cortos o más largos dan una menor actividad (75-79). En estudios similares con dioleil fosfolípidos con diferente cabeza polar se encontro que la PC y la fosfatidil-etanolamina (PE) mantienen una mayor actividad de la ATPasa, que los fosfolípidos ácidos (PA, PS y cardiolipina) (77-79).

En relación al efecto del colesterol sobre la ATPasa-Ca²⁺ de RS existe controversia, ya que algunos trabajos sostienen que al aumentar la cantidad de este esteroil en el RS se produce una inhibición proporcional en la actividad (80,81); mientras que Metcalfe y col. (82,83) reportan que el colesterol no tiene efectos en la actividad de la enzima. Realizando estudios con la enzima reconstituida en liposomas de PC/colesterol (PC/COL), 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 (83).

III. Efecto de la temperatura en el funcionamiento celular.

La elevación de la temperatura puede provocar muerte celular por hipertermia, debido a la inactivación y desnaturalización de las proteínas y otros componentes celulares. Se ha pensado que en este proceso, las membranas tienen un papel importante, ya que un aumento considerable en la temperatura puede propiciar la pérdida de las propiedades de las membranas, haciendolas

"hiperfluidas", por lo que pueden mostrar un aumento en su permeabilidad y pérdida de selectividad (84).

a) Efecto de la temperatura en la composición lipídica y funciones membranales

Se piensa que las membranas juegan un papel importante en la muerte celular por hipertermia, bajo ciertas condiciones la sensibilidad celular al calor se modula por la composición lipídica (84). Numerosos estudios realizados con procariontes señalan que estos organismos pueden alterar la composición lipídica de sus membranas como una respuesta a la temperatura. De tal manera que cuando se cultivan a temperaturas altas se induce la síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga, mientras que cuando son cultivados a temperaturas bajas, sintetizan cantidades importantes de ácidos grasos insaturados, lo que provoca que la relación de ácidos grasos insaturados/saturados aumente en sus membranas. Debido a estos cambios, los organismos crecidos a bajas temperaturas por varias generaciones se hacen más sensibles a incrementos en la temperaturas que las cepas nativas. Tal vez el caso más representativo lo constituyen las bacterias termófilas, las cuáles tienen un contenido elevado de ácidos grasos saturados de cadena larga y ramificados en sus membranas, lo que da como resultado membranas más estables que las de los organismos mesófilos (para revisión de este tema, ver ref. 49 y 85).

Algunos estudios realizados con células de mamífero normales y malignas, han permitido llegar a conclusiones similares (84,86-89). Recientemente se le ha dado mucho interés a la

posibilidad que el colesterol puede influir en la sensibilidad térmica celular. Cress y Gerner encontraron que algunas líneas celulares con un mayor contenido de colesterol son más resistentes a la hipertermia (87,88), por lo que concluyeron que el nivel de colesterol en la membrana puede influir en la sensibilidad celular a la hipertermia. En adición Anderson y col. (89), encontraron que las células de ovario de hamster mantenidas a bajas temperaturas tienen un menor contenido de colesterol y fueron más termosensibles que aquellas mantenidas a temperaturas más altas.

De manera contraria a estas correlaciones positivas entre el contenido de colesterol y termoresistencia, hay varios trabajos que reportan una carencia de correlación o una correlación negativa (90-92). Esto sugiere que ni el colesterol, ni alguna especie lipídica en particular son los únicos determinantes de la termosensibilidad. Durante la hipertermia ocurre desnaturalización de proteínas, incluyendo las proteínas membranales, esto contribuye al daño y muerte celular (93,94). Tratando de probar la hipótesis de que el colesterol protege a las proteínas membranales de la inactivación térmica, se usó como modelo a la ATPasa-Ca²⁺ de RS reconstituida en liposomas con diferentes cantidades de colesterol; encontrándose que tanto el transporte de Ca²⁺, como la actividad ATPasa son más termoresistentes, a mayor contenido de colesterol en los liposomas (95).

b) Efecto de la temperatura en la estabilidad de las enzimas.

La mayoría de las reacciones químicas proceden a una velocidad más rápida a medida que la temperatura (T) se

incrementa. Un incremento en T 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 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 T aumenta hay un incremento en las colisiones de E + S provocando un aumento en la velocidad de la reacción, pero esto va acompañado de un aumento en la tasa de desnaturalización. Como consecuencia de esto, una gráfica de v vs T usualmente muestra un pico, algunas veces referido como "temperatura óptima". Sin embargo, la temperatura "óptima" para un ensayo es la máxima temperatura a la cual la enzima muestra una actividad constante en un periodo de tiempo, por lo menos tan grande como el tiempo de ensayo. Esto se puede establecer fácilmente preincubando a la enzima a diferentes temperaturas y tiempos y finalmente medir la actividad a una temperatura baja, para no causar desnaturalización. La estabilidad de una enzima a la temperatura depende de varios factores incluyendo pH, fuerza iónica del medio, así como la presencia o ausencia de ligandos. Los sustratos frecuentemente protegen contra la desnaturalización por temperatura. En general, una enzima puede ser más estable en extractos crudos que en forma aislada, al contener una concentración alta de otras proteínas (96).

c) Análisis térmico de las actividades enzimáticas

La investigación de la dependencia de la temperatura de las reacciones químicas y enzimáticas es importante para la comprensión de los mecanismos moleculares de estos procesos. Los efectos de la temperatura en las constantes de velocidad que caracterizan a una reacción química son analizados en términos de una energía de activación empírica (E_a) de acuerdo a la ecuación de Arrhenius.

$$\log k = (-E_a/2.3R)(1/T)$$

donde k es la constante de velocidad de interés, R la constante de los gases y T la temperatura absoluta. En la práctica el valor numérico de E_a se determina a partir de la pendiente de una gráfica de $\log k$ vs $1/T$ (gráfica de Arrhenius). Para la gran mayoría de las reacciones químicas, y para las reacciones catalizadas por la mayoría de enzimas solubles, las gráficas de Arrhenius son lineales en un intervalo amplio de temperatura, aunque hay sus excepciones. Para los sistemas de transporte y enzimas de membrana, se obtienen con frecuencia gráficas de Arrhenius no lineales (49,97-99). En muchos trabajos se han asociado estos cambios en las energías de activación con cambios en la transición de fase de los lípidos de las membranas (gel a líquido-cristalino). Sin embargo, se debe ser cuidadoso en la interpretación de estos cambios, ya que inclusive algunas enzimas citoplásmicas solubles muestran gráficas de Arrhenius no lineales (100). Además, las proteínas membranales pueden tener transiciones conformacionales a temperaturas fisiológicas, que pueden afectar la actividad de estas proteínas aún cuando no ocurran transiciones de fase en el ambiente lipídico, sobre esto

existen varios ejemplos en la literatura: los sistemas de transporte de lactosa y prolina en E. coli (49,101); la ATPasa- (Na^+, Mg^{2+}) de algunos micoplasmas (102); la ATPasa- Ca^{2+} de RS. Esta última enzima muestra un cambio conformacional intrínseco a $18^\circ C$ (103,104). Aún la abolición de los quiebres en las gráficas de Arrhenius, por agentes como detergentes o anestésicos locales no son pruebas contundentes de que la transición de la fase lipídica esta involucrada, ya que estos agentes pueden y afectan directamente la estructura y función de las proteínas, así como la fluidez y la fase lipídica (49). Es importante recordar que una gráfica de Arrhenius de una reacción enzimática será normalmente lineal solamente si una especie de catalizador es responsable del proceso químico, y solamente si un paso en particular de toda la reacción es limitante en todo el intervalo de temperatura examinado. Las reacciones enzimáticas y procesos de transporte membranales son generalmente complejos, involucrando varios pasos, donde cada reacción parcial del proceso global puede tener una dependencia de temperatura diferente e inclusive una diferente dependencia lipídica (84). Dixon y Webb (105) y Han (100) han señalado que la temperatura induce cambios en el pH de los amortiguadores acuosos, en la viscosidad de la solución y en la afinidad de unión del sustrato (K_m).

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 (106). Cualquier técnica física que refleje ampliamente el proceso del desdoblamiento puede ser usada, sin embargo la calorimetría diferencial de barrido es la más comúnmente 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 ligados o sustratos en la estabilidad de estos. Bajo condiciones favorables se puede obtener un esquema de baja resolución de una macromolécula compleja (107,108).

II. OBJETIVOS

Con la intención de tener una mejor comprensión del mecanismo o mecanismos de regulación de la actividad de la ATPasa-($\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$) de membrana plasmática por el colesterol, y de probar la hipótesis de que el colesterol confiere estabilidad térmica a varias líneas celulares en cultivo, así como a ciertas proteínas membranales; se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto del colesterol en la estabilidad térmica de la ATPasa-($\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$) de sarcolema cardíaco. Empleando para esto membranas con diferente contenido de colesterol; así como a la enzima aislada y reconstituída en liposomas de fosfatidilcolina y liposomas de fosfatidilcolina/colesterol.

2. Monitorear posibles cambios en la estructura de la ATPasa-($\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$), inducidos por cambios en los niveles de colesterol en las membranas. Específicamente estudiar el efecto de este lípido sobre la constante de unión para uno de sus sustratos, el ATP.

3. Por medio del análisis térmico diferencial, determinar el papel del colesterol en la estabilidad térmica de la ATPasa- Mg^{2+} de membranas microsomales cardíacas. Esto último con la finalidad de demostrar, que el efecto protector del colesterol contra la inactivación térmica, puede ser general para varias proteínas membranales.

III. MATERIALES Y METODOS

Químicos. El colesterol, la sefarosa 4B (activada con bromuro de cianógeno), el DTT, el MOPS, el EGTA, el EDTA, el Tris, el SDS, el ácido málico, el β -mercaptoetanol, el HEPES, el Triton X-100, la acrilamida, los marcadores de peso molecular y la fosfatidilcolina tipo IV-S de frijol de soya, se obtuvieron de Sigma Chemicals (St. Louis, MO.). La fenil-sefarosa, el sephacryl S-200 de Pharmacia. El resto de los químicos empleados en el presente trabajo fueron de un alto grado de pureza. La fosfatidilcolina empleada a lo largo de este trabajo se lavó previamente con acetona-eter (adicionando tocoferol como agente antioxidante), para eliminar ácidos grasos libres y lípidos peroxidados, de acuerdo al procedimiento descrito por Kagawa y Racker (109).

Omitiré la descripción de los métodos que se reportan en el artículo anexo.

Purificación de calmodulina. La calmodulina se purificó a partir de testículo de bovino de acuerdo al método de Gopalakrishna (110). El tejido (250 g) se homogenizó a 4°C con 5 pulsos de 30 segundos cada uno en una licuadora (esperando 3 min. entre pulso y pulso), en 500 ml de una solución que contenía Tris-HCl 40 mM, EDTA 4 mM, NaCl 100 mM (pH 7.4) y 0.5 ml de β -mercaptoetanol por litro de solución (solución A). El homogenizado se centrifugó a 10.000 rpm durante 30 min. en un rotor GSA a 4°C. El sobrenadante resultante se filtró a través de gasa doble y se colectó en hielo. Las pastillas se resuspendieron en un volumen igual de solución A, se centrifugaron y filtraron en las

condiciones antes mencionadas. El sobrenadante filtrado se calentó de 3-5 min. en agua hirviendo en fracciones de 100-150 ml (hasta que el sobrenadante cambió de color y se observaron grumos), inmediatamente se enfrió hasta 10°C en una mezcla de acetona-hielo seco, para ser centrifugado a 10.000 rpm durante 30 min. en un rotor GSA a 4°C. El sobrenadante resultante se dializó durante todo la noche a 4°C con 18 litros del siguiente amortiguador: Tris-HCl 40 mM (pH 7.4), NaCl 100 mM y β -mercapto-etanol (0.5 ml/litro) (solución B), posteriormente se dializó durante 4 horas a temperatura ambiente con 4 litros de la solución B. El dializado se centrifugó a 8.000 rpm durante 60 min. en un rotor GSA, a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le adicionó CaCl_2 a una concentración final de 2 mM y se aplicó a una columna de fenil-sefariosa de 50 ml (a temperatura ambiente, al igual que los pasos siguientes). La columna había sido previamente equilibrada con 500 ml de una solución que contenía Tris-HCl 40 mM (pH 7.4), NaCl 100 mM y CaCl_2 2 mM (solución C). Después de pasar la muestra, la columna se lavó en primer lugar con un litro de la siguiente solución: Tris-HCl 40 mM (pH 7.4), NaCl 0.5 M, CaCl_2 2 mM (solución D), posteriormente se lavó con un litro de solución C. Las proteínas retenidas por la columna se eluyeron con 300-500 ml de una solución de Tris-HCl 40 mM (pH 7.4), NaCl 75 mM, EDTA 4 mM (solución E) y se colectaron fracciones de 2-3 ml. Finalmente, se determinó la densidad óptica de las fracciones a 280 nm. Las muestras con una D.O. mayor de 0.1 se juntaron y mantuvieron en refrigeración hasta su uso. La concentración de proteína se determinó de

acuerdo a la siguiente relación:

$$\text{Valor D.O. } \frac{X}{0.221} = \text{mg/ml}$$

donde 0.221 es el coeficiente de extinción molar de la calmodulina. Para regenerar la resina de fenil-sefariosa, la columna se lavó con 200 ml de solución E que contenía urea 6 M, posteriormente con 200 ml de agua destilada (desionizada), en seguida con 200 ml de etanol al 50 % y finalmente con solución C. La calmodulina obtenida se acopló a sefariosa 4B activada con bromuro de cianógeno, siguiendo métodos convencionales.

Aislamiento de microsomas cardíacos de bovino. El aislamiento de las membranas microsomales se realizó de acuerdo a un procedimiento establecido en el laboratorio (111). 200 g de tejido ventricular de bovino, libre de tejido conectivo se homogenizaron en una licuadora (dos pulsos de 2 min) en 2 volúmenes de una solución que contenía: NaHCO_3 10 mM y azida de sodio 0.5 mM (pH 7.0) (solución A). El homogenizado se rehomogenizó en 5 volúmenes de solución A, con 5 pulsos de 5 seg. en un politron, este segundo homogenizado se licuó nuevamente con dos pulsos de 2 min y se filtró a través de gasa triple. El filtrado se centrifugó a $8,700 \times g$ durante 30 min, se recuperó el sobrenadante (1), y la pastilla se resuspendió en 5-6 volúmenes de solución A, para homogenizarse nuevamente con licuadora (dos pulsos de 2 min) y centrifugarse a $8,700 \times g$ por 30 min. El sobrenadante resultante se mezcló con el sobrenadante 1 y se centrifugaron a $22,000 \times g$ durante 60 min, posteriormente las pastillas se resuspendieron en 5-6 volúmenes de solución B que contenía: Malato-Tris 20 mM y KCl 0.6 M (pH 6.8), para ser

homogenizadas con un homogenizador de vidrio y centrifugadas a 33.000 x g durante 60 min. Se tiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió y homogenizó en 5-6 volúmenes de HEPES 10 mM, EDTA 2 mM (pH 7.4), y se agitó durante 10 min, con el fin de extraer la calmodulina. Después de centrifugar las membranas a 50.000 x g durante 30 min., la pastilla resultante se resuspendió en: Tris-malato 50 mM, $MgCl_2$ 0.5 mM, $CaCl_2$ 50 μ M, DTT 2 mM (pH 7.4) y se congeló en alícuotas en nitrógeno líquido. Todos los pasos anteriores se realizaron a 4°C.

Incorporación de colesterol a las membranas microsomales. La incorporación y determinaciones de colesterol en las membranas microsomales se realizó de acuerdo al procedimiento mencionado en el artículo anexo. Este procedimiento consiste en el enriquecimiento del plasma sanguíneo (lipoproteínas) con colesterol. Al incubar las membranas microsomales con este medio, el colesterol difunde del plasma hacia las membranas, obedeciendo su gradiente de concentración, lo que permite incrementar el contenido de colesterol de las membranas.

Purificación de la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}). La ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}), se purificó a partir de microsomas cardíacos de bovino libres de calmodulina, siguiendo el método descrito por Niggli y col. (63), con las modificaciones señaladas en (112). Las membranas se solubilizaron durante 20 min en un medio que contenía KCl 130 mM, HEPES-KOH 20 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 100 μ M, Triton X-100 0.4 %, DTT 2 mM (pH 7.4) (solución A) y se centrifugó a 100.000 x g durante 35 min. Al sobrenadante recuperado se le adicionó PC sonicada en HEPES-KOH 10 mM (pH 7.4) a una concentración final de

0.5 mg/ml y se aplicó a una columna de calmodulina-sefarosa 4B previamente equilibrada con la solución A que contenía PC 0.5 mg/ml. Después de pasar la muestra, la columna se lavó con 10 volúmenes de solución A y subsecuentemente con 10 volúmenes de una solución similar que contenía Triton X-100 0.05 % (solución B). Finalmente la enzima se eluyó con KCl 130 mM, HEPES-KOH 20 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 2 mM, DTT 2 mM, PC 0.5 mg/ml, Glicerol 10 % y Triton X-100 0.05 % (pH 7.4), colectándose fracciones de 0.5 ml. En las fracciones colectadas se midió la actividad ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), como se describe más adelante. Las fracciones con mayor actividad se juntaron, se les adicionó CaCl₂ 50 µM, el MgCl₂ se ajustó a 2 mM, y se guardaron en alícuotas en nitrógeno líquido hasta su uso. Todos los pasos anteriores se realizaron a 4°C.

Incorporación de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de sarcolema cardíaco en liposomas.

La enzima se incorporó en liposomas de PC y PC/COL por medio de congelación, descongelación y sonicación, siguiendo el procedimiento descrito por Racker (113). 50 mg PC o 45 mg PC/5 mg colesterol/ml se sonicaron con 4 pulsos de 4 min en un sonicador de vástago Branson 250, en un medio que contenía KCl 130 mM, CaCl₂ 50 µM, MgCl₂ 2 mM y HEPES-KOH 20 mM (pH 7.4). Posteriormente los liposomas se centrifugaron a 25,000 x g durante 30 min, con el fin de remover partículas de titanio y de lípidos. Para incorporar a la enzima se tomó un volumen de liposomas y se mezcló con dos volúmenes de ATPasa (0.1-0.15 mg/ml) recién descongelada. La mezcla se sonicó con dos pulsos de 30 seg en un

sonicador de baño a 4°C. Finalmente los liposomas se filtraron a través de columnas de Penefsky (114) que contenían 0.7 ml de Sephacryl S-200, centrifugando a 2.000 rpm en una centrifuga clinica durante 10 min. a 4°C. con el fin de separar a la enzima reconstituida de la enzima libre.

Inactivación térmica. Las membranas microsomales, con alto y bajo contenido de colesterol resuspendidas a una concentración de proteína de 0.5 mg/ml con MOPS-KOH 20 mM, KCl 80 mM, DTT 1 mM (pH 7.4), se calentaron en baño de agua a una velocidad de 70°C/hr, y se tomaron muestras cada grado, de 30 a 70°C. Estas muestras se pusieron en hielo hasta que todas las muestras fueron colectadas (115), para finalmente determinar la actividad de ATPasa-Mg²⁺/Ca²⁺ a 25 °C. Las curvas de inactivación se obtuvieron de graficar la fracción de la actividad residual vs temperatura (tomando como 1 la actividad control de muestras no calentadas). La temperatura de inactivación (T_I), definida como la temperatura a la que se alcanza la mitad de la inactivación, se obtuvo a partir de la derivada de las curvas de inactivación (115).

Para las curvas de inactivación en función del tiempo, las membranas microsomales con alto y bajo contenido de colesterol (a una concentración de proteína de 0.5 mg/ml), se preincubaron en un baño de agua a cada una de las diferentes temperaturas (54-62°C). A diferentes tiempos se tomaron alicuotas de 30 µl que se pusieron en hielo hasta que todas las muestras fueron colectadas. La actividad residual se determinó a 25°C como se describe más adelante.

Calorimetría diferencial de barrido. Los experimentos de calorimetría se realizaron con un microcalorímetro diferencial de barrido de alta resolución (Microcal MC2), conectado a una computadora para coleccionar automáticamente los datos, como se describe en (108). Las membranas microsomas con alto y bajo contenido de colesterol, resuspendidas a una concentración de proteína de 10 mg/ml con un amortiguador que contenía: MOPS-KOH 20 mM, KCl 80 mM, DTT 1 mM (pH 7.4), se calentaron a una velocidad de barrido de 1°C/min. de 10 a 100°C. Posteriormente las muestras se enfriaron hasta 10°C e inmediatamente se les corrió un segundo barrido. Esto último, con el fin de determinar si el proceso de desnaturalización de las proteínas de estas membranas es reversible o irreversible. La desnaturalización fue totalmente irreversible después del barrido a 100°C. Por lo tanto, la desnaturalización de las proteínas membranales, así como las curvas de inactivación de la actividad ATPasa-Mg²⁺/Ca²⁺ fueron analizadas, tomando en cuenta que se trata de procesos irreversibles (108). El procedimiento de análisis requiere que la desnaturalización e inactivación, puedan ser aproximados a una reacción de dos estados Nativo ^k> Desnaturalizado o Activo ^k> Inactivo obedeciendo una cinética de pseudo primer orden, donde la dependencia de la temperatura de la k de velocidad esta dada por la relación de Arrhenius. Se ha demostrado que esta suposición se cumple para la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) de RS (108). La fracción de cada componente desnaturalizado o inactivado (f_D) esta dado por:

$$f_D [T(t)] = 1 - \exp \left\{ \frac{-ATC^2}{E_{av}} \exp \left[\frac{E_a}{RTC^2} (T - T_c) \right] \right\}$$

donde T_c es la temperatura a la cual k=1, E_a la energía de

activación, y v la velocidad del barrido. La derivada de f_D en función de la temperatura permite obtener el exceso de C_p , parámetro que es proporcional a la derivada de la actividad. Las curvas de exceso de C_p y la derivada de la actividad como función de la temperatura fueron separadas en sus componentes individuales, usando una rutina recursiva de minimización (108).

Determinación de las actividades ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) y ATPasa-Mg²⁺. Para los ensayos de actividad, se tomó aproximadamente 1 μ g de enzima incorporada en liposomas por punto experimental y se incubó a los diferentes tiempos y temperaturas en un medio que contenía KCl 130 mM, HEPES-KOH 20 mM, MgCl₂ 6.2 mM, CaCl₂ 0.37 mM y EGTA 0.1 mM (pH 7.4), con el fin de obtener una concentración de Ca²⁺ libre de 10 μ M, calculado mediante un programa de cómputo diseñado por Fabiato (116). Para la determinación de las actividades ATPasa-Mg²⁺/Ca²⁺ de microsomas cardíacos de bovino, se tomaron 15 μ g de proteína membranal por cada punto de ensayo, y se incubaron durante 10 min a 25°C en la mezcla de reacción antes mencionada. El fosfato liberado se determinó colorimétricamente como se reporta en (117). La proteína por el método Lowry (118) para la fracción microsomal y para la enzima aislada e incorporada en liposomas de acuerdo al método descrito por Bensadoun y Weinstein (119).

Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS. La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS se realizó de acuerdo al método de Laemmli (120). Los geles se tificaron con azul de Coomassie ó con plata según el método de Oakley et al (121).

IV. RESULTADOS

Los resultados presentados en el artículo que acompaña a esta tesis, señalan que la estabilidad térmica de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) es dependiente del contenido de colesterol en la sarcolema y del tiempo de preincubación. Al aumentar el contenido de colesterol en las membranas, la enzima muestra una mayor resistencia a la inactivación por temperatura.

Con base en los resultados reportados en dicho artículo, se decidió investigar el papel del colesterol en la estabilidad térmica de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) aislada y reconstituida en liposomas de diferente composición lipídica. Para lograr esto, fue necesario recurrir a un procedimiento para el aislamiento de membranas a gran escala, a partir de músculo cardíaco de bovino, en lugar de tejido cardíaco de conejo. Las ventajas que presenta este sistema son principalmente la disponibilidad de tejido, costo y cantidad de membranas obtenidas. La fracción microsomal libre de calmodulina, obtenida de acuerdo al procedimiento descrito en la sección de materiales y métodos, y caracterizada previamente en el laboratorio (111), se empleó para la purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de sarcolema cardíaco, por medio de cromatografía en columnas de calmodulina-sefarosa.

Sin embargo, antes de describir los resultados de la purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), presentaré en primer lugar los datos obtenidos en la purificación de la calmodulina. La figura 4A muestra el perfil de elución de la columna de fenil-sefarosa y la figura 4B el patron electroforético las fracciones 26 a la 34, comprendidas en el pico de absorbencia a 280 nm de la fig. 4A.

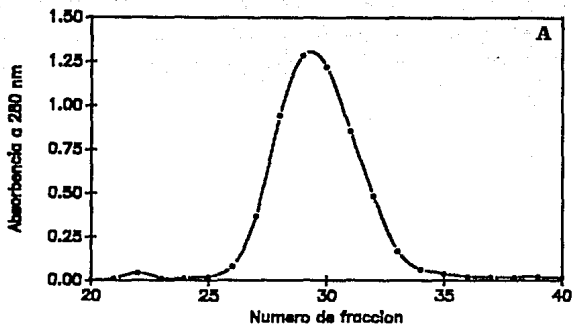


Fig. 4. Purificación de la calmodulina. A) perfil de elución de la columna de fenil-sefarosa. B) electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % con SDS de las fracciones obtenidas durante la purificación: 1) marcadores de peso molecular en kD; 2) solubilizado aplicado a la columna; 3) proteínas no retenidas por la columna; 4 y 6) calmodulina en presencia de Ca^{2+} 5 mM; 5 y 7) calmodulina en presencia de EGTA 5 mM. Tinción con azul de Coomassie.

En el gel se observa claramente una banda polipeptídica con un peso molecular cercano a los 17 kD, y cuya movilidad electroforética se modifica en presencia de calcio, características distintivas de la calmodulina. Esta proteína estimula la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de sarcolema cardíaco (resultado no mostrado).

La calmodulina obtenida se acopló a sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno. Los resultados obtenidos durante la purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), por medio de la columna de calmodulina-sefarosa se muestran en la figura 5. La figura 5A muestra el perfil de actividad de las fracciones eluidas de la columna de calmodulina-sefarosa. Las fracciones con actividad de ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) se concentraron y analizaron por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (fig. 5B). En esta figura se puede observar un componente principal de aproximadamente 140 kD que corresponde a la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de membrana plasmática, y un componente menor de aproximadamente 100 kD, que podría corresponder a un producto de proteólisis de la banda principal de 140 kD, descrito previamente (122). Aunque la mayor parte de la información en la literatura señala que la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de RS no se une a calmodulina, esta afirmación parece ser válida únicamente para la enzima de músculo esquelético. Sin embargo, para la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de RS de músculo cardíaco, recientemente han surgido evidencias que señalan que la calmodulina puede unirse directamente a esta enzima (123). Por lo tanto, existe la posibilidad de que la banda de 100 kD corresponda a una pequeña contaminación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de RS.

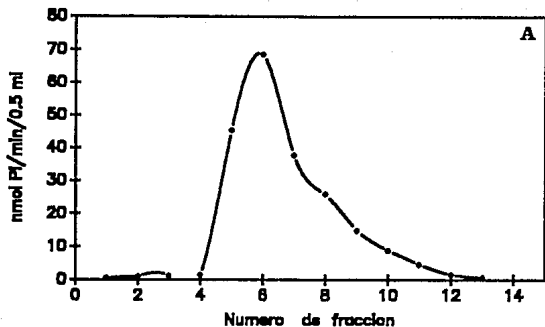


Fig. 5. Purificación de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de sarcolema cardíaco. A) perfil de actividad de las muestras eluidas de la columna de calmodulina-sefarosa 4B. B) electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % con SDS, de las muestras obtenidas durante la purificación: 1) marcadores de peso molecular; 2) membranas microsomales; 3) proteínas del solubilizado aplicado a la columna; 4) ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺), correspondiente a las fracciones 5-10 del panel A. Tinción con plata.

En nuestras condiciones de aislamiento, partiendo de 500 mg de proteína de membranas microsomales (libres de calmodulina), se obtienen entre 400 a 500 μg de ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}), rendimiento aproximado a lo reportado en la literatura (63.112.122).

La enzima aislada se incorporó en liposomas de PC y PC/COL, como se señala en la sección de materiales y métodos. Una vez incorporada en los liposomas, se realizaron curvas de actividad de la enzima en función de la temperatura. Para esto la enzima se incubó con sus sustratos a las diferentes temperaturas, es decir para este grupo de experimentos la enzima no fue preincubada. Los resultados obtenidos de estos experimentos se muestran en las figuras 6, 7 y 8. En primer lugar, se encontró que el efecto inhibitorio del colesterol, observado en la actividad de la enzima en la sarcolema, se pierde cuando la enzima ha sido aislada de las membranas nativas e incorporada en liposomas de PC/COL. Por otro lado, el efecto protector del colesterol contra la inactivación térmica de la enzima, únicamente se observa a tiempos "largos" de incubación. A los 5 min de incubación las curvas de actividad de la enzima incorporada en liposomas de PC y PC/COL son prácticamente idénticas (fig. 6), mientras que al aumentar el tiempo de incubación a 10 min (fig. 7), se empieza a marcar una diferencia en la actividad de la enzima a temperaturas altas, observándose una diferencia clara a los 20 min de incubación (fig. 8). En esta última figura, la enzima incorporada en liposomas de PC/COL mostró una mayor actividad a temperaturas altas, en comparación con la enzima incorporada en liposomas de PC. Esto sugiere que el colesterol estabiliza a la ATPasa-(Ca^{2+} , Mg^{2+}) y retarda o la protege contra la inactivación

térmica.

En las figuras 6B, 7B y 8B se muestran las gráficas de Arrhenius correspondientes a los datos de actividad presentados en el panel A de cada una de las figuras. A partir de estas gráficas, se obtuvo una E_a aproximada de 10 kcal/mol, para el proceso de activación (25-46°C). Este valor es independiente del tiempo de incubación (5, 10 ó 20 min) y de la composición de los liposomas. Aunque se puede obtener un cálculo de E_a de aproximadamente 30 kcal/mol, para la fase de inactivación de la enzima (48-60°C), este dato es difícil de interpretar. Debido a que a temperaturas altas se tiene una mezcla de efectos, por un lado, el aumento en la temperatura acelera la catálisis, mientras que por el otro, provoca la inactivación de la enzima por desnaturalización. De tal manera que a temperaturas por arriba de los 46°C la desnaturalización se hace más fuerte o importante que la activación. Este efecto se puede observar claramente en las fig. 6A, 7A y 8A, donde a los 5 min de incubación las actividades específicas a 48, 50 y 55°C son más altas que a los 10 y 20 min de incubación (fig. 7A y 8A). Esto sugiere que la enzima se mantiene activa durante pocos minutos a temperaturas altas y la actividad observada a los 10 o 20 min probablemente se realizó en los minutos iniciales, antes de la inactivación de la enzima por la temperatura. Por lo tanto la actividad específica calculada para los 10 o 20 min debe estar subestimada. Para evitar este problema, la manera de obtener las energías de activación del proceso de inactivación para una enzima, es realizar curvas de inactivación en función del tiempo

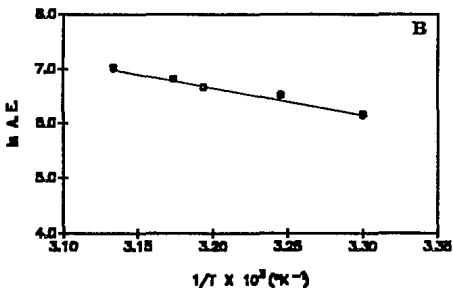
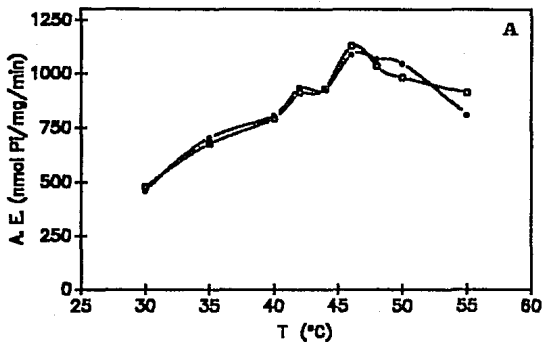


Fig2- 6.2 Efecto de la temperatura en la actividad de la ATPasa- (Ca^{2+}, Mg^{2+}) de sarcolema cardíaco, reconstituida en liposomas de PC (○) y liposomas de PC/COL (●). A) actividad de la enzima incubada durante 5 minutos a diferentes temperaturas. B) gráfica de Arrhenius correspondiente a los datos presentados en A.

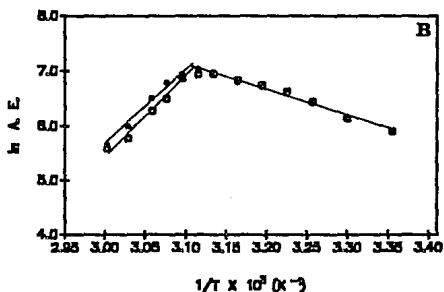
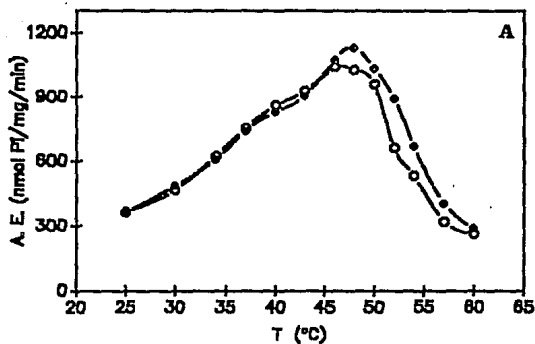


Fig. 7. Efecto de la temperatura en la actividad de la ATPasa- (Ca^{2+}, Mg^{2+}) de sarcolema cardíaco, reconstituida en liposomas de PC (○) y liposomas de PC/COL (●). A) actividad de la enzima incubada durante 10 minutos a diferentes temperaturas. B) gráfica de Arrhenius correspondiente a los datos presentados en A.

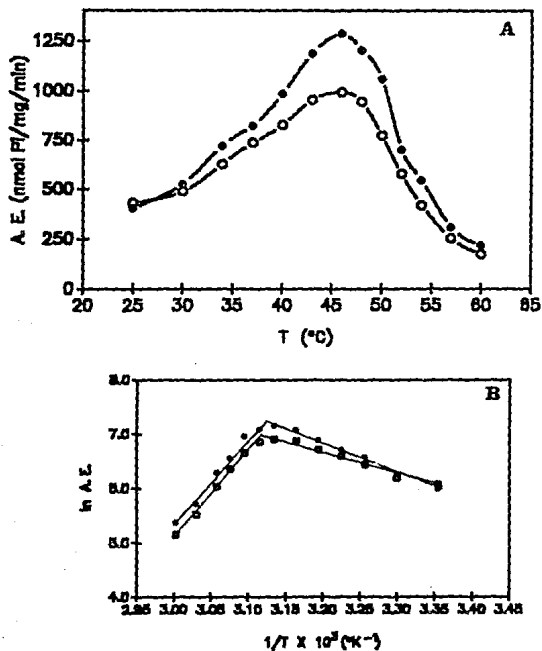


Fig 2+ B. 2+ Efecto del colesterol en la actividad de la ATPasa- (Ca^{2+}, Mg^{2+}) de sarcolema cardíaco, reconstituida en liposomas de PC (o) y liposomas de PC/COL (•). A) actividad de la enzima incubada durante 20 minutos a diferentes temperaturas. B) gráfica de Arrhenius de los datos presentados en A.

a diferentes temperaturas. Al graficar las constantes de inactivación (obtenidas de las curvas antes mencionadas) en gráficas de Arrhenius, se puede(n) obtener los valores de E_a , de manera similar a lo realizado para la actividad $ATPasa-Mg^{2+}/Ca^{2+}$ de microsomas cardíacos, cuyos resultados se muestran más adelante (figura 11.)

Con base en los resultados antes mencionados, se decidió determinar la actividad de la enzima a diferentes tiempos, a 4 temperaturas: 37, 40, 50 y 52°C. los datos obtenidos de estos experimentos se muestran en la figura 9. A temperaturas de 37 y 40°C la actividad de la enzima en liposomas de PC y PC/COL es prácticamente idéntica, debido a que el efecto desnaturizante de la temperatura es mínimo o nulo; mientras que a 50 y 52°C donde el efecto desnaturizante de la temperatura es un factor importante, la enzima reconstituida en liposomas de PC/COL se inactiva a tiempos mayores. Los resultados obtenidos con la $ATPasa-(Ca^{2+}, Mg^{2+})$ reconstituida en liposomas, sugieren que la presencia de colesterol en los liposomas protege y retarda la inactivación térmica de la enzima.

Tratando de probar la hipótesis de que el colesterol confiere estabilidad térmica a varias proteínas membranales, y aprovechando la disponibilidad de las membranas microsomales, se investigó el efecto de este lípido en la estabilidad térmica de una $ATPasa-Mg^{2+}$ de microsomas cardíacos de bovino. Para esto, se realizaron curvas de inactivación en función de la temperatura (como se describe en materiales y métodos). Los datos de actividad se reportan como $ATPasa-Mg^{2+}/Ca^{2+}$ total, debido a que el medio de incubación contenía, tanto magnesio, como calcio y no

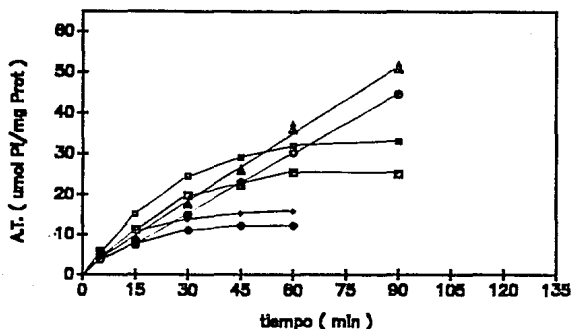


Fig. 9. Actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺)sarcolemal en función del tiempo de incubación y de la temperatura. 37 (○, ●); 40 (Δ, ▲); 50 (□, ■) y 52°C (◇, ◆). Símbolos vacíos, enzima reconstituida en liposomas de PC; símbolos rellenos, enzima reconstituida en liposomas de PC/COL. AT, actividad total. Promedio de 4 experimentos.

se restó la actividad ATPasa-Ca²⁺ que corresponde a unas 20-30 nmol Pi/mg/min de la actividad total. La actividad residual, determinada a 25°C, se normalizó a 1, donde 1 corresponde a una actividad de 380-400 nmol Pi/mg prot./min y se graficó en función de la temperatura de barrido (fig. 10). En las membranas con alto contenido de colesterol (32 μg de colesterol/mg de proteína) la inactivación de la ATPasa-Mg²⁺/Ca²⁺ se alcanza a temperaturas más altas, que en las membranas con bajo contenido de colesterol (15 μg de colesterol/mg de proteína) (fig. 10A). Al derivar los datos de las curvas presentadas en la figura 10A, se obtuvieron otro par de gráficas (fig. 10B), a partir de las cuáles se calculó la temperatura de inactivación de la enzima

(T_I). definida como la temperatura a la cual se alcanza la mitad del área bajo cada una de las curvas (115). De esta manera, los valores de T_I obtenidos para la actividad $ATPasa-Mg^{2+}/Ca^{2+}$ son los siguientes: $59.873 \pm 0.128^\circ C$ (n=8) para las membranas con alto colesterol y $58.868 \pm 0.267^\circ C$ (n=8) para las membranas con bajo contenido de colesterol. A partir de estos datos, se tomaron diez temperaturas cercanas a las T_I (53 a $62^\circ C$) y se realizaron curvas de inactivación en función del tiempo (fig. 11A y 11B). En estas curvas se puede apreciar claramente que la actividad residual a cada una de las temperaturas y tiempos es mayor en las membranas con alto contenido de colesterol. Las constantes de inactivación, obtenidas de las cinéticas de inactivación, se graficaron en gráficas de Arrhenius (fig. 11C). A partir de estas gráficas se calcularon las energías de activación para el proceso de inactivación de la $ATPasa-Mg^{2+}/Ca^{2+}$, siendo estos valores de 98.02 ± 5.28 (n=9) y 102.35 ± 6.4 kcal/mol (n=9), para las membranas con alto y bajo contenido de colesterol respectivamente. Independientemente de los cambios observados en las constantes de inactivación de la enzima a las diferentes temperaturas ensayadas (fig 11A y 11B), la E_a del proceso de inactivación de la $ATPasa-Mg^{2+}/Ca^{2+}$, practicamente no cambia al aumentar el contenido de colesterol en las membranas (fig. 11C). Es más, la E_a de dicho proceso de inactivación es ligeramente menor en las membranas con alto contenido de colesterol.

Llaman la atención los valores de E_a obtenidos para el proceso de inactivación de la $ATPasa-(Ca^{2+}, Mg^{2+})$ se sarcolema cardíaco, 6.58, 8.83 y 13.48 kcal/mol, para las membranas

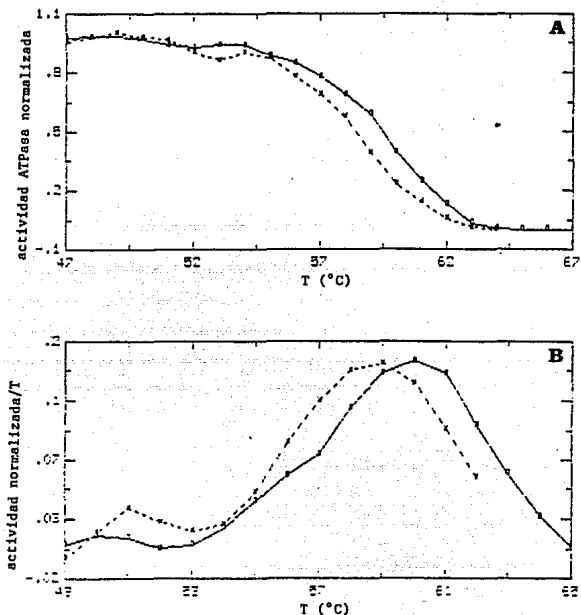


Fig. 10. Inactivación térmica de la ATPasa-Mg²⁺/Ca²⁺ de membranas microsomales cardíacas. A) curva de inactivación de la enzima en función de la temperatura. B) derivada de las curvas de inactivación presentadas en A. Símbolos: (x) membranas con bajo contenido de colesterol; (o) membranas con alto contenido de colesterol. Promedio de 8 experimentos.

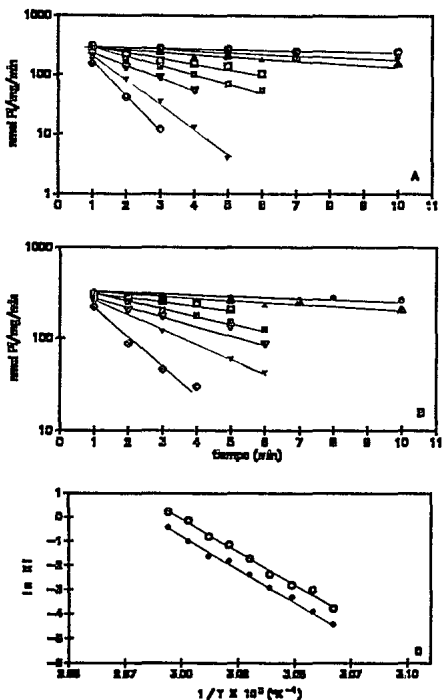


Fig. 11. Inactivación térmica de la ATPasa-Mg²⁺/Ca²⁺ en función del tiempo a diferentes temperaturas. A) membranas con bajo contenido de colesterol. B) membranas con alto contenido de colesterol. Símbolos (○) 53, (●) 54, (△) 55, (▲) 56, (□) 57, (■) 58, (▽) 59, (▼) 60, (◊) 61 y (◄) 62°C. C) gráfica de Arrhenius de las constantes de inactivación obtenidas de las curvas presentadas en A y B. (○) membranas con bajo contenido de colesterol; (●) membranas con alto contenido de colesterol. Experimento representativo de una serie de 9.

extraídas de colesterol, nativas e incorporadas con colesterol respectivamente (ver trabajo anexo). Estos valores están por debajo de los obtenidos en este trabajo para la ATPasa-Mg²⁺ microsomal y a los reportados para la mayoría de las proteínas, los cuales son mayores de 60 kcal/mol (96). La diferencia es prácticamente de un orden de magnitud. Por otro lado, las temperaturas elegidas para realizar las cinéticas de inactivación contra tiempo, no corresponden necesariamente a temperaturas cercanas a la temperatura de inactivación de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), como en el caso de la ATPasa-Mg²⁺/Ca²⁺ microsomal. Además, para la elaboración del gráfico de Arrhenius se tomaron únicamente tres constantes de inactivación, lo que puede o no reflejar la tendencia real del proceso de inactivación de ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) sarcolemal (ver trabajo anexo).

Una vez demostrado el efecto del colesterol en la inactivación térmica de la ATPasa-Mg²⁺ microsomal, se decidió estudiar el efecto del colesterol en la desnaturalización térmica de esta enzima, por medio de calorimetría diferencial de barrido. Los resultados obtenidos de esta serie de experimentos se muestran en la figura 12. La figura 12A muestra el perfil de desnaturalización de las membranas con bajo contenido de colesterol y la figura 12B el perfil correspondiente a las membranas con alto contenido de colesterol. La desnaturalización térmica de las proteínas es un proceso endotérmico que muestra un exceso de capacidad calorífica (C_p). La temperatura de transición (T_m) y los parámetros termodinámicos de cada componente se determinaron por deconvolución de los perfiles, de manera similar a lo realizado para las curvas de inactivación (fig. 10). La

desnaturalización fue completamente irreversible después de calentar las muestras a 100 °C, por lo tanto la deconvolución se realizó suponiendo que cada pico representa una transición de dos estados nativo k desnaturalizado, donde k representa la velocidad del desdoblamiento (unfolding) irreversible, la cual tiene una dependencia de temperatura de acuerdo a la ecuación de Arrhenius (108). Siguiendo este formalismo, los perfiles de desnaturalización obtenidos con el calorímetro (fig. 12), se separaron en cinco componentes (A-E). Cada uno de estos componentes tiene una temperatura de transición (T_m) característica, definida como la temperatura a la cuál se alcanza la mitad de la desnaturalización, o la mitad del área bajo la curva. Las temperaturas de transición de estos cinco componentes son: A 45.99°C; B 51.53°C; C 58.25°C; D 64.29°C y E 77.8°C para las membranas microsomales con bajo colesterol; mientras que para las membranas microsomales con alto contenido de colesterol los valores son 45.27, 53, 60.1, 64.52 y 75.2°C respectivamente. La transición C (subrayada) correlaciona muy bien con la temperatura de inactivación de la actividad ATPasa-Mg²⁺ (T_I = 58.868 y 59.83 °C para las membranas microsomales con bajo y alto contenido de colesterol respectivamente, fig. 10). Esto sugiere fuertemente que la desnaturalización del componente membranal C corresponde a la ATPasa-Mg²⁺.

De manera adicional, los datos obtenidos con el calorímetro diferencial de barrido muestran que el colesterol puede proteger a otras proteínas membranales contra la desnaturalización térmica, como lo son las comprendidas en los componentes B y D.

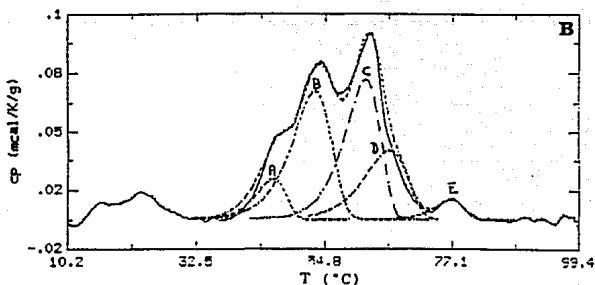
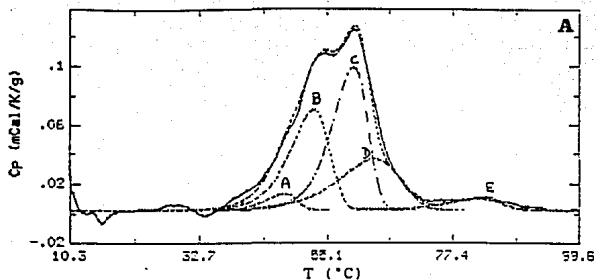


Fig. 12. Calorimetría diferencial de barrido de las membranas microsomales. A) perfil de desnaturalización de las membranas con bajo contenido de colesterol. B) perfil de desnaturalización de las membranas con alto contenido de colesterol. La línea continua representa el perfil original; líneas discontinuas componentes individuales A-E, obtenidos de descomponer el perfil original, y la línea punteada perfil obtenido de la suma de los componentes A-E. Promedio de dos experimentos.

Donde la temperatura de transición aumenta, al aumentar el contenido de colesterol de las membranas microsomales. Sin embargo, para los componentes A y E la temperatura de transición disminuye en las membranas con alto contenido de colesterol. Esto sugiere que el efecto protector del colesterol contra la desnaturalización térmica, puede ser una propiedad aplicable a varias proteínas membranales, incluyendo a la ATPasa-Mg²⁺ microsomal. Sin embargo, la disminución de los valores de T_m de los componentes proteicos A y E, de las membranas con alto contenido de colesterol, sugieren que el efecto protector del colesterol contra la desnaturalización térmica no es aplicable a todas las proteínas.

V. D I S C U S I O N

De manera general los resultados señalan que el colesterol protege a la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sarcolemal y a una ATPasa-Mg²⁺ de microsomas cardíacos contra la inactivación térmica, y sugieren una correlación positiva entre niveles de colesterol en las diferentes membranas empleadas y la termoestabilidad de las enzimas. Es decir a mayor contenido de colesterol en las membranas, mayor estabilidad térmica de las actividades enzimáticas mencionadas.

Los efectos del colesterol en la actividad (ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) y en la estabilidad térmica de las enzimas estudiadas, se pueden interpretar por cambios que este esteroide provoca en las propiedades físicas y organización de las membranas, como son: cambios en la fluidez de los lípidos membranales, cambios en la transición de fase de las membranas, cambios en las dimensiones membranales (espesor), cambios en la hidratación de las membranas, y finalmente por un efecto o interacción directa del colesterol con la proteína.

Se ha mencionado, que la inclusión de colesterol a las bicapas lipídicas puede provocar cambios en su grosor. En bicapas formadas por fosfolípidos con ácidos grasos menores de 16 carbonos, el colesterol provoca un aumento de aproximadamente 3-4 Å en su grosor, mientras que en bicapas formadas por fosfolípidos con ácidos grasos mayores a 16 carbonos el colesterol disminuye de 3-4 Å dicho grosor (47-48). La composición lipídica de la sarcolema cardíaca indica una abundancia de ácidos grasos de 18 y 20 carbonos, los cuales constituyen más del 70 % del total de

ácidos grasos (68). Es probable que la inclusión de colesterol a estas membranas provoque una ligera disminución en su grosor, lo que a su vez provoque que regiones muy pequeñas de la proteína (aproximadamente 2 Å a cada lado de la bicapa) que normalmente se encuentran embebidas en la bicapa, ahora se expóngan al medio acuoso. Estudios recientes señalan que uno de los sitios de unión para el calcio, esta muy cercano a la bicapa lipídica del lado citoplásmico (20-22). Por lo tanto, los posibles cambios en el espesor de la membrana, dados por la inclusión del colesterol pueden afectar la estructura de la proteína, en especial la del sitio para unión del calcio, reflejándose en una disminución de la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) sarcolemal. En apoyo a lo anterior, estudios realizados con la ATPasa-Ca²⁺ de RS, en los que se recambiaron los lípidos endógenos del RS por especies lipídicas conocidas, se encontró que para mantener la actividad de la enzima se requieren lípidos con ácidos grasos de 18 carbonos, obteniéndose una actividad máxima con la dioleil-PC, las fosfatidil-colinas con ácidos grasos más cortos o más largos dan una menor actividad (75-79). Lo anterior sugiere que tanto para la sarcolema, como para el RS debe existir "un punto óptimo" en el grosor de las membranas (dado por la abundancia de ácidos grasos de 18 carbonos) para que estas dos enzimas tengan a su vez una "actividad óptima". La disminución o aumento en el grosor de las membranas puede propiciar cambios en la estructura de estas ATPasas que se reflejen en una disminución de su actividad.

Paralelamente a los cambios en el espesor de la membrana, la presencia de colesterol reduce el grado de hidratación y

penetración del agua a las bicapas lipídicas (124). Estudios realizados con proteínas solubles y membranales, en sistemas de micelas invertidas en solventes orgánicos, señalan que al disminuir el contenido de agua, las enzimas disminuyen su actividad, sin embargo adquieren un grado muy importante de termoestabilidad (125-128). Con base en estas evidencias, es probable que el efecto protector del colesterol contra la inactivación térmica de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) y ATPasa-Mg²⁺, este dado en relación a una disminución en la hidratación de las membranas.

A temperaturas por arriba de la transición de fase de los lípidos membranales (gel a líquido-cristalino), el incremento en el contenido de colesterol provoca un incremento en el orden y un decremento en la velocidad de rotación de las cadenas de los ácidos grasos. Este aumento en el orden o empaquetamiento, y la reducción de la movilidad y flexibilidad de las cadenas de los ácidos grasos, puede estabilizar a las proteínas. Esto puede disminuir la frecuencia y/o amplitud del desdoblamiento de ciertos residuos de aminoácidos localizados en sitios funcionalmente importantes en las proteínas membranales, o provocar una estabilización generalizada de la proteína. Por lo tanto, los cambios derivados de la inclusión del colesterol a las membranas, pueden estar asociados con el hecho de tener que incrementar la temperatura para poder observar la inactivación y desnaturalización de las proteínas membranales estudiadas.

En apoyo a lo anteriormente comentado, estudios realizados con la rodopsina reconstituida en liposomas, señalan que la inclusión

de colesterol en los liposomas induce cambios conformacionales en la proteína (129). Estos cambios se han relacionado con los cambios en el orden y empaquetamiento de los ácidos grasos en las bicapas, inducidos por el esteroil (129). Por otro lado, estudios de dicroísmo circular realizados con dos proteínas de la membrana del eritrocito (la banda 3 y la glicoforina), así como con el receptor para acetilcolina, han reportado que un aumento en el contenido de colesterol en las membranas provoca un incremento en el contenido de alfa hélice de estas proteínas, (130,131). Es probable que un mecanismo similar este involucrado en la mayor estabilidad térmica de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sarcolemal y la ATPasa-Mg²⁺ de microsomas cardíacos, así como en el aumento en la temperatura de transición de la ATPasa-Mg²⁺ microsomal, inducidos por el incremento en el contenido de colesterol en las membranas. En este sentido, actualmente se ha iniciado el estudio de posibles cambios en la estructura secundaria de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sarcolemal inducidos por el colesterol. Para esto, la enzima se ha incorporado en liposomas de PC y PC/COL y se investigarán (por medio de dicroísmo circular), posibles cambios en la estructura secundaria de la enzima en función del contenido de colesterol y de la temperatura.

Para algunas enzimas membranales, su actividad parece ser dependiente de la fase lipídica. La actividad de la ATPasa-Ca²⁺ de RS disminuye marcadamente cuando los lípidos membranales pasan de una fase de líquido-cristalino a una fase de gel (72,132). Sin embargo, en sistemas reconstituidos se ha demostrado que los cambios en la fluidez de membrana no tienen una correlación con los cambios de actividad de la ATPasa-Ca²⁺ de RS (132). Esto

sugiere que la fluidez de membrana no es un factor determinante en la actividad de esta ATPasa (132-134). Al adicionar moléculas hidrofóbicas a las membranas como: colesterol (un agente rigidizante); ácido oleico o alcoholes (agentes fluidizantes), se logran cambios en la fluidez de la membrana. La adición de colesterol a la ATPasa-Ca²⁺ de RS, reconstituida en liposomas de dioleil-PC tiene efectos mínimos en la actividad, mientras que la adición de colesterol a la ATPasa reconstituida con dimiristoil-PC provoca un incremento en la actividad, a pesar de que hay una disminución en la fluidez (133). La adición de ácido oleico y alcohol oleílico tiene pequeños cambios en la actividad de la ATPasa reconstituida con dioleil-PC, mientras que en la enzima reconstituida con dimiristoil-PC provocan un incremento en la actividad (132,136). Estos resultados sugieren que los cambios en la actividad de la ATPasa-Ca²⁺ dependen de la estructura e interacción directa de los lípidos con la enzima, más que de los cambios en la fluidez de membrana (132-134). Una interpretación similar se ha dado a la actividad de varias proteínas de membrana, para las cuales la fluidez de membrana no parece ser un factor importante (25-27,49).

Tratando de dilucidar las interacciones lípido-proteína, se han realizado varios estudios con lípidos marcados con sondas fluorescentes, de EPR y NMR. Estos estudios señalan que el colesterol es excluido del anillo lipídico de la ATPasa-Ca²⁺ de RS, donde se encuentra preferentemente PC (133,135,137); mientras que el colesterol esta fuertemente asociado al receptor para acetilcolina, así como a la banda 3 y glicoforina del eritrocito

(138-141). La asociación del colesterol con el receptor para acetilcolina parece ser muy importante, y se ha reportado que 32 de sus 44 moléculas lipídicas de su anillo son colesterol (138,139). Estos estudios indican que algunas proteínas integrales de membrana están rodeadas por una capa de lípidos anulares, que son inmóviles en la escala de tiempo de ESR ($10^8/s$) y de un recambio más lento que el resto de los lípidos de la membrana, lo que da como resultado que la composición lipídica del anillo sea diferente a la del resto de la membrana (25,26,132-134). Los lípidos anulares pueden interactuar con las proteínas por medio de interacciones de van der Waals, interacciones electrostáticas de sus cabezas polares y contactos hidrofóbicos (26,37,38). Una función importante del anillo puede ser el seleccionar lípidos específicos y excluir a otros (25,26). Por ejemplo, la β -hidroxibutirato deshidrogenasa y la ATPasa- Ca^{2+} de RS interactúan preferencialmente con PC, la 5'-nucleotidasa con esfingomielina, citocromo c oxidasa con cardiolipina o fosfolípidos ácidos, y la glicoforina, la ATPasa- Na^+-K^+ y la rodopsina con fosfolípidos ácidos (25,26,132).

El hecho de que el colesterol sea excluido del anillo lipídico de la ATPasa- Ca^{2+} de RS, no excluye la posibilidad de una interacción directa de este lípido con la ATPasa-(Ca^{2+}, Mg^{2+}) de la membrana plasmática, donde la concentración de colesterol es mayor que en el RS. Un estudio previo, realizado en el laboratorio, en el que se determinó la unión de calmodulina a la ATPasa-(Ca^{2+}, Mg^{2+}) localizada en sarcolema cardíaco, demostró que la unión de calmodulina está en función del contenido de colesterol, lo que se interpretó como un efecto directo del

colestrol en la estructura de la proteína (69). En este sentido, existe la posibilidad de una interacción directa del colestrol con la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de sarcolema y la ATPasa-Mg²⁺ de microsomas cardíacos. La interacción directa del colestrol con estas enzimas, puede provocar cambios estructurales, que a su vez se pueden ver reflejados en cambios en su estabilidad o sensibilidad térmica.

Una interpretación adicional de los resultados, puede ser que la inclusión de colestrol en las membranas cambie el patrón de interacciones entre fosfolípidos y/o entre fosfolípidos y proteína (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y contactos de van der Waals) (36-38). Así mismo, la naturaleza relativamente plana y rígida de los anillos que conforman al colestrol, puede rigidizar las membranas y dificultar los cambios conformacionales de la enzima, necesarios durante su ciclo catalítico, a través de un mecanismo directo o indirecto. Estos cambios pueden afectar la estructura de la proteína, lo que se puede reflejar en cambios en su estabilidad térmica.

Por otro lado, los resultados obtenidos para la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de sarcolema cardíaco, señalan que la Km para el ATP no se modifica con la adición de colestrol a las membranas, lo que sugiere que algunas regiones de la enzima, como el sitio de baja afinidad para el ATP no son afectados por la inclusión de colestrol a las membranas. Además, estudios recientes en los que se reporta la secuencia de aminocidos y predicciones de la estructura secundaria y terciaria de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de membrana plasmática, señalan que el sitio de baja afinidad para

el ATP esta en el dominio citoplásmico, relativamente alejado de la membrana (20-22). Es probable que la(s) modificación(es) causadas por el colesterol en la estructura de la enzima, que la hacen más estable contra la inactivación térmica, sucedan o se den en regiones cercanas a la membrana. Por lo tanto, existe la posibilidad de que la organización de la región transmembranal sufra los cambios estructurales más importantes. Si se considera que durante el transporte de calcio, el ion tiene que atravesar la membrana, es probable que los cambios inducidos por el colesterol en la estructura de la proteína puedan afectar en mayor grado esta función, que la actividad ATPasa. Para probar esta hipótesis, próximamente se realizarán experimentos de inactivación térmica de la actividad de transporte de calcio con la enzima reconstituida en liposomas de PC y PC/COL.

No obstante los resultados presentados en este estudio, y los obtenidos por otros autores, en relación al efecto protector del colesterol contra la inactivación térmica de algunas proteínas de membrana y algunas líneas celulares en cultivo, existen otra serie de moléculas y mecanismos que confieren estabilidad térmica a las proteínas. El glicerol, que tiene un coeficiente de partición lípido/agua muy bajo, también protege a las proteínas de la desnaturalización por temperatura, no a través de sus efectos en la fase lípida, si no por contacto directo con las regiones polares de la proteína (95). La incorporación de ácidos grasos de cadena larga y saturados, protegen y estabilizan a varias enzimas membranales contra la inactivación térmica (49). La citocromo oxidasa mitocondrial de bovino y de levadura, reconstituidas en liposomas de dioleil-PC son más estables a la

desnaturalización térmica, que al ser reconstituídas en liposomas de dimiristoil-PC (142-144). Un resultado similar se obtuvo para la banda 3 del eritrocito (145).

Estudios realizados con células procariontes, señalan que estos organismos son capaces de modificar la composición lipídica de sus membranas, para hacer frente a cambios extremos de temperatura. Tal vez el caso más representativo lo constituyen las bacterias termófilas. Estos microorganismos tienen un contenido elevado de ácidos grasos saturados y ramificados, lo que aparentemente incrementa la estabilidad de las membranas y aumenta la temperatura de fusión de los lípidos (49,85,146). La cepa silvestre de Bacillus sterothermophilus tiene un óptimo de crecimiento a 65°C, mientras que una mutante, que es incapaz de incrementar la proporción de ácidos grasos de punto de fusión elevado, en respuesta a temperaturas elevadas, muestra un óptimo de crecimiento a 58°C (147). Una conclusión similar se obtuvo en un estudio de Yersinia enterocolitica, donde las células cultivadas a 5 o 22°C no pueden crecer al cambiarlas a 45°C, mientras que las células cultivadas a 37°C pueden crecer a a 45°C. Las células cultivadas a 22 y particularmente a 5°C tienen relaciones mucho más altas de ácidos grasos insaturados/saturados y una temperatura baja de transición de fase de los lípidos membranales (gel a líquido-cristalino), en comparación a las células cultivadas a 37°C. Las alteraciones en la composición de ácidos grasos inducidas por la temperatura, parecen ser necesarias para que este organismo explote su potencial de crecimiento a temperaturas altas, aparentemente por evadir una

condición "hiperfluida". De manera interesante, las células cultivadas a 37°C pueden crecer normalmente a 5°C, aparentemente porque la transición de fase lipídica, determinada por calorimetría diferencial de barrido es de 1°C por debajo de la temperatura de crecimiento, por lo que la mayoría de los lípidos está en estado líquido-cristalino a 5°C (148). Resultados similares se han obtenido con diferentes cepas de E. coli y varias especies de micoplasmas (para revisión de este tema, ver la ref. 49).

Lo anterior lleva a una pregunta interesante, si los organismos procariontes que en general carecen de colesterol son capaces de regular eficientemente las propiedades de sus membranas, aparentemente de una manera más económica, como lo son los cambios en los ácidos grasos; entonces ¿qué ventajas representa la presencia de colesterol y otros esteroides en las membranas de los organismos eucariontes?. Aunque la síntesis de colesterol es energéticamente más cara que la modificación de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos, la presencia del colesterol en las membranas constituye un mecanismo altamente eficiente para regular las propiedades de las membranas de manera "instantánea" y no a través de un mecanismo a mediano y/o a largo plazo, como lo es la modificación y síntesis de novo de ácidos grasos. Por arriba de la transición de fase de los lípidos membranales, el colesterol rigidiza o estabiliza a las membranas; mientras que por debajo de estas temperaturas de transición, la presencia del esteroide aumenta la fluidez de los lípidos membranales. Por esto, se ha considerado que en las membranas el colesterol funciona como un amortiguador de los cambios de

fluidez inducidos por la temperatura.

En resumen se puede decir, que el efecto del colesterol en la estabilidad térmica de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺)sarcolemal y ATPasa-Mg²⁺ microsomal puede estar dado por cambios en las propiedades físicas de las membranas, a través de un efecto directo del esteroles en la estructura de las enzimas, o la combinación de ambos mecanismos. Sin embargo, es necesario realizar estudios exhaustivos para entender el papel del colesterol en la actividad y estabilidad térmica de estas enzimas membranales. En relación a esto, actualmente se están realizando en el laboratorio experimentos encaminados a demostrar, si el efecto del colesterol descrito en este estudio es un efecto directo o indirecto sobre la estructura de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de membrana plasmática. Para este fin, la enzima ha sido aislada y reconstituida en liposomas de composición lipídica conocida. Con este sistema experimental se investigarán posibles cambios en la estructura de la proteína, en función del contenido de colesterol y de la temperatura. Así mismo, se pretende investigar la posibilidad de una interacción directa del colesterol con esta enzima, empleando para ello colesterol marcado con sondas fluorescentes y/o de EPR. Para probar la posibilidad de un mecanismo indirecto, dado por cambios en las propiedades físicas de las membranas, se realizarán experimentos de calorimetría para investigar posibles cambios en las temperaturas de transición de los liposomas de PC y PC/COL.

Por otro lado, los resultados presentados sugieren que el efecto protector del colesterol contra la inactivación o

desnaturalización térmica, puede ser una propiedad común de una serie de proteínas membranales. Para probar esta hipótesis, se podría estudiar el efecto del colesterol en la actividad y desnaturalización térmica de diferentes proteínas membranales.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo permiten concluir:

1. El aumento en el contenido de colesterol en la sarcolema cardíaca tiene un efecto inhibitorio en la actividad de la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺). Este efecto inhibitorio se pierde al aislar a esta enzima de su membrana nativa y reconstituirla en liposomas de PC/COL.
2. Un incremento en las concentraciones de colesterol en los tres sistemas membranales estudiados (sarcolema, liposomas y microsomas cardíacos), confiere estabilidad térmica a la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) sarcolemal; así como a la ATPasa-Mg²⁺ microsomal.
3. La inactivación, así como la desnaturalización de la ATPasa-Mg²⁺ microsomal se alcanza a temperaturas mayores al incrementar el contenido de colesterol en las membranas.
4. Para la ATPasa-(Ca²⁺,Mg²⁺) de sarcolema cardíaco, el incremento en el contenido de colesterol de las membranas, provoca un aumento en la energía de activación necesaria para inactivar a la enzima; mientras que para la ATPasa-Mg²⁺ microsomal, la inclusión de colesterol a las membranas produce una ligera disminución de este parámetro.
5. Los resultados obtenidos por medio de calorimetría diferencial de barrido sugieren, que el efecto protector del colesterol contra la desnaturalización e inactivación térmica, puede ser una característica común de varias proteínas membranales.

VII. REFERENCIAS

1. Rasmussen, H. and Goodman, D.B.P. (1977) *Physiol. Rev.* 57,421-509.
2. Carafoli, E. and Crompton, M. (1978) *Curr. Top. Memb. Transp.* 10,151-216.
3. Kretsinger, R.H. (1976) *Int. Rev. Cytol.* 46,323-393.
4. Mas-Oliva, J. (1987) *Ciencia* 38,29-38.
5. Baker, P.F., Blaustein, M.P., Hodgkin, A.L. and Steinhardt, R.H. (1969) *J. Physiol.* 200,431-458.
6. Reuter, H. and Seitz, N. (1968) *J. Physiol.* 195,451-470.
7. Reeves, J.P. and Sutko, J.L. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79,590-594.
8. Blaustein, M.P. and Nelson, M.I. (1982) In: *Membrane Transport of Calcium* (Carafoli, E. ed.), pp 217-236. Academic Press, London.
9. Shatzman, H.J. and Vincenzi, F. (1969) *J. Physiol.* 201,369-395.
10. Rega, A.F. and Garrahan, P.J. (1985) *The calcium pump of plasma membranes.* CRC press, Florida; 173 pp.
11. Carafoli, E. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56,395.
12. Carafoli, E. and Zurini, M. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 683,279-301.
13. Chapman, R. A. (1979) *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 35,1-52.
14. Kelly, R.B., Deustsch, J. W., Carlson, S.S. and Wagner, J.A. (1979) *Ann. Rev. Neurosci.* 2,399-446.
15. Aimers, W., Fink, R. and Palade, P.T. (1981) *J. Physiol.* 312,177-207.
16. Malouf, N.N., Coronado, R., MacMahon, D., Meisner, G. and Gillespie, G.Y. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84,5019-5023.
17. Lee, K.S. and Tsien, R.W. (1983) *Nature.* 302,790-794.
18. Dunn, S.M. (1989) *J. Biol. Chem.* 264,11052-11060.
19. MacLennan, D. H. (1970) *J. Biol. Chem.* 245,4505-4518.
20. Shull, G.E. and Greeb, J. (1988) *J. Biol. Chem.* 263,8646-8657.
21. Verma, A.K. y col. (1988) *J. Biol. Chem.* 263,14152-14159.
22. MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B. and Green, N.M. (1985) *Nature (Lond)* 316,696-700.
23. Schatzman, H.J. (1981) *Membrane transport of calcium.* Academic Press, London.
24. Mas-Oliva, J., de Meis, L. and Inesi, G. (1983) *Biochemistry* 22,5822-5825.
25. Gordon, L.M. and Mobley, P.W. (1985) In: *Membrane Fluidity in Biology* (Aloia, R.C. and Boggs, J.M., Ed.) Academic Press, Florida, pp 1-49.
26. Sweet, W.D., and Schroeder, F. (1988) In: *Lipid Domains and the Relationship to membrane Function* (Aloia, R.C., Curtain, C.C. and Gordon, L.M., Ed.) Alan, R. Liss, New York, pp. 17-42.
27. Curtain, C.C., Gordon, L.M. and Aloia, R.C. (1988) In: *Lipid Domains and the Relationship to Membrane Function* (Aloia, R.C., Curtain, C.C. and Gordon, L.M., Ed.) Alan, R. Liss, New York, pp 1-15.

28. Evans, W.H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 604,27-64.
29. Kawai, K., Fujita, M. and Nakao, M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 369,222-233.
30. Brasitus, T.A. and Schachter, D. (1980) *Biochemistry* 19,2763-2769.
31. Brasitus, T.A. and Schachter, D. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 774,138-146.
32. Sabbadini, R. and Dhams, S. (1989) *J. Bioenerg. Biomemb.* 21,163-212.
33. Stockton, G.W. and Smith, I.C.P. (1976) *Chem. Phys. Lipids* 17,251.
34. Franks, N.P. (1976) *J. Mol. Biol.* 100,345.
35. Oldfield, E., Meadows, M., Rice, D. and Jacobs, R. (1978) *Biochemistry* 17,2727.
36. Presti, F.T. and Chan, S.I. (1982) *Biochemistry* 21,3821-3830.
37. Presti, F.T. (1985) In: *Membrane Fluidity in Biology*. Academic Press, Orlando, FL. pp 97-146.
38. Yeagle, P.L. (1987) *The membranes of cells*. Academic Press, Orlando, FL. 292 pp.
39. Mabrey, S. and Sturtevant, J.M. (1978) *Methods Memb. Biol.* 9,237-274.
40. Mabrey, S., Mateo, P.L. and Sturtevant, J.M. (1978) *Biochemistry* 17,2464-2468.
41. Estep, T.N., Mountcastle, D.B., Biltonen, P.L. and Thompson, T.E. (1978) *Biochemistry* 17,1984-1989.
42. Estep, T.N. y col. (1979) *Biochemistry* 18,2112-2117.
43. Melchior, D.L., Scavitto, F.J. and Steim, J.M. (1980) *Biochemistry* 19,4828-48334.
44. Rubenstein, J.L.R., Smith, B.A. and McConnell, H.M. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76,15-18.
45. Rubenstein, J.L.R., Owicki, J.C. and McConnell, H.M. (1980) *Biochemistry* 19,569-573.
46. Margus, V.R. and Davis, J.H. (1990) *Biochemistry* 29,451-464.
47. McIntosh, T.J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 513,43.
48. Schwarz, F.T., Paltaufm F. and Laggner, P. (1976) *Chem. Phys. Lipids* 17,423.
49. McElhaney, R.N. (1985) In: *Membrane Fluidity in Biology* (Aloia, R.C. and Boggs, J.M., Ed.) academic Press, Orlando, FL. 147-208 pp.
50. Melchior, D.L. and Czech, M. (1979) *J. Biol. Chem.* 254,8744-8747.
51. Grunze, M., Forst, B. and Deuticke, B. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 600,861-869.
52. Carruthers, A. and Melchior, D.L. (1988) In: *Lipid Domains and the Relationship to Membrane Function* (Aloia, R.C., Curtain, C.C. and Gordon, L.M., Ed.) Alan R. Liss, New York. pp 201-225.
53. Papaahajoupoulos, D., Gowden, M. and Kimlberg, H. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 330,8-26.
54. Flaherty, J.O. y col. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 401,177-183.
55. Kroes, J. and Ostwald, R. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 249,647-650.
56. Scarpa, A. and DeGier, J. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 241,789-797.
57. DeKruyff, B., Demel, R.A. and van Deenen, L.L.M. (1972)

- Biochim. Biophys. Acta 255,331-347.
58. Esser, A.F., Bartolomew, P.M., Parce, J.W. and MacConnell, H.M. (1979) *J. Biol. Chem.* 254,1768-1770.
 59. Shiga, T. and Maeda, N. (1980) *Biorheology* 17,485-499.
 60. Richards, D.E., Vidal, J.C., Garrahan, P.J. and Rega, A.F. (1977) *J. Membr. Biol.* 35,137.
 61. Roelofsen, B. and Schatzmann, H.J. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 464,17.
 62. Ronner, P., Gazzoti, P. and Carafoli, E. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 179,578.
 63. Niggli, V., Penniston, J.T. and Carafoli, E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254,9955.
 64. Gietzen, K., Tejcka, M. and Wolf, H.W. (1980) *Biochem. J.* 189,81.
 65. Niggli, V., Adunyah, E.S., Penniston, J.T. and Carafoli, E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256,395.
 66. Missiaen, L. y col. (1989) *Biochem. J.* 263,687-694.
 67. Wrzosek, A. y col. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 986,263-270.
 68. Ortega, A. and Mas-Oliva, J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 773,231-236.
 69. Ortega, A. and Mas-Oliva, J. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139,868-874.
 70. Yeagle, P.L. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 727,39-44.
 71. Meissner, G. and Fleischer, S. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 255,19-33.
 72. Warren, G.B. y col. (1974) *Biochemistry* 13,5501-5507.
 73. Hidalgo, C., de la Fuente, M. and Gonzalez, M.E. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 247,365-376.
 74. Warren, G.B. y col. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71,622-626.
 75. Johansson, A. y col. (1981) *J. Biol. Chem.* 256,1643-1650.
 76. Caffrey, M. and Feigenson, G.W. (1981) *Biochemistry* 20,1949-1961.
 77. East, J.M. and Lee, A.G. (1982) *Biochemistry* 21,4144-4151.
 78. Fround, R.J. y col. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 860,354-360.
 79. Bennett, J.P. y col. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 513,310-320.
 80. Madden, T.D., King, M.D. and Quinn, P.J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 641,265-269.
 81. Madden, T.D., Chapman, D. and Quinn, P.J. (1979) *Nature* 279,538-541.
 82. Johansson, A., Keightley, C., Smith, G.A. and Metcalfe, J.C. (1981) *Biochem. J.* 196,505-511.
 83. Hesketh, T.R. y col. (1976) *Biochemistry* 15,4145-4151.
 84. Lepock, J.R. (198)
 85. Langworthy, T.A. (1982) *Curr. Top. Membr. Transp.* 17,45-77.
 86. Hidvegi, E.J., Yatvin, M.B., Dennis, W.H. and Hidvegi, E. (1980) *Oncology* 37,360-363.
 87. Cress, A.E. and Gerner, E.W. (1982) *Nature (Lond)* 283,677-679.
 88. Cress, A.E., Culver, P.S., Moon, T.E. and Gerner, E.W. (1982) *Cancer Res.* 42,1716-1721.
 89. Anderson, R.L., Minton, K.W., Li, G.C. and Hahn, G.M. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 641,334-348.

90. Anderson. R.L. and Parker. R. (1982) *Int. J. Radiat. Biol.* 42,57-69.
91. Konings, A.W. and Ruifrok, A.C. (1985) *Radiat. Res.* 102,86-98.
92. Anderson. R.L., Tao. T-W. and Hahn. G.M. (1984) In: *Hipertermic Oncology*, Vol. 1, 123-126.
93. Lepock, J.R., Cheng, K-H., Al-Qysi, H. and Kruuv. J. (1983) *Can. J. Biochem.* 61,421-428.
94. Lepock, J.R. (1982) *Radiat Res.* 92,433-438.
95. Cheng, K-H., Hui, S.W. and Lepock, J.R. (1987) *Cancer Res.* 47,1255-1262.
96. Segel, I. (1975) *Enzyme kinetics*. John Wiley & Sons, U.S.A. pp. 926-934.
97. Saderman, H. (1878) *Biochim. Biophys. Acta* 515,209-237.
98. McElhaney R.N. (1982) *Chem. Phys. Lipids* 30,229-259.
99. McElhaney. R.N. (1982) *Curr. Top. Membr. Transp.* 17,317-380.
100. Han, M.H. (1972) *J. Theor. Biol.* 35,543-568.
101. Sullivan, K.H., Jain, M.K. and Koch, A.L. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 352,287-297.
102. Jinks, D.C., Silvius, J.R. and McElhaney, R.N. (1978) *J. Bacteriol.* 136,1027-1036.
103. Anzai, K., Kirino, Y. and Chimizu, H. (1978) *J. Biochem. (Tokyo)* 84,815-821.
104. Dean, W.L. and Tanford, C. (1978) *Biochemistry* 17,1683-1690.
105. Dixon, M. and Webb, E.C. (1964) "Enzymes", 2nd Ed. pp 145-166. Academic Press, New York.
106. Privalov, P.L. (1982) *Adv. Protein Chem.* 35,1-104.
107. Tsalkora, T.N. and Privalov, P.L. (1985) *J. Mol. Biol.* 181,533-544.
108. Lepock, J.R., Rodahl, A.M., Zhang, C., Heynen, M.L., Waters, B. and Cheng, K-H. (1990) *Biochemistry* 29,681-689.
109. Kagawa, Y. and Racker, E. (1971) *J. Biol. Chem.* 246,5477-5487.
110. Gopalakrishna, R. and Anderson, W.B. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104,830-836.
111. Oliva, G. (1990) Tesis Maestría. Facultad de Medicina, U.N.A.M.
112. Benaim, G., Zurini, M. and Carafoli, E. (1984) *J. Biol. Chem.* 259,8471-8477.
113. Hacker, H. and Racker, E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254,6589.
114. Penefsky, H.S. (1977) *J. Biol. Chem.* 252,2891-2899.
115. Ortega, A. and Lepock, J.R. (1991) enviado a publicación.
116. Fabiato, A. (1988) *Methods Enzimol.* 157,378-416.
117. Lanzetta, A. (1979) *Anal. Biochem.* 100,95-97.
118. Lowry, O.H. y col. (1951) *J. Biol. Chem.* 193,265-275.
119. Bensadoun, A. and Weinstein, D. (1976) *Anal. Biochem.* 70,241-250.
120. Laemmli, U.K. (1970) *Nature (Lond)* 227,680-685.
121. Oakley, R.B., Kirsch, R.D. and Morris, R.N. (1980) *Anal. Biochem.* 105,361-363.
122. Caroni, P. and Carafoli, E. (1981) *J. Biol. Chem.* 256,3263-3270.
123. Mas-Oliva, J. (1991) enviado a *Mol. Cell. Cardiol.*
124. Simon, S.A., McIntosh, T.J. and Latorre, R. (1982) *Science* 216,65-68.
125. Zacks, A. and Klibanov, A.M. (1984) *Science* 224,1249-1251.

126. Wheeler, C.J. and Croteau, R. (1986) Arch. Biochem. Biophys. 248,429-434.
127. Ayala, G., Tuena de Gómez-puyou, M., Gómez-Puyou, A. and Darzon, A. (1986) FEBS Lett. 203,41-43.
128. Garza-Ramos, G., Darzon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. and Gómez-Puyou, A. (1989) Biochemistry 28,3177-3182.
129. Mitchell, D.C., Straume, M., Miller, J.L. and Litman, B.J. (1990) 10th International Biophysics Congress. P2.5.15. July 29-August 3, Vancouver, Canada.
130. Rooney, M.W., Lange, Y. and Kauffman, J.W. (1984) J. Biol. Chem. 259,8281-8285.
131. Fong, T.M. and McNamee, M.G. (1987) Biochemistry 26,3871-3880.
132. Lee, A.G. (1988) In: Lipid Domains and the Relationship to Membrane Function (Aloia, R.C., Curtain, C.C. and Gordon, L.M., Ed. Alan Liss, New York, pp 111-139.
133. East, J.M., Jones, O.T., Simmonds, A.C. and Lee, A.G. (1984) J. Biol. Chem. 259,8070-8071.
134. Lee, A.G., Michelangeli, F. and East, J.M. (1989) Biochem. Soc. Trans. 17,932.
135. Simmonds, A.C. y col. (1982) Biochim. Biophys. Acta 693,398-406.
136. Fround, R.J., East, J.M., Jones, O.T. and Lee, A.G. (1986) Biochemistry 25,7549-7552.
137. Silvius, J.R. y col. (1984) Biochemistry 23,538-547.
138. Ellena, J.F., Blazing, M.A. and McNamee, M.G. (1983) Biochemistry 22,5523-5535.
139. McNamee, M.G. and Fong, T.M. (1988) In: Lipid Domains and the Relationship to Membrane Function (Aloia, R.C., Curtain, C.C. and Gordon, L.M., Ed.) Alan Liss, New York, pp 43-62.
140. Schubert, D. and Boss, K. (1982) FEBS Lett. 150,4-8.
141. Yeagle, P.L. (1984) J. Memb. Biol. 78,201.
142. Rigell, C.W., de Saussure, C. and Freire, E. (1985) Biochemistry 24,5638-55646.
143. Rigell, C.W. and Freire, E. (1987) Biochemistry 26,4366-4371.
144. Morin, P.E., Diggs, D. and Freire, E. (1990) Biochemistry 29,781-788.
145. Maneri, L.R. and Low, P.S. (1988) J. Biol. Chem. 263,16170-16178.
146. Amelunxen, R.E. and Murdock, A.L. (1978) Mechanisms of termophily. CRC Crit. Rev. Microbiol. 6,343.
147. McElhaney, R.N. and Souza, K.A. (1976) Biochim. Biophys. Acta 443,348-359.
148. Abbas, C.A. and Card, G.L. (1980) Biochim. Biophys. Acta 602,469-476.

VII. A N E X O

CHOLESTEROL EFFECT ON THERMOSTABILITY OF THE (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase
FROM CARDIAC MUSCLE SARCOLEMMMA.

Jaime Mas-Oliva and Juan Santiago-García.

Instituto de Fisiología Celular, Depto. de Bioenergética.
Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal
70-600, 04510 México, D.F. MEXICO.

Received January 9, 1990

Received after revision, March 26, 1990

SUMMARY. When the cholesterol concentration in the sarcolemmal system is raised, the (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase activity acquires an important degree of thermostability; phenomena that is completely lost if the experiment is carried out with cholesterol depleted sarcolemma. In this system, a gradual depletion of sarcolemmal cholesterol, renders the ATPase remarkably sensitive to temperature. At different concentrations of ATP, it is found that cholesterol affects the V_{max} of the (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase but not its K_m . These results support our earlier suggestion of a direct effect of cholesterol upon the enzyme, and opens a possible mode of action of cholesterol on the enzyme. It is suggested that the inverse relationship between catalysis and thermostability is due to differences in the flexibility of the enzyme directly related to hydrophobicity changes caused by cholesterol.

Although there is general scientific agreement that the level of cholesterol in mammalian cellular membranes profoundly influences the activity of many properties associated with those membranes, like for instance metabolite permeability and enzyme activity (1,2); there are many specific instances in the literature of confusion over the extent and even the direction of this influence. Nevertheless, it is well accepted that the optimum physiological rate showed by several if not all functions carried out by the cell membrane, responds to an optimum association with the lipids contained in these membranes (3). Therefore, although the function of these membranes is per se represented by the properties of the different membrane proteins, this function namely: enzyme activity, ligand binding, metabolite

Abbreviations used: Tris, tris (hydroxy-methyl) aminomethane;
Ea, activation energy; PC, phosphatidylcholine; PE, phosphatidylethanolamine;
SM, sphingomyelin; PG, phosphatidylglycerol; PS, phosphatidylserine; T_c ,
phase transition temperature.

J. Mas-Oliva to whom correspondence should be addressed.

0158-5231/90/080233-09\$01.00/0

Copyright © 1990 by Academic Press Australia.
All rights of reproduction in any form reserved.

transfer, etc., invariably requires of conformational changes of the proteins involved in the specific mechanisms, that in turn might be profoundly affected by the different membrane lipids (4-6). Based in our results as well as in the reports of other groups, it has been proposed that among these lipids, cholesterol in particular can be effective in the control of the expression of these conformational changes (6-10).

Recent studies from our laboratory employing natural lipid membranes, investigating the (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase from cardiac sarcolemma, consistently have shown that this activity is inversely proportional to the cholesterol concentration of the membranes; showing a low ATPase activity with a high cholesterol content, and vice versa, a high ATPase activity with low concentrations of the lipid (7,8). These results support the concept that for each cell membrane, there is a certain optimum physico-chemical 'status' for its lipid components with cholesterol in particular. In a collective way, this phenomena represents a crucial factor in the regulation of membrane function (11).

Directly related to the concept above mentioned, much interest has been acquired by the possibility that membrane cholesterol could influence the thermal sensitivity of lipids and proteins (12,13). Although it is known that the properties of cholesterol are not the only factor for membrane thermostability, our results suggesting a direct association of cholesterol with the sarcolemmal (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase (7,8), together with the positive correlations of thermostability between cholesterol and several other protein systems studied (12,13), indicate that cholesterol might carry out an important conditioning of the properties of the different membrane proteins, reflected on activity changes and thermostability. This study was undertaken to explore if the activity changes observed for the sarcolemmal (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase modulated by cholesterol might be related to the phenomena of protection of the enzyme from thermal inactivation.

MATERIALS AND METHODS

Incorporation and depletion of cholesterol from isolated cardiac sarcolemma. The sarcolemmal preparation was isolated from the ventricular muscle of New Zealand White rabbits as previously reported (7,14). Changes in the sarcolemmal cholesterol content were accomplished by incubating the vesicles in treated human plasma supplemented with or without cholesterol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) based on the method described by Shinitzky (15) as previously modified by us (7). The cholesterol level of the different sarcolemmal fractions was determined by means of a colorimetric assay kit

employing an enzymatic system kit based on the oxidation of cholesterol (Boehringer, Mannheim).

Thermal inactivation. Aliquots of control and treated sarcolemmal vesicles depleted or incorporated with cholesterol, contained in 50 mM Tris-malate (Sigma) (pH 7.4), were preincubated in a circulating water bath at different temperatures. After the different times employed had elapsed, the preincubation was terminated by diluting the samples two-fold with the ATPase assay medium containing no ATP (Sigma). The reaction tubes containing the diluted samples were left at room temperature for 1 min before the (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase activity was initiated at 37°C with the addition of the indicated ATP concentrations. All preincubation mixtures contained a mixture of streptomycin/gentamycin 100 µg/ml in order to prevent bacterial growth.

Measurement of the sarcolemmal (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase activity. The sarcolemmal (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase activity was assayed for 10 min at 37°C in an incubation medium containing 50 mM Tris-malate (pH 7.4), 10 mM $MgCl_2$, 100 µM $CaCl_2$ and 2 mM ATP or different ATP concentrations as indicated in several specific experiments. In all instances, the reaction was initiated with the addition of ATP-Tris (pH 7.4) to give the different final concentrations, and stopped with trichloroacetic acid to give a final concentration of 10%. All assays were carried out utilizing an average protein concentration of 100 to 200 µg/assay point. The protein concentration of the different samples was assayed following the method described by Bradford (16), and the liberation of phosphate measured according to the method described by Fiske and Subbarow (17). All reagents used were of the highest quality.

RESULTS

Followed by the *in vitro* incorporation procedure, the cholesterol concentration of the sarcolemmal vesicles was increased from the normal value of 52 µg cholesterol for the native membranes, to 216 µg cholesterol/mg protein; whereas the depletion assay reduced the concentration of sarcolemmal cholesterol to 26 µg/mg protein. These changes in the sarcolemmal cholesterol concentration directly influenced the basal (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase activity at the different temperatures tested, in comparison to the activity observed in native sarcolemmal vesicles (Fig. 1). Figure 1 also shows a typical experiment of thermal inactivation of the ATPase activity when the sarcolemmal vesicles containing different levels of cholesterol were subjected to preincubation at different temperatures 40, 45, 50°C. From these experiments, it is first observed that thermal inactivation is a function of time and the cholesterol concentration of the membranes; with the highest inactivation kinetics shown by the cholesterol depleted sarcolemma. In contrast, the highest thermostability of the enzyme activity was obtained with the cholesterol incorporated sarcolemma. Figure 2 shows the inactivation plots of the (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase activity at the three temperatures tested, as a function of the time of preincubation for the native, cholesterol depleted

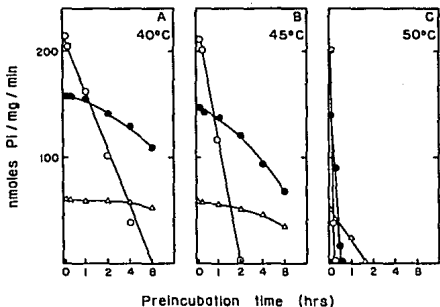


Fig. 1. Thermostability of (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase as a function of sarcolemmal cholesterol content and heat preincubation. Native (\bullet), cholesterol depleted (\circ), and cholesterol incorporated (Δ) sarcolemma. Representative experiment in a series of three.

and cholesterol incorporated sarcolemma. The (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase activity was expressed as the percentage of the original activity with respect to the control activity obtained from the membranes directly assayed for the ATPase with no heat preincubation. From these experiments, it is clearly observed that the rate of inactivation of the ATPase for the native and the cholesterol incorporated sarcolemma are lower than that obtained for the cholesterol depleted sarcolemma (Fig. 2). Arrhenius plots showed that the rate of thermal inactivation of the ATPase for the native and the cholesterol incorporated membranes are lower than the one obtained when cholesterol depleted membranes were used (Fig. 3). The ATPase activation energies (E_a) calculated from these plots correspond to 6.58, 8.83 and 13.48 Kcal/mol for the cholesterol depleted, native, and cholesterol incorporated membranes respectively. This set of results suggests that a high cholesterol concentration protects the (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase from heat-induced inactivation.

Interestingly, when the sarcolemmal vesicles containing different cholesterol concentrations were assayed for their ATPase activity in the

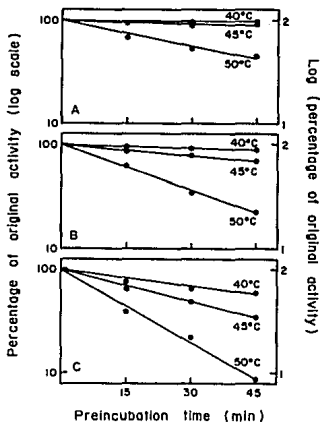


Fig. 2. Inactivation of (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase as a function of time of preincubation at 40, 45 and 50°C. Cholesterol incorporated (A), native (B), and cholesterol depleted sarcolemma (C).

presence of different ATP concentrations, it was observed that depending on the membrane cholesterol level, only the V_{max} was affected with no apparent changes in the K_m of the enzyme for ATP (Fig. 4). From these plots the calculated K_m value corresponds to 0.29 mM ATP.

DISCUSSION

Several reports studying the phenomena of thermostability in eukaryotic systems have suggested similarities with the physical changes observed during the acclimation to elevated temperatures of prokaryotic membranes incorporated with cholesterol (12). In general, if these membranes that normally do not contain sterols are exposed to elevated temperatures, an increase in membrane permeability is observed; phenomena that can be reversed with the introduction of cholesterol to the membrane (12).

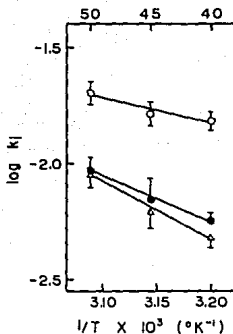


Fig. 3. Arrhenius plots of the rate of inactivation (k_1) for the native (\bullet), cholesterol incorporated (Δ), and cholesterol depleted (\circ) sarcolemma. Bars represent the standard error of three experiments.

An important explanation of this phenomena has been thought to be related to the unfolding of the proteins during thermal inactivation, that might result from a decrease in the covalent forces responsible for maintaining their native conformation (13). Moreover, there is evidence that suggests that water is involved in the maintenance of noncovalent interactions in several enzyme systems. Based on these observations and the proposal that cholesterol might reduce bilayer hydration (18), the possibility that the normal arrangement of hydrogen bonding between water and the different phospholipids surrounding the enzyme may be disrupted with the introduction of cholesterol to the mixture, can be suggested. There is evidence that cholesterol, may not associate with all lipids in the membrane to an equal extent (19). Differential scanning calorimetry studies have shown that in noncrystallizing mixtures of PC-PE, PC-SM, SM-PE, PE-PG, and SM-PS, the order of preference of cholesterol for the different lipids is $SM \gg PS-PC > PC \gg PE$ regardless of whether the preferred lipid was the higher or lower melting lipid of the mixture (20,21). The lack of preference for PE was

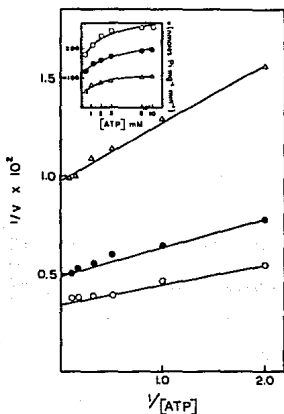


Fig. 4. Effect of sarcolemmal cholesterol content on ATP dependence of (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase (insert). Lineweaver-Burk plots for native (●), cholesterol depleted (○), and cholesterol incorporated (Δ) sarcolemma.

explained by its involvement in intermolecular interactions which would require energy to break up. On the other hand, the preference of cholesterol for SM over PC was explained to the greater hydrogen bonding found between cholesterol and PC. It has been suggested that breaking of the intermolecular hydrogen bonds could be compensated by the reduction of the surface charge density (22). Since cholesterol lowers the T_c of PE (22) and SM (23) while it has no effect on, or rises the T_c of PC, suggests that when cholesterol mixes with PE and SM it disrupts the intermolecular hydrogen bonding.

This type of observations have lead to the design of experiments where soluble (24,25), as well as membrane-bound enzymes (26,27) have been assayed at low water concentrations in the presence of organic solvents. Under these conditions, the catalytic characteristics showed by the different enzyme

systems importantly differ from the ones observed in totally aqueous media (28,29). Gómez-Puyou and coworkers, utilizing the complex F_1 ATPase have found that as the water content of the system is increased, the enzyme acquires a progressive state that is required for catalysis and for undergoing rapid thermal denaturation (30).

The experiments reported here, together with our previous observations (7,8), suggest the possibility that cholesterol when interacting with the ATPase through its boundary lipid (31), might alter the amount of water associated with the enzyme in such a way that the intermolecular hydrogen bonding of the protein is altered, and therefore, the protein structure modified. Since there were no changes observed with the K_m for ATP when different membrane preparations containing different levels of cholesterol were assayed, it can be assumed that there are specific regions on the enzyme, like the low affinity site for ATP that is not affected by the inclusion of cholesterol to the membranes. Based on these experiments, although cholesterol most probably interacts directly with the ATPase, the occupancy of the active site apparently is not affected by the lipid. Therefore, the reversible modification caused by cholesterol that renders the ATPase resistant to thermal inactivation and its catalytic activity importantly impaired, might be carried out through a more general mechanism; probably related to the overall change in the structure of the ATPase. This possibility is consistent with the hypothesis that a restriction in the freedom of movement of the ATPase that might interfere with the development of the conformational changes observed during the catalytic cycle, would make the enzyme less susceptible to thermal inactivation. The results presented here are also consistent with the existence of a slow exchange of cholesterol between the tightly bound lipid surrounding the enzyme and the bulk lipid of the sarcolemma. Moreover, these observations support our original proposal that cardiac sarcolemma contains a critical concentration of cholesterol that normally modulates the ATPase through its boundary lipid. Current experiments in our laboratory employing the purified sarcolemmal (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase will help to elucidate the role of hydrogen bonding and water in the phenomena of protein thermostability in plasma membranes, apparently controlled by cholesterol.

Acknowledgements: We wish to thank Dr. Armando Gómez-Puyou for his advice and helpful discussion of the results. This study was supported in part by a Research Grant from CONACyT (PCEXCNA-050747). The secretarial assistance of Mrs. Ma. Elena Gutiérrez is gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. Neyses, L., Stimpel, M., Locker, R., Streuli, R., Küffer, B., and Vetter, W. (1984) *J. Hypertension* 2 (suppl 3), 489-492.
2. Klein, I., Moore, L., and Pastan, I. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 506, 42-53.
3. Rice, D.M., Meadows, M.D., Scheinman, A.O., Goñi, F.M., Gómez-Fernández, J.C., Moscarello, H.A., Chapman, D., and Olfiefield, E. (1979) *Biochemistry* 18, 5893-5903.
4. Chauhan, V.P.S., Ramsamy, L.S., and Brockerhoff, H. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 772, 239-243.
5. Abeywardena, M.Y., McMurchie, E.J. et al. (1984) *Biochem. Biophys. Acta* 776, 48-59.
6. Yeagle, P.L., Young, J., and Rice, D. (1988) *Biochemistry* 27, 6449-6452.
7. Ortega, A., and Mas-Oliva, J. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 773, 231-236
8. Ortega, A., and Mas-Oliva, J. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 868-874.
9. Yoda, S., and Yoda, A. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 103-109.
10. Yoda, S., and Yoda, A. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 1147-1152.
11. Sabine, J.R. (1983) *Bioscience Reports* 3, 337-344.
12. Cress, A.E., and Gerner, E.W. *Nature* 283, 677-679.
13. Cheng, K-H., Hui, S.W., and Lepock, J.R. (1987) *Cancer Res.* 47, 1255-1262
14. Mas-Oliva, J., and Nayler, W.G. (1980) *Brit. J. Pharmacol.* 70, 617-624.
15. Shinitzky, M. (1978) *FEBS Lett.* 85, 317-320.
16. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 246-254.
17. Fiske, C. H., and Subbarow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.* 66, 375-400.
18. Simon, S.A., McIntosh, T.J., and Latorre, R. (1982) *Science* 216, 65-68.
19. Boggs, J.M. (1980) *Can. J. Biochem.* 58, 755-770.
20. van Dijk, P.W.M. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 555, 89-101.
21. Demel, R.A., Jansen, J.W.C.M., van Dijk, P.W.M., and van Deenen, L.L.M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 465, 1-10.
22. van Dijk, P.W.M., de Kruijff, B., van Deenen, L.L.M., de Gier, J., and Demel, R.A. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 455, 576-587.
23. Eastop, T.N., Mountcastle, D.B., Barenholz, Y., Biltonen, R.L., and Thompson, T.E. (1979) *Biochemistry* 10, 2112-2117.
24. Zaks, A., and Klibanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 8017-8021.
25. Zaks, A., and Klibanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 3194-3201.
26. Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., and Darzon, A. (1986) *FEBS Lett.* 203, 41-43.
27. Robinson, J.D. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 994, 95-103.
28. de Meis, L. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* 973, 333-349.
29. Khmelitsky, Y.L., Hilhorst, R., and Veeger, C. (1988) *Eur. J. Biochem.* 176, 265-271.
30. Garza-Ramos, G., Darzon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., and Gómez-Puyou, A. (1989) *Biochemistry* 28, 3177-3182.
31. Lee, A.G. (1987) *J. Bioenerg. Biomemb.* 19, 581-603.