

# Caracterización y mecanismo de acción de diferentes moduladores de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática

VINCENZA CERVINO<sup>1</sup>, MARÍA CAROLINA PÉREZ-GORDONEZ<sup>1</sup> Y GUSTAVO BENAÏM<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biofísica. Centro de Biología Celular. Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello Monte y <sup>2</sup>Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Caracas – Venezuela. Email: vincenza.cervino@ciens.ucv.ve

La combinación de herramientas bioquímicas, biofísicas y moleculares han permitido profundizar en el estudio de la relación estructura-función de diversas proteínas. La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática, enzima clave en el mantenimiento de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , es una proteína cuya función es altamente regulada. En este sentido, la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es regulada por calmodulina, fosforilación por proteínas quinasas dependientes de AMPc y  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfolípidos ácidos, proteólisis por calpaína, solventes orgánicos, etanol y segundos mensajeros de naturaleza lipídica como: diacilglicerol y esfingolípidos. El efecto de los distintos moduladores sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa ha sido caracterizado a nivel funcional y los sitios de interacción con la proteína han sido establecidos en algunos casos por estudios de inmunomarcaje y proteólisis. Recientemente con la disponibilidad de las herramientas moleculares se ha profundizado en el estudio de los sitios en la proteína donde intervienen cada uno de los compuestos que conocemos tienen un papel regulatorio sobre la enzima, pudiéndose establecer una relación entre las funciones y propiedades regulatorias de los moduladores y la estructura de la proteína. Por otra parte, hemos podido expresar y realizar manipulaciones genéticas de la enzima, pudiendo así profundizar sobre los mecanismos de acción de estos moduladores sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática.

## Introducción

La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática es una enzima clave en el mantenimiento de la homeostasis intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta enzima transporta a este catión desde el citoplasma de las células a expensas de la hidrólisis de ATP y en algunas células es el único sistema transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  existente en la membrana plasmática. De hecho, en eritrocitos, la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es la única estructura encargada de mantener los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Esta enzima ha sido identificada en todas las células eucariotas estudiadas: en plantas, en eucariotas inferiores, en parásitos extracelulares e intracelulares e incluso en algunos organismos procariontes (2, 7, 8). La existencia de esta estructura en sistemas tan poco relacionados evolutivamente demuestra su importancia como mecanismo de regulación de la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Una propiedad distintiva de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es que ésta es regulada por una amplia variedad de mecanismos como son: la activación directa por la calmodulina (CaM) (6, 7), interacción con fosfolípidos ácidos o ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (14, 16, 21), fosforilación por proteínas quinasas A y C (15, 20), proteólisis por calpaína (1), solventes orgánicos (3), etanol (4, 9) y segundos mensajeros lipídicos como el diacilglicerol (17) y los esfingolípidos (10).

Uno de los aspectos más importantes a considerar cuando estamos caracterizando el efecto de alguna molécula reguladora sobre la actividad de una enzima,

es establecer el mecanismo de acción de dicho regulador, para lo cual es importante identificar y caracterizar la posible región en la estructura de la enzima donde dicho compuesto estaría ejerciendo su efecto. Mediante numerosos estudios se ha tratado de establecer el mecanismo de acción de los diferentes moduladores de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática, algunos de los cuales actualmente son ampliamente conocidos, como es el caso de la CaM, mientras otros apenas comienzan a dilucidarse.

Uno de los intereses actuales de nuestra investigación es caracterizar y establecer el posible mecanismo de acción de diferentes compuestos que hemos identificado y caracterizado como reguladores de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática, como son: el etanol, el diacilglicerol y la ceramida, los dos últimos, compuestos de gran relevancia al ser dos importantes segundos mensajeros en las células eucariotas.

## Mecanismo de acción de la CaM sobre la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática

La CaM es el principal modulador proteico natural de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática, una proteína mediadora de las funciones del  $\text{Ca}^{2+}$ , altamente conservada y presente en todas las células eucariotas (6). La CaM aumenta la  $V_{\text{max}}$  y la afinidad de la enzima por el  $\text{Ca}^{2+}$ . El mecanismo de estimulación de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa por la CaM ha sido bien caracterizado. La localización del dominio de unión de CaM en esta enzima y la evidencia de un dominio autoinhibitorio C-terminal de 9 KDa, se

determinó en un primer acercamiento mediante estudios de proteólisis controlada (11, 16). Posteriormente mediante el uso de herramientas moleculares utilizando formas truncadas expresadas de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, se logró establecer que dicho dominio consistía en una región C-terminal de 28 aa (19). La estandarización del sistema de expresión de proteínas en células COS, para la expresión de diferentes isoformas y formas truncadas de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa fueron claves en este estudio.

Profundizando más en la caracterización del mecanismo de acción de la CaM sobre esta enzima, se lograron identificar mediante estudios de marcaje molecular, dos sitios citoplasmáticos de la enzima donde interactúa el dominio de unión de la CaM (12, 13). Uno de estos sitios está ubicado en el segundo dominio citosólico entre la región donde se forma el intermediario fosforilado y el sitio de unión del ATP, el cual comprende 8 aa (residuos 537 al 544 de la enzima) y el otro sitio, algo más extenso, está ubicado entre los residuos aminoácidos 206 y 271.

Todos estos estudios en combinación utilizando herramientas bioquímicas, biofísicas, inmunológicas, y moleculares, permitieron establecer el mecanismo de acción de la CaM sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática que hoy conocemos, concluyéndose así, que la interacción del dominio de unión de la CaM en el extremo C-terminal de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa con los dos sitios identificados cercanos al sitio activo de la enzima, permite un mayor o menor acceso de los sustratos al sitio activo y que dicha interacción entre los dominios citoplasmático y la región C-terminal debe ser regulado por la interacción de la CaM con la enzima.

#### *Mecanismo de acción de los fosfolípidos ácidos sobre la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática*

La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es activada por fosfolípidos ácidos como la fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI) así como por ácidos grasos polinsaturados de cadena larga como ácido oleico y araquidónico (16). Se ha sugerido que la presencia de este tipo de fosfolípidos en el ambiente natural de la enzima, podría traer como consecuencia el que la enzima se encuentre estimulada hasta un 50 % de su estimulación máxima en condiciones naturales y que la estimulación depende de la unión directa de los lípidos a la proteína. Se ha planteado la existencia de dos sitios de unión de estos fosfolípidos con la enzima (5, 14, 21), uno de estos sitios es compartido con la CaM y el otro es un dominio proteico separado, rico en lisina y localizado en el dominio citoplasmático ubicado entre los dominios transmembrana 2 y 3, en la región comprendida entre

los aa 296 y 349 de la enzima. Respecto al mecanismo de acción de los fosfolípidos ácidos sobre la ATPasa, sólo existe información fragmentaria. Sin embargo, el modelo planteado es la interacción directa de estos compuestos en las regiones C-terminal (dominio compartido con la región de unión de CaM) y N-terminal ubicada entre los aminoácidos 296 y 349 de la proteína. Los trabajos hasta ahora discutidos han permitido sugerir que los mecanismos de estimulación por CaM y por los fosfolípidos ácidos podrían ser similares. Sin embargo, existen abundantes diferencias entre ambos moduladores, como son, el número de sitios de unión, la cantidad de moléculas necesarias para producir la estimulación y el nivel final de estimulación, que pudiera explicarse mediante la acción diferencial de estos compuestos sobre la enzima. El mecanismo de acción de los fosfolípidos ácidos debe ser estudiado en mayor profundidad lo cual podrá ser abordado mediante el uso de formas de la enzima manipuladas genéticamente y posteriormente expresadas y caracterizadas.

#### *Mecanismo de acción del Etanol sobre la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática*

Trabajos realizados en nuestro Laboratorio demostraron que el etanol, un compuesto asociado con numerosos desórdenes degenerativos e inflamatorios en hígado, corazón, músculo esquelético y páncreas, así como un fuerte perturbador del sistema nervioso central, era capaz de estimular a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática, tanto en preparaciones de membrana como en la enzima purificada de eritrocitos humanos (4), encontrándose que a una concentración de 5% etanol, la velocidad máxima de la enzima aumenta 2.4 veces con respecto a la actividad basal produciéndose además una disminución del  $K_m$  para el  $\text{Ca}^{2+}$ .

Tratando de profundizar sobre el posible mecanismo de acción del etanol, se estudió el efecto de este alcohol sobre 4 isoformas (PMCA1b, PMCA2c, PMCA4a y PMCA4b) y formas truncadas carentes de 44 y 139 aa en la región C-terminal (PMCA4b $\Delta$ 44 y PMCA4b $\Delta$ 139) de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática, expresadas en células Sf9 a través de un sistema de expresión por baculovirus (9). Los resultados mostraron que el etanol era capaz de estimular todas las isoformas de la enzima y a la forma truncada PMCA4b $\Delta$ 44, mientras que no tuvo ningún efecto en la forma truncada PMCA4b $\Delta$ 139. Esto permitió demostrar, que el etanol estaba ejerciendo su efecto sobre la enzima en una región de 95 aa localizada hacia el extremo C-terminal de la proteína (9). Dado a que esta región de 95 aa, es muy

extensa para la interacción del etanol con la enzima y en ella se encuentra también el sitio de unión de la CaM, se intentó establecer una región más delimitada donde pudiera estar interactuando este alcohol. En este sentido, se utilizó una nueva forma truncada, carente de 118 aa C-terminales (PMCA4b $\Delta$ 118), la cual carecía de 21 aa con respecto a la PMCA4b $\Delta$ 139. Los resultados mostraron que el etanol en esta forma truncada  $\Delta$ 118 no tenía ningún efecto al igual que en la forma  $\Delta$ 139, indicándonos que los 21 aa presentes en la forma  $\Delta$ 139 y ausente en la  $\Delta$ 118, no participaban directamente en la interacción del alcohol con la enzima, concluyéndose así, que la región de interacción del etanol se encontraba en los 74 aminoácidos restantes (18).

Por otra parte, ha sido reportado que el etanol tiene un efecto aditivo al de la CaM en la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa purificada de eritrocitos humanos, fantasmas de eritrocitos humanos y sobre el transporte de Ca<sup>2+</sup> en vesículas invertidas de eritrocitos (4). Observándose igualmente este aditividad en la forma nativa y truncada  $\Delta$ 44 de la enzima, expresada tanto en células Sf9 (9), como en células COS-7 (18). Estas evidencias, claramente indican mecanismos de acción diferentes para estos moduladores sobre la enzima. Tomando en cuenta que en la región de 74 aa C-terminal se encuentran los 28 aa correspondientes al sitio de unión de la CaM con la enzima, se podría plantear entonces, que al restar de la región de 74 aa C-terminales, estos 28 aminoácidos, quedarían 46 aminoácidos donde posiblemente estaría interactuando el etanol con la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa. Resta a futuro tratar de establecer dentro de esta región, el o los aminoácidos donde estaría interactuando directamente el etanol, lo cual podría ser fácilmente corroborado con la generación de nuevas formas truncadas y mutadas de la enzima, así como mediante estudios de interacción del etanol o compuestos sintéticos marcados directamente con la proteína.

#### *Mecanismo de acción del Diacilglicerol y la Ceramida sobre la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de Membrana Plasmática*

La estimulación inducida por el etanol sobre la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa llevó a considerar la importancia que este efecto pudiera tener para la enzima “in vivo”, dado a que el etanol no es un modulador natural. Esto planteó la posible existencia de otros moduladores fisiológicos que estimulen a esta enzima *in vivo* y que pudieran llevar a la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa a su máximo potencial de actividad, simulando el efecto del etanol. En este sentido, se pudo demostrar que el diacilglicerol (17) y la ceramida (10), estimulan directamente la bomba,

aumentando la velocidad máxima y disminuyendo el Km para el Ca<sup>2+</sup>, encontrándose además una aditividad del efecto del DAG y la ceramida con CaM y etanol. Dada la importancia del DAG y la ceramida como segundos mensajeros en las células y como moduladores fisiológicos de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de membrana plasmática, resulta de gran interés establecer el posible sitio de interacción de estos compuestos con la enzima y sus mecanismo de acción sobre la misma.

Estudios realizados sobre las formas truncadas  $\Delta$ 44,  $\Delta$ 118 y  $\Delta$ 139 de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa expresada en células COS-7, permitieron ahondar sobre el posible mecanismo de acción del DAG y la ceramida. En este sentido, se demostró que tanto el DAG como la ceramida, eran capaces de estimular tanto a la isoforma nativa PMCA4b como a las formas truncadas  $\Delta$ 44,  $\Delta$ 118 y  $\Delta$ 139, independientemente de que tuvieran o no el sitio de interacción del etanol y la CaM, sugiriéndose de manera evidente que los 139 aa presentes hacia el extremo C-terminal de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, no estarían involucrados en la interacción del DAG y de la ceramida con la enzima.

Tratando de explorar otras posibles regiones en la proteína donde podrían interactuar estos compuestos, se pensó en la posibilidad de que ejercieran su efecto mediante un mecanismo similar al reportado para los fosfolípidos ácidos (5, 14, 21). Tomando en cuenta que el DAG y la ceramida tuvieron un efecto estimulador en las formas truncadas de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa carente del sitio de unión de la CaM, donde se encuentra uno de los sitios de estimulación por fosfolípidos ácidos reportados, esta región quedó descartada, explorándose entonces la posible interacción del DAG y la ceramida con el segundo sitio reportado, ubicado en la región de 44 aa en la región N-terminal de la enzima (21).

Para estudiar la posible participación de esta región de 44 aa en la interacción del DAG y la ceramida con la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, se determinó el efecto de ambos moduladores sobre la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa purificada de eritrocitos humanos en ausencia y presencia de un fosfolípido ácido como la fosfatidilserina (PS). Los resultados mostraron que no hay aditividad entre los efectos de PS-DAG, PS-Ceramida, DAG-Ceramida y DAG-PS-Ceramida, indicando esto que los tres moduladores lipídicos posiblemente interactúan con la enzima en un mismo dominio y concluyéndose que éstos estimulan a la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de membrana plasmática mediante un mecanismo de acción similar al de los fosfolípidos ácidos. Estudios donde se realicen manipulaciones genéticas de la enzima en esta región, permitirán profundizar sobre los posibles aminoácidos importantes para la interacción de estos compuestos con la enzima.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el FONACIT S1-2001000789 y CDCH-UCV PI 03-00-6375-2006 a V. C. y FONACIT 2011000884 y CDCH-UCV PI-03-00-7380-2008/2 a G.B.

## Referencias

1. **Anagli, J., Viley, E. M., Molinari, M., Calderara, S. y Carafoli, E.** (1996). Purification of active calpain by affinity chromatography on an immobilized peptide inhibitor. **Eur. J. Biochem.** **241**: 948-954.
2. **Benaim, G. y Cervino, V.** (2000). Intracellular calcium homeostasis and signaling in trypanosomatids. **Electr. J. Pathol. Histol.** **6.1**: 1-10.
3. **Benaim, G. y de Meis, L.** (1990). Similarities between the effects of dimethyl sulfoxide and calmodulin on the red cell  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. **Biochim. Biophys. Acta** **1026**: 87-92.
4. **Benaim, G., Cervino, V., Lopez-Estraño, C. y Weitzman, C.** (1994). Ethanol stimulate the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta** **1195**: 141-148.
5. **Brodin, P., Falchetto, R., Vorherr, T. y Carafoli, E.** (1992). Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump. **Eur. J. Biochem.** **204**: 939-946.
6. **Carafoli, E.** (1994). Biogenesis: Plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. **FASEB J.** **8**: 993-1002.
7. **Carafoli, E.** (2002). Calcium signaling: a tale for all seasons. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **99**(3): 1115-1122.
8. **Carafoli, E., Zurini, M. y Benaim, G.** (1986). The calcium pump of plasma membranes. En *Calcium and the Cell*. D. Evered y J. Whelan (Eds.). Wiley. Ciba Foundation Symposium. Vol 122: 58-72.
9. **Cervino, V., Benaim, G., Carafoli, E. y Guerini, D.** (1998). The effect of ethanol on the plasma membrane calcium pump is isoform specific. **J. Biol. Chem.** **273**: 29811-29815.
10. **Colina, C., Cervino, V. y Benaim, G.** (2002). Ceramide and sphingosine have an antagonistic effect on the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from human erythrocytes. **Biochem. J.** **362**: 247-251.
11. **Enyedi, A., Sarkadi, B., Szasz, I., Bot, B. y Gardos, G.** (1980). Molecular properties of the red cell calcium pump. Effects of calmodulin, proteolytic digestion and drugs on the calcium-induced membrane phosphorylation by ATP in inside-out red cell membrane vesicles. **Cell Calcium** **1**: 299-310.
12. **Falchetto, R., Vorherr, T., Brunner, J. y Carafoli, E.** (1991). The plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain. **J. Biol. Chem.** **266**: 2930-2936.
13. **Falchetto, R., Vorherr, T. y Carafoli, E.** (1992). The Calmodulin-binding site of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump interacts with the transduction domain of the enzyme. **Prot. Sci.** **1**: 1613-1621.
14. **Filoteo, A. G., Enyedi, A. y Penniston, J. T.** (1992). The lipid-binding peptide from the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump binds calmodulin, and the primary calmodulin-binding domain interacts with lipid. **J. Biol. Chem.** **267**: 11800-11805.
15. **James, P., Pruschy, M., Vorherr, T., Penniston, J.T. y Carafoli, E.** (1989). Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump. **Biochemistry** **28**: 4253-4258.
16. **Niggli, V., Adunyah, E.S. y Carafoli, E.** (1981). Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. **J. Biol. Chem.** **256**: 8588-8592.
17. **Pérez-Gordones, M., Lugo, M., Winkler, M., Cervino, V. y Benaim, G.** (2009). Diacylglycerol regulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes by direct interaction. **Arch. Biochem. Biophys.** **489** (1-2): 55-61.
18. **Pérez-Gordones, M.** (2011). Una contribución al estudio de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática de humanos y proteínas reguladoras de calcio en *Trypanosoma evansi*. Trabajo de Tesis Doctoral.
19. **Verma, A., Enyedi, A., Filoteo, A. y Penniston, J.** (1994). Regulatory región of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -pump. 28 residues suffice to bind calmodulin but more are needed for full auto-inhibition of the activity. **J. Biol. Chem.** **269**(3): 1687-1691.
20. **Wang, K. K. W., Wright, L. C., Machan, C. L., Allen, B. G., Conigrave, A. D. y Roufogalis, B. D.** (1991). Protein kinase C phosphorylates the carboxil terminus of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from human erythrocytes. **J. Biol. Chem.** **266**: 9078-9085.
21. **Zvaritch, E., James, P., Vorherr, T., Falchetto, R., Modyanov, N y Carafoli, E.** (1990). Mapping of functional domains in the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump using trypsin proteolysis. **Biochemistry** **29**: 8070-8076.