

ESTANDARIZACION DE UN ENSAYO DE ACTIVIDAD PARA LA ATPasa DE CALCIO DEL ERITROCITO

Claudia P. Tinjacá y Moisés Wasserman*.

*Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química, A.A. 14490, Santafé de Bogotá, Colombia.

Keywords: Calcium ATPase, Calcium, Calmodulin, *Plasmodium falciparum*.

RESUMEN

Se describe la estandarización de un ensayo de actividad para la ATPasa de calcio del eritrocito. De acuerdo con el ensayo, la actividad máxima de la enzima corresponde a 3.79 micromoles de fosfato por miligramo de proteína de membrana por hora y la actividad basal representa aproximadamente el 10% de la actividad máxima. El comportamiento de la curva de actividad contra el tiempo es lineal durante los primeros 30 minutos y se presenta una alta correlación entre aumento en la actividad de la enzima y concentración de Calmodulina. Gracias al ensayo es posible cuantificar Calmodulina en concentraciones menores a 1 μ M.

ABSTRACT

We describe here the standarization of an assay for the quantification of the erythrocyte Ca^{2+} ATPase. The maximal recorded activity of the enzyme was 3.79 micromoles of phosphate per milligram of membrane protein per hour. The resting activity was 10% of the former. The enzyme activity was constant during the first 30 minutes. Calmodulin activated the enzyme as reported, and there was a high correlation between the increase of the activity and the concentration of Calmodulin. This behaviour enables us to quantify Calmodulin in concentrations lower than 1 μ M.

Abreviaturas: Calmodulina, CaM; Acido Etilendiamino tetracético, EDTA; Acido bis-(β -aminoetil eter) N,N,N',N'-tetracético, EGTA; Adenosin trifosfato, ATP.

INTRODUCCION

La calmodulina acopla la concentración de Ca^{2+} libre intracelular a la actividad regulada de una ATPasa responsable de bombear Ca^{2+} al medio exterior (1,2,3). Se puede decir que la K_m de la Calmodulina por el Ca^{2+} determina el nivel de Ca^{2+} basal libre, que debe ser mantenido por la célula en condiciones normales.

En los eritrocitos, en la ausencia de Calmodulina y presencia de Ca^{2+} en un amplio rango de concentraciones ($0.7\text{-}300\mu\text{M Ca}^{2+}$), se puede detectar tanto el transporte de Ca^{2+} como la actividad de la ATPasa de calcio y magnesio. La enzima presenta un comportamiento bifásico en su activación, que se relaciona con dos estados de diferente afinidad por el calcio (4,5,6,7). El principal efecto de la Calmodulina es incrementar la proporción relativa del estado de mayor afinidad de la enzima por el Ca^{2+} (aumentando la V_{max}) y amplificar el efecto inhibitorio del Ca^{2+} (8). Al parecer la concentración de Mg^{2+} funciona como regulador adicional de la activación e inhibición de la ATPasa.

Los valores de actividad máxima de la ATPasa de calcio en presencia de CaM han sido determinados en diferentes condiciones experimentales. Se reportó entre 1.5 y 3 milimoles de fosfato por gramo de proteína de membrana por hora en el caso de los fantasmas de eritrocitos (9,10), entre 0.9 y 8.9 milimoles de fosfato por gramo de proteína por hora en el caso de la enzima pura reconstituida (11) y aproximadamente 3 milimoles por gramo por hora en el caso de los eritrocitos intactos (12).

Se ha observado que la actividad en ausencia de CaM representa valores entre el 0.1 (13) y el 23% (9) de la actividad máxima, dependiendo de las condiciones experimentales.

El objetivo de éste trabajo es la estandarización de las condiciones de actividad de la ATPasa de calcio de membranas de eritrocito, con miras a la cuantificación y caracterización funcional de la Calmodulina parcialmente purificada de *Plasmodium falciparum* (14).

MATERIALES Y METODOS

Preparación de fantasmas de eritrocito

Inicialmente se realizaron ensayos con eritrocitos permeabilizados con saponina al 0.04% de acuerdo con Petrunyaka y col. (13). Finalmente, se trabajó con fantasmas de eritrocitos. Estos se obtuvieron como sigue: se

eliminaron los glóbulos blancos por medio de sucesivos lavados con Hepes isotónico pH 7.4, retirando cada vez la cubierta blanca de la superficie por succión con pipeta Pasteur. Se produjo la lisis de los eritrocitos por choque hipotónico con 8 volúmenes de Tris. HCl 10 mM, EDTA 1mM pH 7.4 y posteriormente se realizaron 5 lavados con el mismo buffer y tres eliminando el EDTA, centrifugando cada vez a 21.000g durante 20 minutos a 4°C. Las membranas resultantes se resuspendieron en proporción 1:4 en el último buffer a una concentración determinada por el método de Bradford (15), de 3mg de proteína de membrana por mililitro de suspensión. Se congelaron alcuotas de 62.5 (187.5µg) y 125µL (375µg), a -70°C, para los ensayos de actividad de ATPasa de Calcio.

Ensayo de actividad de la ATPasa de Calcio

Las condiciones estandarizadas para el ensayo de actividad de la ATPasa fueron :

1. Incubación en un volumen total de 125µL a 4°C, durante 15 minutos, de 62.5µL de suspensión de membranas y de CaM a concentración pre-establecida en un volumen máximo de 50µL, en buffer Tris.HCl 20mM, MgCl₂ 0.37mM y KCl 130mM pH 7.4.
2. Adición de 125µL de solución de Tris.HCl 20mM pH 7.4, KCl 130mM, MgCl₂ 8.36mM, Citrato 10mM, ATP 1mM, Ouabaína 1mM, EGTA 1mM, CaCl₂ 1.17mM.
3. Toma de muestra a tiempo cero y luego de 30 minutos.
4. Determinación de fosfato inorgánico liberado por la hidrólisis del ATP con Verde de Malaquita / Molibdato de Amonio, inicialmente de acuerdo con Muzbec y col.(16), posteriormente según modificación de Lanzeta y col (17), buscando mejorar la resolución entre 1 y 5 nanomoles de fosfato.
5. Realización de curva patrón de fosfato liberado contra el logaritmo de la concentración de Calmodulina, empleando como patrones Calmodulina de testículo bovino y Calmodulina de eritrocito.

Gracias a este ensayo se pudo determinar por interpolación en la curva patrón de nanomoles de fosfato liberados en 30 minutos contra concentración de CaM, la concentración y el estado funcional de Calmodulina de *Plasmodium falciparum*, purificada por solubilización diferencial y cromatografía de intercambio iónico en DEAE Sefarosa CL6B (fracción II(150)) y por cromatografía de interacción hidrofóbica con Fenil Superosa (fracción PS(41)) aplicada a la fracción anterior, de acuerdo con Tinjacá y

Wasserman (14). En todos los casos se emplearon 50 μ L de muestra para el ensayo de actividad.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizaron pruebas tendientes a la estandarización de las condiciones óptimas de reacción que incluyeron:

1. Determinación de una concentración de proteína de membrana del eritrocito adecuada de acuerdo con la sensibilidad del sistema de detección de fosfato, empleando verde de malaquita y molibdato de amonio (16,17).

Trabajando con eritrocitos permeabilizados con saponina al 0.04%, resuspendidos en solución de reacción en presencia de KCl 130mM, MgCl₂ 0.37mM, ATP 2.85mM y CaCl₂ 10 μ M, a concentraciones de membrana del 0.5%, 2.5% y 5%, en presencia de los reguladores endógenos de la enzima (ver figura 1), se observó un mayor rendimiento en presencia de membranas resuspendidas al 5% (0.75 μ g de proteína de membrana / μ l de solución de reacción), presentándose una hidrólisis de ATP seis veces mayor que la que se determinó a la mínima concentración empleada.

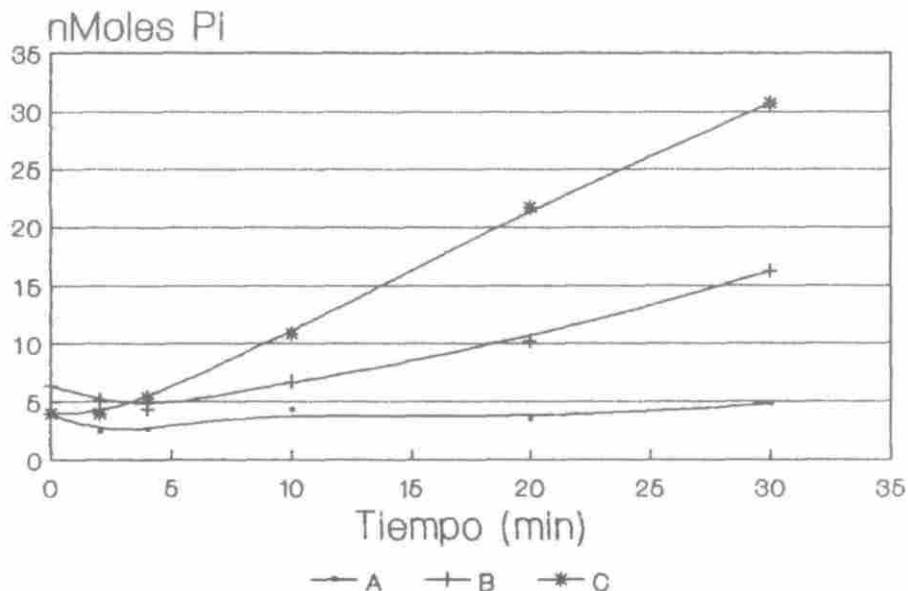


Figura 1: Determinación de la concentración óptima de membranas de eritrocito para la detección de fosfato hidrolisado durante la activación de la ATPasa de calcio de acuerdo con la sensibilidad del método del Verde de Malaquita. Ensayos en presencia de reguladores endógenos: A Membranas al 0.5%, B Membranas al 2.5% y C membranas al 5%.

El ATP hidrolisado en 30 minutos fue el 46.7% del ATP total agregado, presentándose una velocidad de hidrólisis de 1.77 micromoles de fosfato por miligramo de proteína en 30 minutos. Se escogió la concentración del 5% de membranas para los ensayos posteriores.

2. Observación del efecto de la concentración de calcio sobre las membranas al 5%, en presencia de los reguladores endógenos del eritrocito.

Se presentó una mayor producción de fosfato cuando se adicionó CaCl_2 a concentraciones entre 5 y $10\mu\text{M}$ a la solución de reacción (figura 2), encontrándose una producción 16 y 17 veces mayor, con respecto a la actividad en ausencia de calcio. Se observó linealidad en el comportamiento de la reacción hasta los 30 minutos y la máxima actividad observada a los 30 minutos fue de 2.78 a 2.9 micromoles de fosfato por miligramo de proteína. Esta actividad se consideró como actividad dependiente de Calmodulina, teniendo en cuenta que la Calmodulina endógena no se eliminó.

3. Eliminación de la Calmodulina endógena

Se hicieron ensayos para obtener membranas libres de Calmodulina, mediante lavados con EGTA en presencia de KCl y MgCl_2 . Se modificó la

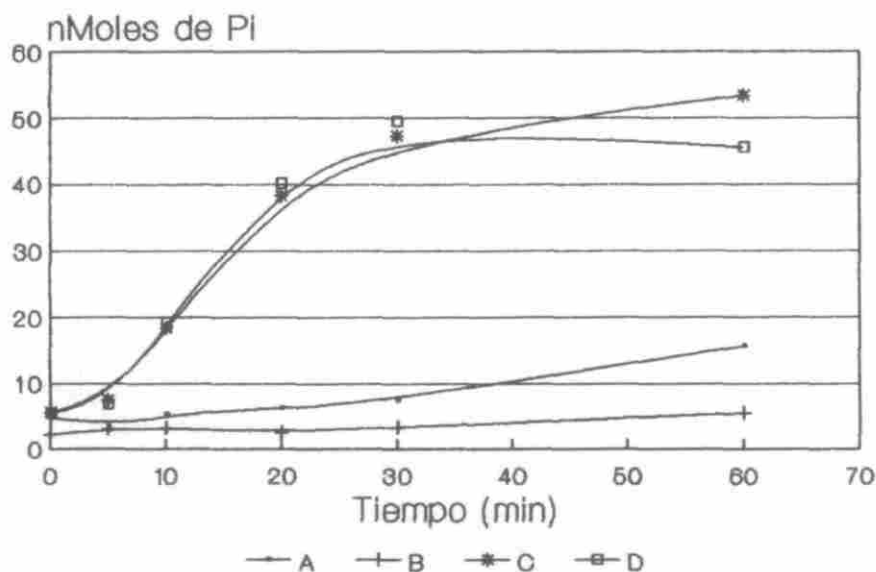


Figura 2: Efecto de la variación de la concentración de calcio sobre la actividad de la ATPasa de calcio de eritrocitos permeabilizados con Saponina, en presencia de los reguladores endógenos. A EGTA 2mM. B CaCl_2 2 μM . C CaCl_2 5 μM . D CaCl_2 10 μM . Proteína total de membrana: 15 μg .

composición del medio de reacción, aumentando la concentración de ATP a 5.45 y agregando CaM de eritrocito a una concentración 0.5 μ M. También se observó el efecto de la concentración de los iones Ca²⁺ y Mg²⁺ sobre la cantidad de fosfato liberado en una hora (ver figura 3).

Los mejores resultados se obtuvieron con CaCl₂ 1mM y MgCl₂ 8.3mM, condiciones en las que se liberaron hasta 3.79 micromoles de fosfato por miligramo de proteína por hora, un valor muy cercano a los valores determinados en estudios anteriores (9,11); sin embargo se observó que ésta actividad solo correspondía a 3.5 veces la actividad en ausencia de Ca²⁺ de las membranas tratadas con EGTA, por lo que se pensó en una mala eliminación de la Calmodulina endógena.

4. Evaluación del efecto de la concentración de la CaM exógena sobre la actividad de ATPasa de Calcio de las membranas tratadas con EGTA.

Se realizaron ensayos empleando como control membranas tratadas con EGTA en ausencia de CaM exógena para, determinar el efecto de la concentración de CaM sobre la actividad de la ATPasa de calcio.

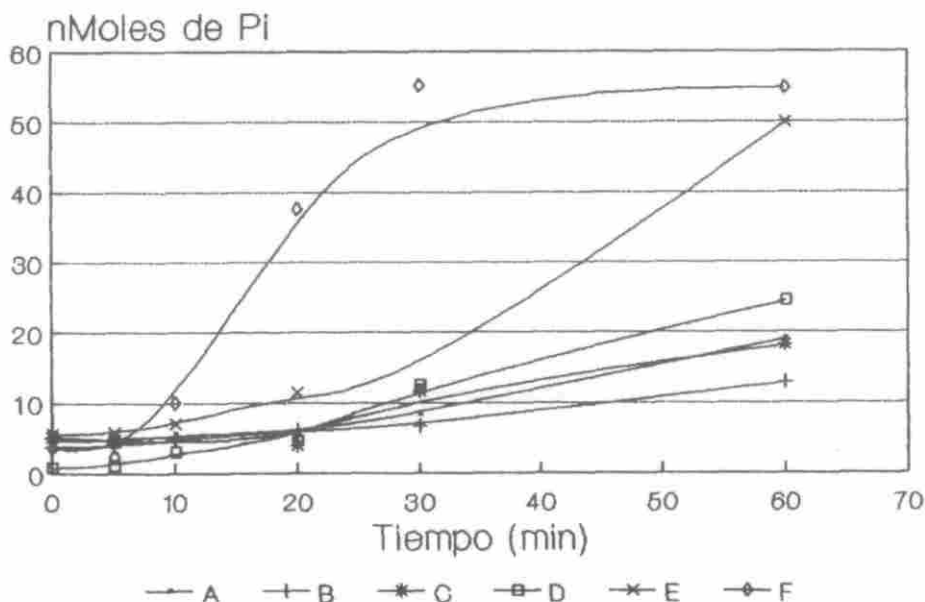


Figura 3: Efecto de la concentración de Ca²⁺ sobre la actividad de ATPasa de Ca²⁺ en membranas de eritrocito permeabilizadas con Saponina y lavadas con EGTA. En presencia de A EGTA 2mM, B Ca²⁺ 5 μ M, C Ca²⁺ 10 μ M, D Ca²⁺ 50 μ M, E Ca²⁺ 1mM y F Ca²⁺ 1mM y Mg²⁺ 8.3mM. A, B, C, D y E en presencia de Mg²⁺ 0.37mM. Proteína total de membrana: 13.5 μ g.

Se observó una actividad equivalente a 2.8 veces la actividad en ausencia de calcio al adicionar CaCl_2 1mM al sistema de reacción. Esta actividad aparentemente dependiente de calcio e independiente de CaM se consideró como la actividad basal de la ATPasa de calcio (figura 4).

Al agregar CaM $0.25\mu\text{M}$ la actividad basal se mantuvo y al duplicar ésta concentración la actividad aumento en un 38% con respecto a la actividad basal. Esta diferencia considerada como pequeña teniendo en cuenta otros estudios (10,13), dio pie a pensar que no se estaba observando claramente el efecto modulador de la CaM sobre la ATPasa de calcio de las membranas tratadas con EGTA.

5. Incorporación de saponina al 0.04% a la solución de reacción de la ATPasa de Calcio

Los ensayos incorporando saponina al sistema de reacción, con el objeto de mejorar la entrada de CaM exógena a los fantasmas de eritrocitos, mostraron en ocasiones un aumento de la actividad dependiente de CaM con respecto a la actividad basal; sin embargo, en la mayoría de los ensayos éste aumento no supero 3 veces la actividad basal, por lo que se pensó en la necesidad de algún elemento citoplasmático para la restitución de las condiciones de máxima actividad propias del eritrocito intacto.

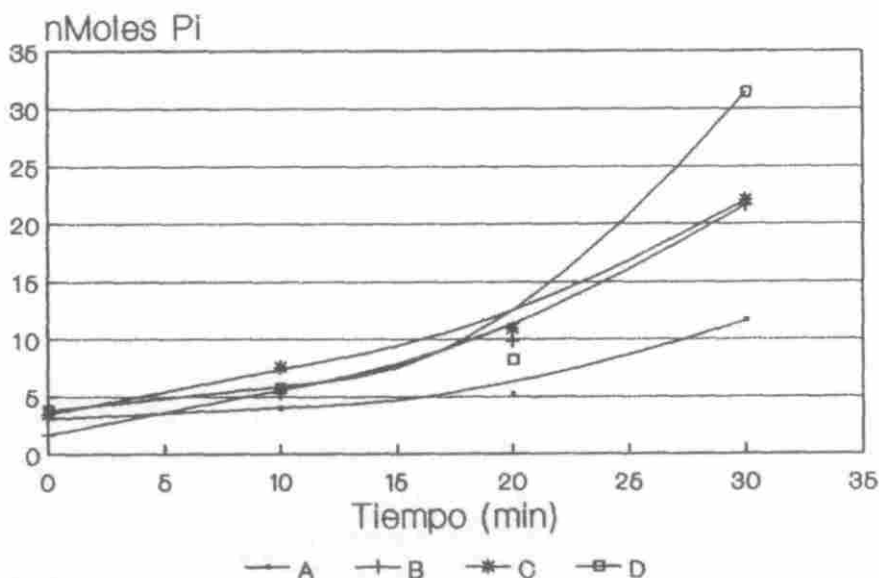


Figura 4: Efecto de la concentración de CaM sobre membranas de eritrocito tratadas con EGTA para eliminar reguladores endógenos. A EGTA 2mM. B Sin CaM. C CaM $0.25\mu\text{M}$. D CaM $0.5\mu\text{M}$ (DE = 2.5 - 3.8). Proteína total de membrana: $13.5\mu\text{g}$.

Se realizaron ensayos tendientes a evaluar el compromiso del sobrenadante obtenido después de la permeabilización de los eritrocitos con saponina en la reacción de la ATPasa de calcio. Se observó la actividad de fosfatasa propias del sobrenadante y de ATPasas de las membranas lavadas y no lavadas con EGTA, en presencia y ausencia del sobrenadante.

Los resultados de éstos ensayos aparecen en la figura 5 y muestran una actividad mayor de las membranas no tratadas con EGTA con respecto a las tratadas. Igualmente se observa que aparentemente no hay actividad de fosfatasa dependiente de calcio propia del sobrenadante y que la adición del sobrenadante al sistema de membranas tratadas con los quelantes no restablece las condiciones de máxima actividad de las membranas intactas.

De acuerdo con los resultados anteriores y con los estudios de Petrunyaka y Severina (18), sobre el efecto de detergentes y del almacenamiento a bajas temperaturas de las membranas de eritrocito sobre la actividad de la ATPasa de calcio, se pensó que en el sistema de reacción que se estaba empleando debía existir una modificación radical de las membranas, quizás condicionada por el tratamiento con saponina durante la permeabilización de los eritrocitos y/o por el congelamiento y descongelamiento de los fantasmas.

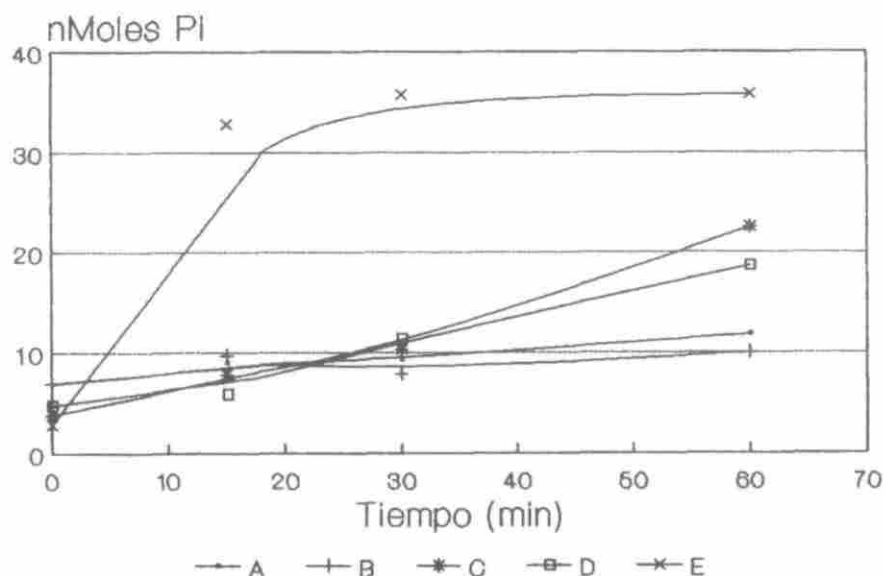


Figura 5: Efecto del sobrenadante de la lisis de eritrocitos sobre la actividad de ATPasa de calcio de las membranas. **A** Sobrenadante de lisis, EGTA 2mM. **B** Sobrenadante de lisis, Ca^{2+} 1mM. **C** Sobrenadante de lisis, membranas lavadas con EGTA, Ca^{2+} 1mM. **D** Sobrenadante de lisis, membranas lavadas con EGTA, Ouabafina 0.5 mM, Ca^{2+} 1mM. **E** Sobrenadante de lisis, membranas en presencia de los reguladores endógenos. Proteína total de membrana: 13.5µg.

Igualmente se pensó en descartar la posibilidad de modificación permanente de la ATPasa de calcio por actividad de Calpaína (19).

6. Tratamiento de membranas de eritrocitos con EDTA 1mM y estandarización de las condiciones óptimas de reacción para la ATPasa de calcio.

Pensando en la posibilidad de una mala eliminación de la CaM endógena, como responsable de la alta actividad basal que presentaron las membranas y buscando mejorar la calidad de las mismas en su actividad dependiente de CaM, se decidió realizar lavado exhaustivo en presencia de EDTA y en ausencia de otros iones empleados en la solución de lavado anterior. Las membranas así tratadas se sometieron a pruebas de actividad en presencia de Levamizol y Leupeptina, para descartar actividad de fosfatasas citoplasmáticas y de Calpaína respectivamente. No se observaron diferencias de la actividad en presencia y ausencia de éstos dos inhibidores, con lo que se descartaron las actividades a prueba.

Se ensayaron las membranas en presencia de Calcio y de CaM de testículo bovino a diferentes concentraciones, encontrándose la concentración de calcio total (1.17mM), capaz de estimular la ATPasa de calcio de una manera dependiente de CaM. Empleando la misma cantidad de membranas de los primeros ensayos (0.75 μ g/ μ L), se observó una actividad basal dependiente de calcio 3 veces menor que la observada en caso de las membra-

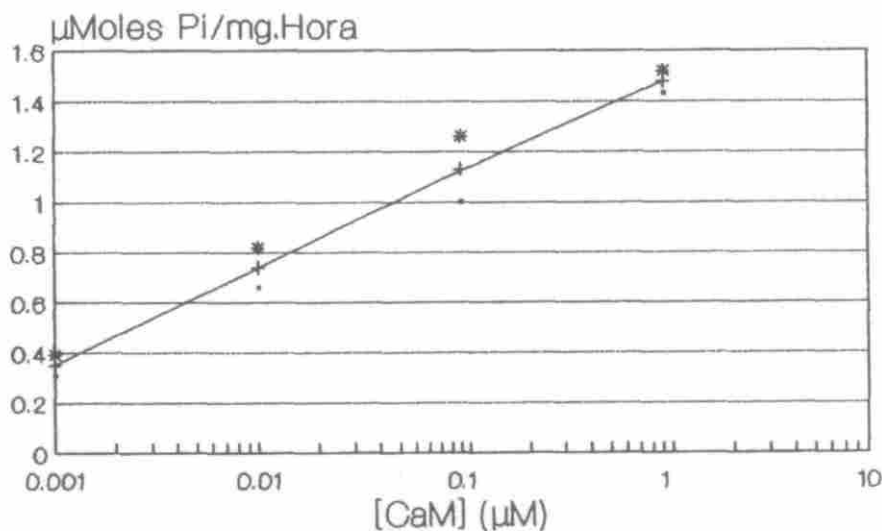


Figura 6: Curva patrón de actividad de ATPasa de calcio frente a la variación de la concentración de CaM. Datos de 4 ensayos. *Valores límite superiores. • Valores límite inferiores.

nas permeabilizadas con saponina y una actividad máxima detectada a la concentración $1\mu\text{M}$ de CaM, correspondiente a 4.24 veces la actividad basal. En las condiciones del sistema de ensayo, la actividad mínima, observada en presencia de calcio fue de 0.35 ± 0.038 micromoles de fosfato por miligramo de proteína por hora, valor que corresponde aproximadamente al 10% de la actividad máxima de los eritrocitos intactos (12) y que refleja una posible interferencia del Magnesio empleado en los primeros lavados de los fantasmas, sobre la eliminación de la Calmodulina endógena de los eritrocitos. La máxima actividad determinada en presencia de Calmodulina $1\mu\text{M}$ fue de 1.48 ± 0.016 micromoles de fosfato por miligramo por hora (figura 6), un valor que corresponde al 40% de la actividad máxima detectada en presencia de los reguladores endógenos de los eritrocitos.

La curva patrón de micromoles de fosfato por miligramo de proteína por hora contra el logaritmo de la concentración de CaM que aparece en la figura 6, fue empleada en los ensayos posteriores para la cuantificación de la CaM funcional recuperada luego de la purificación parcial a partir de *Plasmodium falciparum* (14).

De acuerdo con la sensibilidad del método de ensayo, fue posible cuantificar la Calmodulina del parásito y determinar su actividad específica en

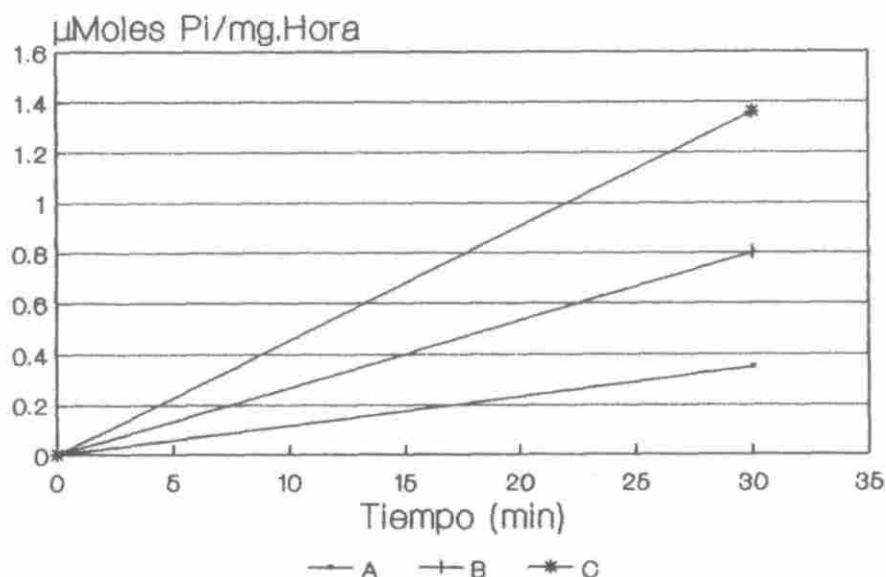


Figura 7: Efecto modulador de la CaM presente en las muestras II(150) y PS(41) de *Plasmodium falciparum* sobre la actividad de ATPasa de calcio del eritrocito. Actividad en (A) ausencia de CaM, en presencia de (B) II(150) y de (C) PS(41).

cada etapa del procedimiento de purificación. Las fracciones en las que se presentó mayor actividad de Calmodulina (figura 7) fueron capaces de estimular a la ATPasa de calcio 2.28 y 3.88 veces con respecto a su actividad basal, lo que permitió confirmar la identidad de la Calmodulina desde el punto de vista funcional. Se pudo establecer un nivel de pureza del 70% de CaM con respecto a la proteína total de la fracción PS(41).

El sistema de reacción de ATPasa de calcio en las condiciones estandarizadas ofrece ventajas como: 1. la posibilidad de cuantificar CaM a concentraciones inferiores a $1\mu\text{M}$, 2. la capacidad de revelar actividad basal de ATPasa de calcio (en presencia de calcio) y actividad máxima dependiente de calcio y Calmodulina, permitiendo realizar estudios cinéticos de la reacción enzimática y 3. la eliminación del uso de fósforo radiactivo del sistema de reacción.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue desarrollado con el apoyo del Instituto Nacional de Salud y Colciencias.

BIBLIOGRAFIA

1. Bond, G.H.; Clough, D.L. *Biochim. Biophys Acta.* **1972.** 323, 592
2. Jarret, H.M.; Penniston, J.J. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1977.** 77, 1210
3. Gopinath, R.M.; Vincenzi, F.F. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **1977.** 77, 1203
4. Schatzman, H.J.; Vincenzi, F.F. *J. Physiol.* **1969.** 201, 369
5. Olson, E.J.; Cazort, R.J. *J. Gen. Physiol.* **1969.** 53, 311
6. Jeffery, D.; Roufogalis, B.D.; Katz, S. *Biochem. Journal* **1981.** 194, 481
7. Muallem, S.; Karlsh, S.J.D. *Biochim. Biophys. Acta* **1981.** 597, 631
8. Rega, A.F.; Garrahan, P.J. *J. Membrane Biol.* **1975.** 22, 313

9. Akyempon, Ch.K.; Roufogalis, B.D. *Cell Calcium* **1982**, 3, 1
10. Sarkadi, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, 604, 159
11. Roufogalis, B.D.; Villalobo, A. In : *The cell Membrane*. Ed. Human Press, Inc. Clifton NJ pp 75-101. **1989**.
12. Wu, L.; Hinds, T.R.; Vincenzi, F.F. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, 1106, 56
13. Petrunyaka, V.V. y Col. *Biochim. Biophys. Acta* **1990**, 1030, 279
14. Tinjacá, C.P.; Wasserman, M. **1995** En impresión
15. Bradford, M.M. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248
16. Muzbec, L.; Szabo, J.; Fesus, L. *Anal. Biochem.* **1977**, 77, 286
17. Lanzeta, P.A. y col. *Anal. Biochem.* **1979**, 100, 95
18. Petrunyaka, V.V.; Severina, E.P. *Biologicheskie membrany* **1992**, 9 (3), 263
19. James, P. y Col. *J. Biol. Chem.* **1989**, 264 (14), 8289