

Un nuevo sistema de modulación por calmodulina de la bomba de calcio del retículo sarcoplásmico cardiaco

Jaime Mas-Oliva

Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

(Recibido, diciembre 13, 1991; aceptado, marzo 16, 1992)

Resumen

En este estudio se propone un nuevo sistema de modulación directa de la bomba de calcio del retículo sarcoplásmico cardiaco por la calmodulina. En experimentos de cinética rápida, usando una fracción aislada de ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), molécula responsable del bombeo de calcio en el retículo sarcoplásmico, se demostró que la calmodulina es capaz de aumentar la velocidad del ciclo catalítico de esta enzima sin la intervención del sistema protein-quinasa/AMP cíclico. La importancia de este mecanismo accesorio se refleja en un aumento de la velocidad y un desarrollo más rápido en la captura de calcio por el retículo sarcoplásmico cardiaco. La alteración en este mecanismo de modulación podría llevar a la célula muscular cardiaca a una acumulación paulatina de calcio en el espacio miofibrilar con el consiguiente daño celular.

Palabras clave: Bomba de calcio Retículo sarcoplásmico cardiaco Calmodulina

Summary

This study proposes a new system of direct modulation, by calmodulin, of the calcium pump localized in the sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle. Fast kinetic experiments, using an isolated fraction of (Ca²⁺, Mg²⁺)-ATPase, responsible for calcium pumping in the sarcoplasmic reticulum, have demonstrated that calmodulin is able to increase the velocity of the catalytic cycle of the enzyme without intervention of the protein kinase/cyclic AMP system. The functional significance of this accessory mechanism, originally described in my laboratory, is most probably reflected in a rapid development and an increased velocity of calcium uptake by the cardiac sarcoplasmic reticulum. An alteration in this new modulating mechanism could predispose the cardiac muscle cell to a gradual accumulation of calcium in the myofibrillar space with the consequent cell damage.

Key words: Calcium pump Cardiac sarcoplasmic reticulum Calmodulin

Introducción

El ión calcio es ampliamente reconocido como uno de los reguladores más importantes del metabolismo intracelular en el reino animal. Se ha demostrado que cualquier estímulo que afecte la concentración intracelular libre de este ión puede dar lugar a un aumento en la actividad de muchos de los sistemas enzimáticos y procesos celulares especializados, como la contracción muscular, la motilidad celular y la secreción de tejidos endócrinos y exócrinos^{1,2}. Este catión tiene una función particularmente importante en la comunicación intracelular y se le considera como segundo mensajero en la mediación de respuestas a sustancias humerales.

En el músculo cardíaco adulto de mamífero, el retículo sarcoplásmico participa en la activación de la contracción. Se postula que, durante el proceso de excitación, el flujo de calcio transarcolemal es capaz de liberar calcio almacenado en el retículo sarcoplásmico y se considera que este proceso puede estar regulado por sistemas moduladores que utilizan fosfatos de inosítidos, específicamente IP³ (inositol 3 fosfato)³. Esta hipótesis ha sido investigada utilizando tanto membranas aisladas en forma vesiculada como preparaciones de músculo papilar, en las que se ha eliminado el sarcolema por diferentes métodos⁴. Los resultados de estos estudios indican la posibilidad de

que la liberación de calcio acumulado en el retículo sarcoplásmico inducida por calcio (intercambio $\text{Ca}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$) puede constituir un proceso fisiológico. También se ha demostrado que las vesículas aisladas del retículo sarcoplásmico son capaces de acumular suficiente calcio para permitir la relajación muscular⁵. Este mecanismo de bombeo del espacio citoplásmico al interior del retículo sarcoplásmico se lleva a cabo por la ATPasa dependiente de Mg^{2+} estimulada por Ca^{2+} ^{5,6}

Por otro lado, a lo largo de las últimas décadas, se han caracterizado un buen número de proteínas que unen calcio como receptores intracelulares para este catión. De estas proteínas, las mejor caracterizadas son la troponina C, aislada del músculo cardíaco y del músculo esquelético, la paralbúmina, la calsecustrina y la calmodulina, esta última también denominada regulador dependiente de calcio⁷. Parece que la calsecustrina interviene de manera exclusiva en la acumulación del calcio por los elementos del retículo sarcoplásmico de las células musculares. Con la excepción de la calmodulina, las proteínas restantes presentan una distribución tisular limitada y, aparentemente, se encuentran relacionadas con procesos tisulares muy específicos. En cambio, la calmodulina tiene diversas funciones y una distribución amplia en la mayoría de los tejidos eucariontes estudiados. Esta proteína ha sido aislada a partir de una gran variedad de tejidos y fuentes diferentes⁸, su concentración varía de tejido a tejido. El cerebro de mamíferos⁹, los testículos¹⁰ y el electroplax del *Electroforus electricus*¹¹ son fuentes particularmente ricas en calmodulina. Se le localiza predominantemente en la fracción soluble, aunque parte de ella puede estar asociada a fracciones membranales. La unión de calmodulina a diferentes fracciones particuladas parece estar relacionada con un requerimiento específico de calcio^{12,13}. Dentro de las características principales de esta unión se encuentra la saturabilidad, la reversibilidad y, a su vez, la sensibilidad a la temperatura y a la tripsina. Con el empleo de técnicas indirectas de inmunofluorescencia, utilizando células que se encuentran proliferando en cultivo de tejidos¹⁴, se ha observado que la molécula de calmodulina está distribuida en todo el citoplasma. Sin embargo, durante la mitosis, la mayor parte de esta proteína parece estar asociada con el aparato mitótico.

En contraste con otras proteínas que unen calcio, la molécula de calmodulina posee la propiedad de conferir una activación reversible a un buen número de enzimas. Su habilidad de servir como un regulador multifuncional dependiente de calcio, a través de interac-

ciones físicas con un grupo muy diverso de enzimas, puede ser considerado como única en el reino animal. Esta última propiedad es la que ha generado, en los últimos años, un gran interés por su estudio. Dentro de este contexto, utilizando vesículas de eritrocitos humanos, el hallazgo original de que la ATPasa ($\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$) y su transporte acoplado de calcio son estimulados por calmodulina ha sido comprobado por investigaciones subsecuentes realizadas en otros tipos celulares. Así, la ATPasa ($\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$) localizada en el sarcolema de la célula muscular cardíaca, a pesar de no ser estimulada en igual grado que la ATPasa localizada en las membranas de los eritrocitos, es considerada como una de las ATPasas modelo para el estudio de la estimulación ejercida por la calmodulina sobre este tipo de enzimas, conocidas como ATPasas tipo E1-E2. Estas dos enzimas, tanto de la membrana del eritrocito como de la membrana plasmática o sarcolema de la célula muscular cardíaca, se unen a columnas de afinidad de calmodulina, indicando una interacción directa de alta afinidad entre la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ y la molécula de calmodulina, lo cual se lleva a cabo solamente en presencia de calcio.

Por otro lado, se conoce que la ATPasa dependiente de calcio localizada en el retículo sarcoplásmico de la célula muscular cardíaca también responde a la presencia de calmodulina, a través de la asociación de calmodulina con la molécula conocida como fosfolambano. En este caso, la calmodulina regula directamente la fosforilación de esta molécula, la que a su vez modula la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico cardíaco. Este hecho, aunado a la imposibilidad de observar unión de la ATPasa dependiente de calcio de este retículo sarcoplásmico a las columnas de afinidad de calmodulina, ha contribuido a postular que la calmodulina no efectúa ninguna acción directa sobre la ATPasa de calcio localizada en estas membranas. Sin embargo, algunos autores sugieren un efecto directo de la calmodulina sobre la ATPasa de este sistema, sin que esta posibilidad haya sido comprobada experimentalmente^{15,19}. La relevancia fisiológica de esta propuesta fue recientemente revisada por Fabiato²⁰, quien observó que el efecto de la calmodulina en el desarrollo de tensión en fibras cardíacas desprovistas de su membrana plasmática es independiente de la preincubación con calcio, fenómeno que sugiere un efecto directo de la calmodulina sobre la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico.

Recientemente, describimos el comportamiento hidrolítico en el equilibrio de la ATPasa- $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$

del músculo cardiaco y el efecto de la calmodulina^{21,22}. Sin embargo, al momento de la realización de esos estudios fue difícil discernir si la ATPasa empleada correspondía a la ATPasa proveniente del sarcolema o del retículo sarcoplásmico. La dificultad básica consistió en encontrar una excelente estimulación por calmodulina de la actividad hidrolítica de la ATPasa microsomal, aunado al hecho de que esta fracción no se une a una columna estándar de calmodulina. Este último resultado, considerando las características de movilidad de la ATPasa en geles de poliacrilamida-SDS, sugirió la posibilidad de haber aislado a la ATPasa del retículo sarcoplásmico. Como parte de ese estudio, mediante mediciones en estado transitorio así como durante el equilibrio, se demostró que el efecto de la calmodulina es producido directamente sobre esta ATPasa del retículo sarcoplásmico, consistente en un recambio aumentado en los intermediarios fosforilados de la enzima²¹. En este trabajo, dicho fenómeno fue observado dentro de los primeros milisegundos posteriores a la adición del ATP, lo que señala la posibilidad de haber observado un efecto directo de la calmodulina sobre los intermediarios fosforilados de esta enzima, sin que otro tipo de proteínas accesorias pudieran haber mediado este fenómeno.

Materiales y métodos

Se obtuvieron vesículas microsomales mediante homogenización y centrifugación diferencial de fracciones crudas de corazones de conejo (New Zealand White), siguiendo el procedimiento descrito por Van Alstyne y cols²³. En la primera fase de esta investigación nos limitamos a recolectar una pequeña fracción de vesículas membranales ligeras, aisladas con dos sistemas de gradientes de sacarosa, las cuales ya han sido caracterizadas como membranas sarcolemales. Subsecuentemente, al estudiar la estimulación ejercida por la calmodulina en las diferentes fracciones, obtenidas a lo largo de la preparación, se observó que la ATPasa de calcio de una fracción pesada de membranas, que contenía vesículas de retículo sarcoplásmico, respondía a este estimulador. Con base en este hallazgo, se utilizó una suspensión de microsomas totales para la purificación de la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺) sensible a la calmodulina, sin proceder a la purificación final de los diferentes tipos de microsomas por medio de centrifugación en gradientes de sacarosa.

La ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), contenida en esta preparación de microsomas totales, se solubilizó en

Tritón X-100 y se purificó en cromatografía de DEAE-celulosa y cromatografía de afinidad Sepharosa-ATP²¹. La proteína total de las diferentes fracciones se midió mediante el método de Lowry²⁴. El análisis electroforético de las diferentes muestras proteicas disueltas en 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS) se llevó a cabo mediante el método de Weber y Osborn²⁵, utilizando geles de acrilamida al 7.5% con una corriente constante de 45 mA; o mediante geles de Laemmli²⁶ en gradientes de acrilamida de 7-17% corridos a 10 W constantes. Las bandas proteicas en los diferentes geles se tiñeron con azul de coomassie mediante el método de Fairbanks²⁷. Para visualizar la radiactividad de la proteína fosforilada se usó [³²P]ATP y la reacción enzimática llevada a cabo con ATP radiactivo en los diferentes medios fue terminada con concentraciones finales de ácido tricloracético al 10%. Las muestras se lavaron tres veces en un medio ácido mediante centrifugación y resuspensión de las pastillas para, finalmente, disolver las muestras en SDS, antes de someterlas a electroforesis en geles de poliacrilamida, utilizando el método de Weber y Osborn²⁵. Después de la electroforesis, los geles se colocaron en papel Whatman y se prensaron entre dos hojas de polietileno, sistema que fue conectado a una bomba de vacío. La radiactividad en los geles ya secos se detectó mediante la utilización de pantallas intensificadoras y película Kodak X-OMAT AR. La autorradiografía se llevó a cabo a -70°C.

La digestión de las vesículas del retículo sarcoplásmico de músculo esquelético, utilizadas como vesículas control, y de las vesículas del retículo sarcoplásmico cardiaco, se logró con α -quimotripsina y tripsina en presencia de MOPS 20.0 mM, pH 6.8, y KCl 80.0 mM. La digestión por α -quimotripsina se interrumpió por la adición de fenilmetilsulfonilfluoruro 1mM después de 30 min de incubación a 25°C. Las muestras obtenidas se centrifugaron a 18,000 rpm durante 30 min y las pastillas se disolvieron en SDS al 1%. La digestión con tripsina (0.005 mg/mg de ATPasa) se llevó a cabo a 25°C, a una serie de intervalos de tiempo (1, 5, 30 min); la reacción se detuvo mediante la adición de un inhibidor de tripsina. Más adelante, las muestras se centrifugaron a 18,000 rpm por 30 min y las pastillas obtenidas se disolvieron en SDS al 1%.

Los niveles de fosfoenzima se estimaron mediante la inhibición de la incorporación de ³²P, a partir de [³²P]ATP, a la proteína. Para este propósito, la enzima se incubó en las mezclas de reacción apropiadas y la reacción se detuvo al añadir ácido tricloracético al 10%,

PPi 10.0 mM y Pi 20.0 mM. Las diferentes mezclas, que contenían entre 60 y 70 μg de proteína, se pasaron a través de filtros Millipore de 0.45 μm y la proteína recolectada en los filtros se lavó ocho veces con 6 ml de una solución al 10% de ácido tricloroacético, PPi 10.0 mM y Pi 20.0 mM. Los filtros se colocaron en viales de centelleo, se secaron y disolvieron con 0.5 ml de dimetilformamida. La radiactividad se midió con un contador de centelleo después de añadir 5.0 ml de tritosol a las muestras.

Cuando se requirió la medición del fosfato radiactivo liberado durante la incubación de la enzima con ^{32}P -ATP, el primer filtrado resultante del procedimiento descrito anteriormente se sometió a una extracción de nucleótidos con carbón activado. El Pi se extrajo posteriormente como complejo fosfomolibdato en fase orgánica según el método descrito por Carvalho y col.²⁸. El fosfato radiactivo recolectado en la fase orgánica se midió mediante un contador de centelleo.

Resultados

a) Análisis electroforético. En la Fig. 1 se muestran los patrones electroforéticos en geles de fosfatos de las vesículas de retículo sarcoplásmico obtenidas del músculo esquelético y de la ATPasa purificada de los microsomas aislados de músculo cardíaco. Como se puede observar, las bandas proteicas de 106,000 Mr, correspondientes a la ATPasa de calcio sarcoplásmico cardíaco, purificadas por métodos diferentes²⁹, son prácticamente idénticas. Con respecto a los componentes menores, la preparación de ATPasa cardíaca no contiene a la proteína que une calcio ni calsecuestrina, pero retiene una proteína de alta movilidad. La misma figura muestra que ambas ATPasas, la proveniente de músculo esquelético y la de músculo cardíaco, al ser tratadas con tripsina, producen fragmentos similares con Mr parecidos; por otro lado, el fragmento F₁ y, especialmente, el fragmento F₂ de la ATPasa cardíaca se hidrolizan rápidamente por quimotripsina a fragmentos aún más pequeños.

Se obtiene un resultado similar cuando las dos preparaciones de ATPasa se separan en un sistema de geles de SDS de Laemmli²⁶, los cuales se corren a diferentes pHs, dando bandas más precisas para una determinación mucho más crítica del Mr, especialmente para proteínas de bajo peso molecular. Cabe subrayar que los dos fragmentos primarios no se separan bien utilizando el procedimiento de Laemmli²⁶. Sin embargo, la banda de ATPasa y los fragmentos primarios, ob-

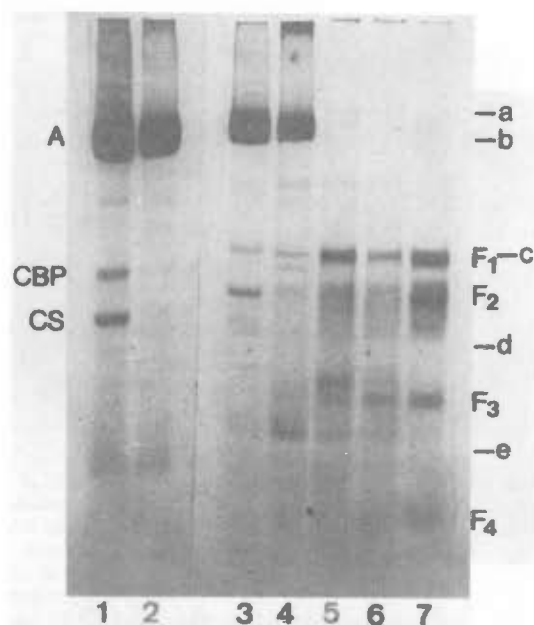


Fig. 1. Patrones electroforéticos obtenidos con el método de Weber y Osborn. Se muestran las vesículas de retículo sarcoplásmico obtenidas del músculo esquelético (1 y 3) y la ATPasa purificada de músculo cardíaco (2 y 4). También se muestran los patrones electroforéticos de las digestiones tripticas (tripsina: ATPasa=0.005) de músculo cardíaco (carriles 5 y 6; 5 y 30 min) y de músculo esquelético (carril 7; 30 min). Las condiciones experimentales se describen en la sección de métodos. Para facilitar el reconocimiento de las bandas, éstas están marcadas: ATPasa (A), proteína unidora de calcio (CBP), calsecuestrina (CS) y los fragmentos iniciales (F₁ y F₂) de la digestión triptica. F₃ y F₄ son fragmentos derivados de la digestión posterior del fragmento F₁. Estándares de peso molecular: a = β -galactosidasa (116 K); b = fosforilasa-B (97 K); c = albúmina bovina (66 K); d = albúmina de huevo (45 K); e = anhidrasa carbónica (29 K). Las preparaciones enzimáticas y las separaciones electroforéticas mostradas en las columnas 1-2 y 3-7 fueron obtenidas a tiempos diferentes y los estándares de peso molecular relacionados únicamente a las columnas 3-7.

tenidos por el tratamiento de esa proteína con tripsina o quimotripsina en los dos sistemas de ATPasa, parecen tener un Mr idéntico (Fig. 2). La digestión subsecuente, especialmente con quimotripsina, produce patrones diferentes en los péptidos más pequeños en ambos tipos de ATPasa. Esto indica que, aparentemente, la enzima purificada de las membranas cardíacas es una ATPasa proveniente del retículo sarcoplásmico cuyo Mr y propiedades estructurales son similares a aquéllas de la ATPasa del retículo sarcoplásmico obtenido del músculo esquelético. Sin embargo, esta homología puede ser solamente parcial, ya que la secuencia primaria y el ordenamiento detallado de las dos proteínas puede no ser estrictamente idéntico. De hecho, se conoce que la reactividad inmunológica cruzada entre las ATPasas provenientes del músculo cardíaco y del músculo esquelético no es directa³⁰.

b) Experimentos de cinética con la enzima aislada.

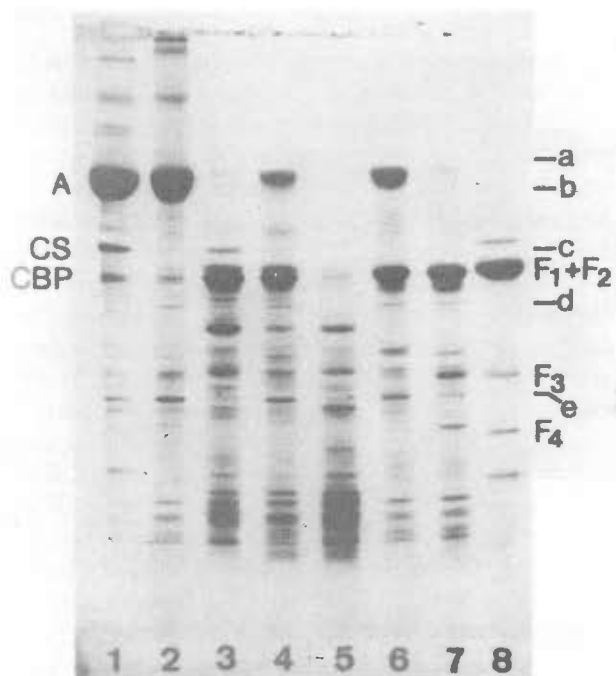


Fig. 2. Patrón electroforético obtenido con el método de Laemmli. Vesículas de retículo sarcoplásmico obtenidas de músculo esquelético (1), ATPasa purificada de músculo cardíaco (2), y fragmentos derivados de la digestión de la ATPasa de músculo esquelético (3 y 8) y de músculo cardíaco (4, 5, 6 y 7). Tratamiento con quimotripsina (3, 4 y 5) y con tripsina (6, 7 y 8). Los detalles técnicos están descritos en la sección de métodos. Las bandas y los estándares de peso molecular (a-e) están marcados igual que en la Fig. 1. La digestión con quimotripsina se llevó a cabo por 30 min a una relación de quimotripsina-ATPasa = 0.1 (3 y 5) y 0.01 (4). La digestión con tripsina se llevó a cabo por 1 min (6) o por 30 min (7 y 8) a una relación de tripsina-ATPasa = 0.005.

Como se mostró con anterioridad para la ATPasa del retículo sarcoplásmico proveniente del músculo esquelético^{31,32} y para la ATPasa microsomal del músculo cardíaco³³, la resolución cinética de la fosforilación de la enzima por ATP se obtiene utilizando concentraciones no saturantes de ATP. Un ejemplo de esta resolución se presenta en la Fig. 3 que muestra que la reacción de fosforilación se lleva a cabo en presencia de ATP 5.0 μM con cinéticas idénticas, independientemente de si la enzima es preincubada en presencia o en ausencia de calmodulina. Con concentraciones más altas de ATP, la reacción de fosforilación es demasiado rápida y sobrepasa la capacidad resolutoria de los métodos rápidos de apagamiento o finalización de la reacción. La extrapolación de las constantes aparentes de velocidad, observadas al incrementar las concentraciones de ATP en un rango bajo, produce una constante de velocidad de aproximadamente 200 seg⁻¹ para la ATPasa aislada del músculo cardíaco. Para los niveles máximos de fosfoenzima que normalmente se obtienen, se han encontrado, generalmente, valores menores a los esperados, tomando en cuenta la estequiometría de la

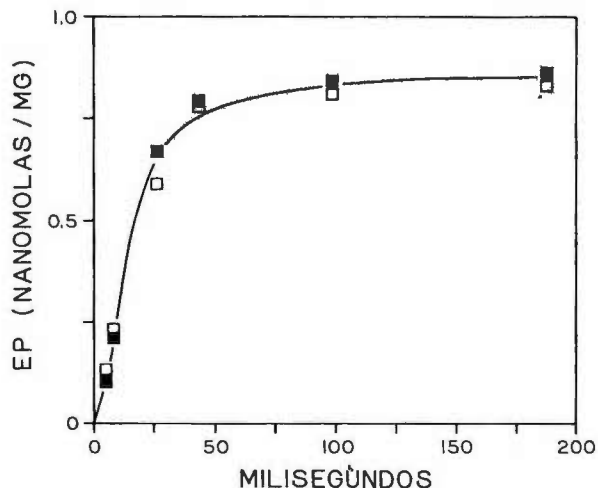


Fig. 3. Fosforilación con ATP de la ATPasa aislada del retículo sarcoplásmico cardíaco. Medio de reacción A: ATPasa purificada (0.168 mg proteína/ml), tris-maleato, pH 7.0, 20 mM; KCL 80 mM; MgCl₂ 10 mM y CaCl₂ 100 μM. Esta solución fue mezclada con un volumen igual del medio B, el cual contiene los mismos componentes con excepción de 10 μM [³²P]ATP en lugar de la ATPasa. La concentración final de ATP en la mezcla de reacción (A + B) fue de 5 μM. La reacción fue apagada con ácido a los intervalos de tiempo indicados y la fosfoenzima medida como se describe en la sección de métodos. La ATPasa (medio A) fue preincubada por dos horas en hielo en ausencia (□) o en presencia (■) de calmodulina (10 μg/ml), ya que se encontró que un mínimo de 30 min de preincubación en hielo con calmodulina (en ausencia de ATP) es necesaria para una completa activación de la enzima por calmodulina. La reacción de ATPasa se llevó a cabo a 25°C. Las mezclas rápidas fueron realizadas con un aparato de mezcla rápida Froehlich-Buerger utilizando tres jeringas y dos mezcladores.

enzima con un peso molecular de 100,000. Esto podría indicar un cierto grado de desnaturalización de la proteína como consecuencia de la solubilización con detergentes, como ya se ha observado en otras preparaciones de este tipo, incluyendo al retículo sarcoplásmico de músculo esquelético³⁴.

Con la finalidad de demostrar que la fosfoenzima es en realidad un intermediario y para investigar el posible efecto de la calmodulina, se llevaron a cabo experimentos de mezcla rápida, en donde la enzima se incubó en presencia y en ausencia de calmodulina. Bajo estas condiciones se utilizó una concentración final de ATP de 200 μM y la reacción fue apagada a intervalos de milisegundos. A esta concentración de ATP, la fosforilación de la enzima es muy rápida y los niveles máximos de fosfoenzima se alcanzan en aproximadamente 20 milisegundos. Sin embargo, como se observa en la Fig. 4, la producción de Pi empieza después de que la fosfoenzima se forma; de hecho, la fosfoenzima aparentemente corresponde a un intermediario

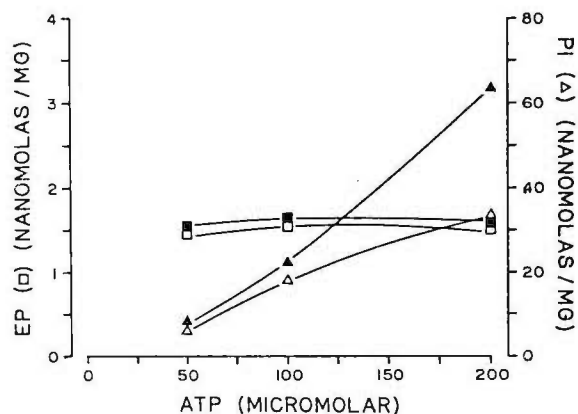


Fig. 4. Producción de fosfoenzima y liberación de Pi en equilibrio. La reacción se inició con la adición de [γ - 32 P]ATP al medio de incubación que contiene: ATPasa purificada de retículo sarcoplásmico (0.3 mg/ml), tris-maleato, pH 7.0, 20 mM; KCl 80 mM; MgCl₂ 10 mM; CaCl₂ 100 μ M. La reacción se apagó con ácido después de 5 seg de incubación a 25°C. EP (□, ■) y Pi (Δ, ▲) fueron medidos como se describe en la sección de métodos. La enzima fue preincubada por dos horas en hielo en ausencia (Δ, □) o en presencia (▲, ■) de calmodulina (10 μ g/100 μ g de enzima).

cinéticamente competente. Por otro lado, se encuentra que el paso limitante en la velocidad de la enzima corresponde a la formación de la fosfoenzima. En presencia de ATP 0.2 mM, se puede observar una pequeña

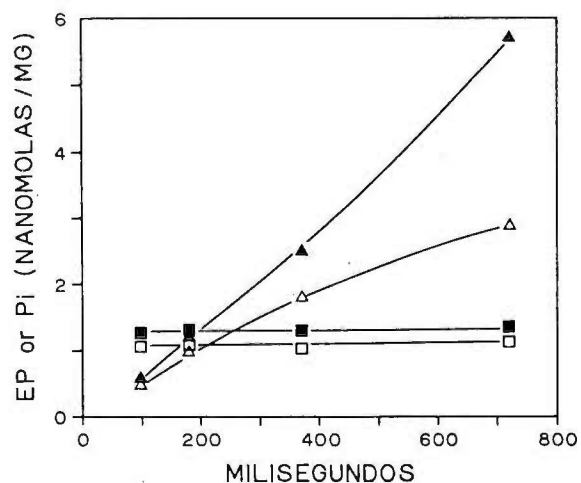


Fig. 5. Formación de fosfoenzima (□, ■) y de Pi (Δ, ▲) después de la adición de ATP a la ATPasa del retículo sarcoplásmico cardíaco. El medio A, que contiene ATPasa purificada (0.7 mg/ml); tris-maleato, pH 7.0, 20 mM; KCl 80 mM; MgCl₂ 10 mM; CaCl₂ 100 μ M, fue mezclado con un volumen igual del medio B, que contiene los mismos componentes con excepción de [γ - 32 P]ATP (0.4 mM) en lugar de ATPasa. La concentración final de ATP en el medio de reacción (A+B) fue de 0.2 mM. La reacción fue apagada con ácido a los tiempos indicados. La enzima (medio A) fue preincubada por 2 horas en ausencia (□, Δ) o en presencia (■, ▲) de calmodulina. La reacción de ATPasa fue llevada a cabo a 25°C. Las mezclas rápidas fueron realizadas con un aparato mezclador Dionex.

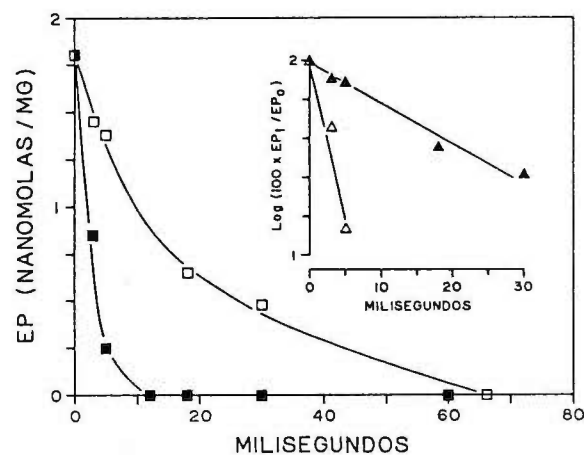


Fig. 6. Decaimiento de la 32 P-fosfoenzima por la adición de ATP no radiactivo. Después de una incubación durante 98 milisegundos, el medio de reacción (A+B, descritos en las figuras anteriores) fue mezclado con medio C, que contiene los mismos componentes del medio B, excepto ATP no radiactivo (40 mM) en lugar de [γ - 32 P]ATP. La reacción fue apagada con ácido a los tiempos indicados. La mezcla rápida de los medios se realizó con un aparato de mezcla rápida Froehlich-Buerger utilizando cuatro jeringas y la configuración de tres mezcladores. Las concentraciones finales en la mezcla de reacción (A+B+C) fueron 1.66 mM para el no radiactivo y 6.6 μ M para el radiactivo. La ATPasa (medio A) fue preincubada por dos horas en hielo en ausencia (□) o en presencia (■) de calmodulina (16 μ g/ml). La reacción de ATPasa se llevó a cabo a 25°C. Los puntos cero fueron obtenidos por apagamiento ácido de A + B antes de adicionar el medio C. Inserto: en ausencia (▲) o en presencia (Δ) de calmodulina (16 μ g/ml).

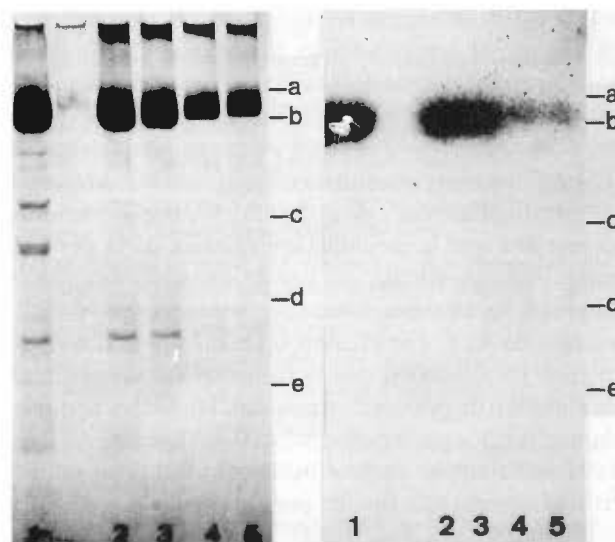


Fig. 7. Ejemplo de la identificación autorradiográfica de la proteína marcada con 32 P. Las muestras de ATPasa provenientes del músculo esquelético (1) y cardíaco (2, 3, 4 y 5) fueron fosforiladas con [γ - 32 P]ATP; tris maleato, pH 7.0, 20 mM; KCl 80 mM; MgCl₂ 10mM y CaCl₂ 100 μ M, en ausencia (1,2,4) y en presencia (3y5) de calmodulina. La reacción se llevó a cabo por 1 ó 10 seg en hielo. La electroforesis y la autorradiografía se desarrollaron como se describe en la sección de métodos. Los gels 1, 2 y 3 se obtuvieron con 25 μ g de proteína, los gels 4 y 5 con 10 μ g de proteína. La tinción con azul de coomassie (A) y la autorradiografía (B) son directamente comparables. Los estándares de peso molecular (M_r) (a-e) se distribuyen al igual que en la Fig. 1.

estimulación en la producción de Pi secundaria a la preincubación con calmodulina (Figs. 4 y 5), pero con variación considerable de experimento a experimento.

Los efectos máximos de la calmodulina sobre esta enzima parecen obtenerse solamente en presencia de concentraciones milimolares de ATP²¹. Sin embargo, a estas concentraciones altas de ATP, se observa una fuerte interferencia en las mediciones finas de la producción de Pi al utilizar experimentos de cinética rápida. Esto se atribuye al alto contenido basal de radiactividad del ATP y a las pequeñas cantidades de Pi producido a intervalos de milisegundos. Para poder observar los efectos máximos de la calmodulina sobre la actividad enzimática en condiciones de equilibrio, se diseñó una serie final de experimentos, incluyendo tres eventos de mezcla rápida: 1) adición de una concentración baja de [γ -³²P] ATP a la enzima preincubada en presencia o ausencia de calmodulina, con la finalidad de tener niveles de fosfoenzima en equilibrio; 2) después de la adición de [γ -³²P]ATP, inducción de ATP no radiactivo a altas concentraciones, con la finalidad de seguir al ATP marcado y producir fosfoenzima no radiactivo; y 3) terminación de la reacción con ácido a intervalos de tiempo de milisegundos, con la finalidad de observar el decaimiento de la fosfoenzima radiactiva en función del tiempo y, por lo tanto, determinar directamente su recambio. Como se muestra en la Fig. 6, el intermediario fosforilado declina más rápidamente cuando la enzima se preincuba con calmodulina. El tiempo de recambio del compuesto intermediario fosforilado control es aproximadamente de 150 seg⁻¹ en comparación con 40 seg⁻¹ cuando la enzima se preincuba con calmodulina. Este experimento demuestra que la estimulación máxima dada por calmodulina, observada en condiciones de equilibrio, también se observa inmediatamente después de la adición de ATP. Por lo tanto, no existen períodos intermedios relacionados con la fosforilación dependiente de cinasas o de proteínas accesorias. De hecho, se puede demostrar por autorradiografía (Fig. 7) que la ATPasa es la única banda electroforética asociada con radiactividad cuando este tipo de preparaciones se someten a fosforilación por [γ -³²P]ATP a concentraciones que varían entre 100.0 μ M y 1.5 μ M por períodos de tiempo menores a 1 segundo. En experimentos paralelos, donde la incubación con ATP se terminó con lantano a pH neutro, con la finalidad de preservar las fosfoproteínas sensibles al ácido, los geles muestran radiactividad asociada exclusivamente a las bandas de la ATPasa.

Discusión

La diferencia de sensibilidad observada entre la

ATPasa aislada del retículo sarcoplásmico cardíaco y la ATPasa aislada del retículo sarcoplásmico esquelético resulta particularmente interesante. Esta diferencia no puede ser atribuida a alteraciones producidas durante el procedimiento de purificación, ya que la ATPasa aislada del retículo sarcoplásmico esquelético no es sensible a la calmodulina (ya sea en su forma membranal o purificada) y, en cambio, la ATPasa del retículo sarcoplásmico cardíaco sí lo es. La estimulación por calmodulina de la ATPasa del retículo sarcoplásmico cardíaco ya fue descrita^{15,19} y se le ha relacionado directamente con la fosforilación de proteínas accesorias asociadas con la enzima. Estas proteínas accesorias se encuentran presentes, principalmente, en preparaciones membranales del retículo sarcoplásmico^{35,38}. Los resultados que aquí se describen son consistentes con la ausencia de actividad de protein-cinasas y de fosforilación de otras proteínas fuera de la observada para la ATPasa-(Ca²⁺, Mg²⁺), tanto en condiciones de preservación en ácido de la fosfoproteína como de la no estable. Por lo tanto, la activación por calmodulina de la enzima purificada observada en nuestros experimentos parece estar relacionada a un efecto directo de la calmodulina sobre la ATPasa del retículo sarcoplásmico.

Los resultados de este estudio (Figs. 5 y 6) también demuestran que la estimulación generada por calmodulina está presente durante el primer ciclo de la enzima y que no requiere de un período de retraso relacionado con la fosforilación de otras proteínas por ATP. Esta observación es consistente con un efecto directo de la calmodulina sobre la ATPasa. La relevancia fisiológica de este efecto directo está reforzada por estudios recientes en los que se utilizaron fibras cardíacas desnudas²⁰, encontrándose que el efecto de la calmodulina es independiente de la preincubación con calcio, condición que es absolutamente indispensable para activar al sistema de las protein-cinasas. Los experimentos de cinética rápida indican que el efecto de la calmodulina sobre el retículo sarcoplásmico cardíaco puede ser caracterizado cinéticamente como un aumento en el recambio de los intermediarios fosforilados en el ciclo catalítico de la ATPasa. Este tipo de efecto cinético, estudiado en equilibrio, fue sugerido previamente por nuestro grupo²¹. Por otro lado, se sabe que cuando se realizan experimentos similares con preparaciones membranales completas, en lugar de utilizar enzimas purificadas, el ATP puede fosforilar componentes protéicos, fuera de la ATPasa^{15,18,19}. Esta fosforilación de proteínas accesorias, la cual es catalizada por protein-cinasas estimuladas por calmodulina, puede constituir un mecanismo para la

estimulación indirecta de la ATPasa del retículo sarcoplásmico cardiaco, además del efecto directo observado en este trabajo.

El significado funcional de un mecanismo accesorio de control de la bomba de calcio del retículo sarcoplásmico por acción directa de la calmodulina, aunado al sistema de protein-cinasas-AMP cíclico, muy probablemente está reflejado en el desarrollo y mantenimiento de una velocidad aumentada de captura de calcio por el retículo sarcoplásmico, lo que aceleraría la relajación del músculo y reduciría el período sistólico del corazón. Este fenómeno de retención óptima del ión

calcio en el retículo sarcoplásmico, al estar la bomba de calcio permanentemente en presencia de calmodulina, aseguraría el óptimo acoplamiento entre contracción y relajación. Una alteración en este mecanismo de regulación podría llevar a la célula muscular cardiaca a un incremento paulatino de calcio en el espacio miofibrilar con el consiguiente daño celular.

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM. Agradezco a la Sra. Ma. Elena Gutiérrez su invaluable apoyo secretarial.

Referencias

- Rasmussen H, Goodman DBP, Tenenhouse A. Modulation of cell function. *CRC Crit Rev Biochem* 1972;1:95-102.
- Berridge MJ. Intracellular calcium homeostasis. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1975;6:1-26.
- Katz AM. *Physiology of the Heart*. New York: Raven Press, 1980.
- Fabiato A, Fabiato F. IP_3 regulates calcium release from the sarcoplasmic reticulum papillary muscle. *Ann NY Acad Sci* 1978;307:491-522.
- Solari RJ, Wise RM, Shiner JS, Briggs FM. Sarcoplasmic reticulum calcium transport directly associated to muscle relaxation. *Circ Res* 1974;34:525-30.
- MacLennan DH, Klip A. En: *Membrane Transduction Mechanisms*, Cone RA, Dowling JE, eds. New York: Raven Press, 1979:61-75.
- Brostrom CO, Wolff DJ. Properties and function of calmodulin. *Biochem Pharmacol* 1981;30:1395-405.
- Waisman D, Stevens FC, Wang JH. Isolation of calmodulin from various sources. *Biochem Biophys Res Commun* 1975;65:975-82.
- Watterson DM, Harrelson WG, Keller PM, Sharief F, Vanaman TC. Structural similarities between the Ca^{2+} -dependent regulatory proteins of 3'5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase and actomyosin ATPase. *J Biol Chem* 1976;251:4501-13.
- Dedman JR, Potter JD, Jackson RL, Johnson JD, Means AR. Physicochemical properties of rat testis Ca^{2+} -dependent regulator protein of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem* 1977;252:8415-22.
- Childers SR, Siegel FL. Calmodulin in electrophorus electricus. *Biochem Biophys Acta* 1975;405:99-116.
- Cox JA. Sequential events in calmodulin on binding with calcium and interaction with target enzymes. *Fed Proc* 1984;43:3000-04.
- Mas-Oliva J. Calmodulina como reguladora de múltiples funciones celulares moduladas por calcio. *Bol Educ Bioquím* 1986;5:43-9.
- Welsh MJ, Dedman JR, Brinkley BR, Means AR. Calmodulin distribution in proliferating cells. *Proc Nat Acad Sci USA* 1978;75:1867-71.
- Le Peuch CJ, Heiech J, Demaille JG. Calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium-calmodulin-dependent and calcium-calmodulin -dependet phosphorylations. *Biochemistry* 1979;18:5150-57.
- Lopashuk G, Richter B, Katz S. Characterizations of calmodulin effects on calcium transport in cardiac microsomes enriched in sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* 1980;19:5603-07.
- Bilezikjan LM, Kranias EG, Potter JD, Schwartz A. Studies on phosphorylation of canine sarcoplasmic reticulum by calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res* 1981;49:1556-62.
- Kirchberger MA, Antonetz T. Calmodulin-mediated regulation of calcium transport and (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -activated ATPase activity in isolated cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1982;257:5685-91.
- Plank B, Wyskovsky W, Hellman G, Suko J. Calmodulin-dependent elevation of calcium transport associated with calmodulin-dependent phosphorylation in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochim Biophys* 1983;732:99-109.
- Fabiato A. Rapid ionic modifications during the aequorin-detected calcium transient in a skinned canine cardiac Purkinje cell. *J Gen Physiol* 1985;85:189-246.
- Mas-Oliva J, de Meis L, Inesi G. Calmodulin stimulates both adenosine 5'-Triphosphate hydrolysis and synthesis catalyzed by a cardiac calcium ion dependent adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* 1983;22:5822-25.
- Mas-Oliva J, Varela ME. Independent conformational changes caused by calmodulin and calcium in the cardiac microsomal (Ca^{2+}, Mg^{2+}) -ATPase during its ATP hydrolysis-ATP synthesis cycle. *J Mol Cellular Cardiol* 1987;19:39-46.
- Van Altsteyne E, Burch RM, Knichelbein RG, Hungerford RT, Gower EJ, Webb JG, Pe SL, Lindenmeyer GE. Isolation of sealed vesicles highly enriched with sarcolemma markers from canine ventricle. *Biochemistry* 1980;602:131-43.
- Lowry OH, Rosebrough NY, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- Weber K, Osborn M. The reability of molecular weight determinations of dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1969;244:4406-12.
- Laemmli VK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 1970;227:680-85.
- Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1971;1:2606-16.
- Carvalho MGC, Souza DG, de Meis L. On a possible mechanism of energy conservation in sarcoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 1976;251:3629-36.
- Chamberlain KB, Levitsky DO, Fleischer S. Isolation and characterization of canine cardiac sarcoplasmic reticulum with improved Ca^{2+} transport properties. *J Biol Chem* 1983;6602-09.
- Chiesi M, Gasser J, Carafoli E. Properties of the Ca-pumping

Calmodulina y bomba de calcio

- ATPase of sarcoplasmic reticulum from vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Comm* 1984;124:797-806.
31. Froehlich J, Taylor E. Transient state kinetics studies of sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 1975;250:2013-21.
 32. Verjovski-Almeida S, Kurzmack M, Inesi G. Fast-kinetic evidence for an activating effect of ATP on the Ca^{2+} -transport of sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochemistry* 1978;17:5006-13.
 33. Sumida M, Wang T, Mendel F, Froehlich JP, Schwartz A. Transient kinetics of Ca^{2+} transport of sarcoplasmic reticulum. A comparison of cardiac and skeletal muscle. *J Biol Chem* 1978;253:8772-77.
 34. Barrabin H, Scofano HM, Inesi G. Adenosin-triphosphatase site stoichiometry in sarcoplasmic reticulum vesicles and purified enzyme. *Biochemistry* 1984;23:1542-8.
 35. Jones LR, Besch HR, Fleming MM, McConnanghey MM, Watanabe AM. Separation of vesicles of cardiac sarcolemma from vesicles of cardiac sarcoplasmic reticulum. Comparative biochemical analysis of component activities. *J Biol Chem* 1979;254:530-9.
 36. Jones LR, Maddock SW, Besch HR. Unmasking effect of alamethicin on the $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase, β -Adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase, and cAMP-dependent protein kinase activities of cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem* 1980;255:9971-80.
 37. St. Louis Pj, Sulhake PV. Phosphorylation of cardiac sarcolemma by endogenous and exogenous protein kinases. *Arch Biochem Biophys* 1979;198:227-40.
 38. Lamers JMJ, Stinis HT, DeJonge HR. On the role of cyclic AMP and Ca^{2+} -calmodulin dependent phosphorylation in the control of $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ -ATPase of cardiac sarcolemma. *FEBS Letters* 1981;127:139-43.