

## Caracterización parcial de la calmodulina de *Plasmodium falciparum*

Claudia P. Tinjacá<sup>1</sup>, Moisés Wasserman<sup>2</sup>

### Resumen

Se describe una alternativa para la purificación parcial de Calmodulina (CaM) a partir de *Plasmodium falciparum* que, de acuerdo con anticuerpos monoclonales altamente específicos contra CaM, permite separar por lo menos dos formas de la proteína que, aunque difieren en sus pesos moleculares (una pequeña de 12.600 y otra grande entre 36.000 y 50.000 daltones), son capaces de estimular a la ATPasa de calcio del eritrocito por separado. Se plantea la posibilidad de una modificación estructural de la CaM de *Plasmodium falciparum*, que no interfiere con su función como activadora de la ATPasa de calcio y que la hace inhibible en menor grado que la CaM de eritrocito en su función estimuladora de la enzima. Lo anterior hace pensar en una mayor afinidad de la proteína del parásito por esta enzima o en una modificación de la zona regulatoria a la que se unen los inhibidores.

### Summary

Partial purification of *Plasmodium falciparum* Calmodulin (CaM) is described. Using highly specific monoclonal antibodies against CaM, we were able to separate two forms of this protein (a small form having a molecular weight of 12.600 and a bigger one of between 36.000 and 50.000 daltons), which separately are capable of stimulating the erythrocyte calcium ATPase. The possibility of a *Plasmodium falciparum* CaM structural modification, which does not interfere with its function as a calcium ATPase activator and makes it less sensible to CaM inhibitors than erythrocyte CaM, is proposed. Protein behaviour against CaM inhibitors, makes us believe that there is either an increase in calcium ATPase affinity or a modification of the inhibitors' interacting regulatory zone.

De acuerdo con estudios sobre la infección por *P falciparum* en presencia de antagonistas de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina (1,2,3), el sistema Ca<sup>2+</sup>/Calmodulina juega un papel importante sobre el crecimiento del parásito durante los estados tardíos. Al parecer el influjo de Ca<sup>2+</sup> en el eritrocito puede activar a la calmodulina y/o a proteínas

secundarias que se unen a esta proteína y como consecuencia activar procesos regulados por el Ca<sup>2+</sup>, relacionados con el crecimiento del parásito. Esto estaría de acuerdo con el incremento en los niveles de calmodulina (4) proporcionales a la madurez del parásito (por la participación de la calmodulina de la célula hospedera y del parásito)

---

<sup>1</sup> Estudiante de Magister en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup> Grupo de Bioquímica, Instituto Nacional de Salud y Profesor de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

y con el efecto inhibitorio de los anta-gonistas de la calmodulina sobre su desarrollo (1,2).

Estudios de inmunoelectromicroscopía se ha demostrado la localización de calmodulina en el extremo apical del merozoíto, dentro de los conductos de las roptrías (3,6), lo que conjuntamente con las evidencias, cada vez mayores, de que los componentes de las roptrías participan en el proceso de invasión, después de la unión entre las membranas del parásito y del eritrocito (6), ha hecho pensar que la calmodulina podría jugar algún papel durante este proceso.

Otro blanco de actividad de la calmodulina, se cree podrían ser los microtúbulos subpeliculares, relacionados con la motilidad en el merozoíto (4). Estos se ubican bordeando la membrana y convergen en el extremo apical del merozoíto, zonas en las cuales existe alta inmunorreactividad de la calmodulina.

Hasta la fecha lo único que se conoce sobre la calmodulina de *P falciparum* es la secuencia del gen que codifica para su síntesis (5); ésta presenta una homología del 89%, 86.6% y 60.4% con las secuencias de los genes de CaM de eritrocito, *Trypanosoma brucei* y levaduras respectivamente (7). El gen aparece como una copia única en el cromosoma 14 del parásito y tiene un intrón también único, a diferencia de otros genes de calmodulina de eucariotes inferiores (5,7). A partir de la secuencia del gen se ha deducido la secuencia de aminoácidos de la CaM de *Plasmodium falciparum*, de acuerdo con la cual la proteína consta de 148 aminoácidos, que representan un peso molecular aproximado de 19.000 dalton (5); sin embargo, los estudios de expresión del gen de *Plasmodium falciparum* en bacterias (7) sugieren que la CaM del parásito migra como una banda de 17.000 dalton de peso molecular en electroforesis de poliacrilamida con SDS.

Finalmente, algunas evidencias experimentales sugieren que los antimaláricos clínicamente efectivos como la quinina y la quinacrina tienen potencial inhibitorio sobre la CaM (4), razón por la que, considerando además la importancia de esta proteína en diversos eventos celulares, se ha puesto interés en el estudio de la CaM de *Plas-*

*modium falciparum*, tratando de determinar su potencial como blanco para el desarrollo de drogas sintéticas contra la malaria. El objetivo de este trabajo es hacer un aporte al estudio de caracterización de la calmodulina de *Plasmodium falciparum*, una vez purificada de acuerdo con sus propiedades en otras especies (12,13,14).

## Materiales y métodos

### Purificación de calmodulina de *Plasmodium falciparum*.

El cultivo de *Plasmodium falciparum* se realizó de acuerdo con el método de Trager y Jensen (8). Los parásitos parcialmente sincronizados con sorbitol se mantuvieron en cultivo hasta la etapa de trofozoítos maduros, estadio de mayor concentración de CaM (4) preferencialmente, obteniéndose parasitemias que fluctuaron entre el 5 y 10%. Se eliminó el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados con Hepes 20mM, NaCl 150mM pH 7.4, centrifugando cada vez a 9.500xg, durante 5 minutos. Los eritrocitos infectados lavados fueron sometidos a una solución de Saponina al 0.15%, EDTA 1mM, EGTA 1mM, Hepes 20mM, NaCl 150mM pH 7.4 durante 10 minutos a 4°C y posteriormente fueron incubados en buffer Hepes 20mM, NaCl 150mM, en presencia de EDTA/EGTA 1mM durante 20 minutos a 4°C y se sometieron a 3 lavados consecutivos con la misma solución. El pellet precipitado a 21.000xg se resuspendió en proporción 1:10 en el buffer EDTA/EGTA en presencia de PMSF 0.1mM y DTT 0.1mM y se almacenó a -70°C.

Una vez acumulado suficiente material (aproximadamente  $1.2 \times 10^{12}$  parásitos) para el proceso de purificación, se procedió a la ruptura celular por sonicación, empleando dos periodos de 8 pulsos de 20 KHz, de 30 segundos de duración cada uno, a intervalos de un minuto. La ruptura de las membranas se verificó por microscopía de luz y finalmente se separaron dos fracciones del parásito por centrifugación a 20.000xg 15 minutos a 4°C. A los sobrenadantes del paso anterior se les agregó gota a gota solución saturada de sulfato de amonio, hasta alcanzar una concentración final del 40% de

saturación, con agitación continua durante 60 minutos a 4°C. Se guardó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en buffer Hepes 10mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, DTT 1mM, EGTA/EDTA 1mM y PMSF 0.1mM pH 7.4. El pellet resuspendido fue sometido a una nueva precipitación con sulfato de amonio en las mismas condiciones de la anterior.

Los sobrenadantes y los pellets de la precipitación con sulfato de amonio se desalinizaron por diálisis contra 20 volúmenes de buffer Hepes 2mM, EDTA/EGTA 0.1mM, β-mercaptoetanol 0.1mM, pH 7.4. Se hicieron 3 cambios: el primero a las 24 horas y los dos restantes 36 y 48 horas después. Se emplearon membranas de diálisis pretratadas con poro de exclusión 1000.

Para los ensayos de determinación de proteína y de actividad de ATPasa se separaron alícuotas de 1mL de cada fracción que fueron desalinizadas por cromatografía en Sephadex G-25 y por ultrafiltración a través de membranas Millipore con poro de exclusión 5000.

Se realizó cromatografía en DEAE-sepharosa CL 6B, preequilibrada con buffer Hepes 2mM, EGTA/EDTA 0.1mM, DTT 0.1mM, PMSF 0.1mM, NaCl 50mM pH 7.4. La muestra se cargó en el buffer de diálisis más NaCl 50mM y PMSF 0.1mM. Se realizó elución de proteínas en 3 pasos empleando NaCl 50, 150mM y 600mM en el mismo buffer. Se recogieron fracciones de 9 - 11mL, a un flujo de 6 - 6.6mL/H a 4°C. A las fracciones de la cromatografía de intercambio iónico que fueron positivas en cuanto a actividad de calmodulina se les agregó CaCl<sub>2</sub> y NaCl hasta alcanzar una concentración final 5mM y 1.6M respectivamente.

La muestra se cargó a la columna de fenil superosa, preequilibrada con Tris.HCl 50mM, DTT 0.1mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1mM. Se hizo un primer lavado de la columna con 3 volúmenes de buffer Tris.HCl 50mM, DTT 1mM, CaCl<sub>2</sub> 0.1mM y NaCl 0.5M y un segundo lavado con el mismo buffer eliminando el NaCl. Esperando eluir la calmodulina se hizo un último paso de elución en presencia de EGTA 2mM en lugar de CaCl<sub>2</sub> (30 volúmenes de columna). Se recogieron fracciones entre 0.5 y 1mL a un flujo de 0.2mL/min

### Localización de calmodulina con anticuerpos comerciales

Se emplearon anticuerpos monoclonales contra calmodulina, obtenidos a partir de ratones inmunizados contra CaM de *Dictyostelium discoideum* y comprados a Sigma Immunochemicals, para el monitoreo de calmodulina en cada una de las etapas del procedimiento de purificación. Se hicieron ensayos de localización de CaM con anticuerpos sobre muestras adsorbidas directamente a membranas de immobilon P y sobre muestras separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida más dodecil sulfato de sodio y electrotransferidas a el mismo tipo de membranas

### Caracterización de la calmodulina de *Plasmodium falciparum*

La determinación del potencial de la calmodulina de *Plasmodium falciparum* como activador de la ATPasa de calcio del eritrocito se realizó de acuerdo con Tinjacá y Wasserman (9). Igualmente, se observó el efecto de los inhibidores de CaM W-7 y calmidazolium (CdZ) sobre la actividad de la enzima en presencia de la calmodulina del parásito y la calmodulina del eritrocito.

En caso de ambas CaMs se trabajó con la concentración 10nM, correspondiente a la concentración determinada para la muestra con actividad de CaM obtenida después de la cromatografía de intercambio iónico. Las concentraciones empleadas de los inhibidores fueron 0 - 100μM en el caso de CdZ y 0 - 400μM en el caso de W-7.

La determinación del peso molecular se realizó por Western blot (16), empleando la mezcla de tres anticuerpos monoclonales contra calmodulina marca SIGMA IMMUNOCHEMICALS. Se emplearon patrones de peso molecular preteñidos marca BRL: insulina 2.600, inhibidor de tripsina bovina 5.000, lisozima 12.700, β-lactoglobulina 18.100, anhidrasa carbónica 29.000 y ovoalbumina 43.800.

## Resultados

### Purificación de CaM

La determinación de la actividad de CaM en el parásito completo permitió establecer que la

cantidad de CaM en el total de parásitos empleados ( $2.78 \times 10^{11}$ ) correspondió al 2.46% de la cantidad esperada (6.41mg) de acuerdo con los estudios previos empleando anticuerpos (4) y se obtuvo el 69.83% de la proteína total del parásito en los sobrenadantes. En la fracción soluble del parásito se observó actividad de fosfatasas correspondiente al 48.18% y la actividad restante apareció en la fracción particulada.

Por otro lado, los ensayos de detección de CaM mediante la ATPasa de calcio revelaron su existencia en la fracción de sobrenadantes de sonicación. La recuperación de la CaM fue del 12.31% y se observó un descenso significativo de la actividad específica con respecto al parásito completo (ver tabla 1). Luego de dos precipitaciones consecutivas con sulfato de amonio, la proteína total recuperada en los sobrenadantes correspondió al 40.82% de la proteína de los sobrenadantes de sonicación. Durante esta etapa la actividad de fosfatasas propias de la muestra desapareció en el precipitado y aparentemente se recuperó el 100% de la CaM inicial. De acuerdo con estos resultados se presentó un aumento en la actividad específica de 78.6 veces con respecto al paso anterior.

Con la diálisis del sobrenadante de la precipitación con sulfato de amonio la muestra se diluyó 1.15 veces y la cantidad de CaM se redujo al 46%

(273.7 $\mu$ g) con respecto al paso anterior. La proteína total correspondió al 32.96% de la proteína del sobrenadante de sonicación.

La CaM recuperada después de la cromatografía en DEAE sepharosa se detectó en 4 fracciones (II(29), II(30), II(31), II(32)) separadas con el paso de elución de fuerza iónica intermedia (figura 1). La proteína total de las cuatro fracciones correspondió al 10.29% (13.97mg) de la proteína total del sobrenadante dializado de la precipitación con sulfato de amonio, se recuperó un 7.1% de la CaM inicial y en la fracción de mayor actividad específica (II(31)) se logró un grado de purificación de 1.6 veces el obtenido con la precipitación con sulfato de amonio.

Por otro lado, se empleó una alícuota de parásitos de 115mL con  $5.5 \times 10^{11}$  células, que fueron sonicadas y los sobrenadantes resultantes se dializaron para eliminar el exceso de sal, el EGTA y el EDTA del buffer en que se encontraban resuspendidos los parásitos. Se ejecutó una cromatografía en la misma matriz (figura 2), esta vez eluyendo con gradiente continuo de fuerza iónica. La fracción con mayor actividad de CaM (II(38)) que fue eluída con una concentración de NaCl entre 150 y 200mM, presentó un porcentaje de recuperación de CaM, con respecto al valor esperado, del 2.16% y de la proteína inicial del 0.04%.

Tabla 1. Datos cuantitativos del segundo procedimiento de purificación.

Etapa	Fracción	PT (mg)	$\mu$ g CaM	A.E.	% PI	Aumento en A.E.	%RC
Parásito compl.	Sonicado	589,4	158,1	0,268	100	-	-
Sonicación	Sobrenad.	411,6	19,46	0,047	69,83	0,17	12,31
NH4	Sobrenad.	161	595	3,69	27,31	78,51	3000
Diálisis	Sob. NH4	135,7	273,5	2,01	23,02	0,54	46
CII (NaCl 150mM)	29	8,14	4,6	0,56		0,27	
	30	3,41	8,4	2,46		1,22	
	31	1,43	4,6	3,21		1,59	
	32	0,99	1,87	1,88		0,93	
	Totales	13,97	19,47	1,39	2,3	0,69	7,11
CIH (-NaCl)	PS(41)	0,022	17	772,72	0,003	555,9	87,31

PT Proteína total

A.E. actividad específica ( $\mu$ g CaM/mg proteína)

% PI porcentaje de la proteína inicial

% RC porcentaje de CaM recuperada con respecto al paso anterior

La cromatografía por interacción hidrofóbica fue aplicada a la mezcla II(150) de las cuatro fracciones obtenidas después de la primera cromatografía de intercambio iónico, que fueron positivas para CaM. Con la columna de Fenil Superosa se logró la separación de cuatro fracciones positivas para CaM (ver figura 3); la primera PS(41) fue eluída simplemente disminuyendo la fuerza iónica en el sistema, mostró la actividad específica mayor. Las tres fracciones restantes PS(59), PS(68) y PS(79) fueron eluídas empleando EGTA.

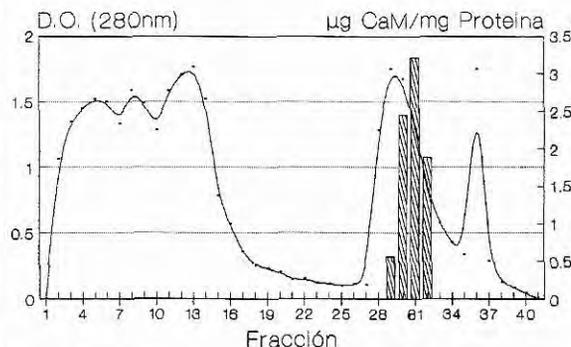
En la fracción PS(41) se recuperó el 0.15% de la proteína total y el 87.31% de la CaM de la muestra cargada a la columna y se logró un nivel de pureza 556 veces el logrado con la columna de intercambio iónico. En las fracciones eluídas con EGTA se recuperó el 0.9% de la proteína total y el 6.11% de la CaM.

Con el procedimiento completo de purificación se obtuvo aproximadamente un 70% de CaM con respecto a la proteína total y se recuperó de la CaM detectada en el parásito completo, el 12.3% hasta la cromatografía de intercambio iónico y el 10.75% hasta la cromatografía por interacción hidrofóbica (ver tabla 1). Por otro lado, aparentemente después de la sonicación hubo pérdida de una parte de la CaM total inicial, cuya actividad no se pudo detectar en el precipitado correspondiente a la fracción particulada del parásito.

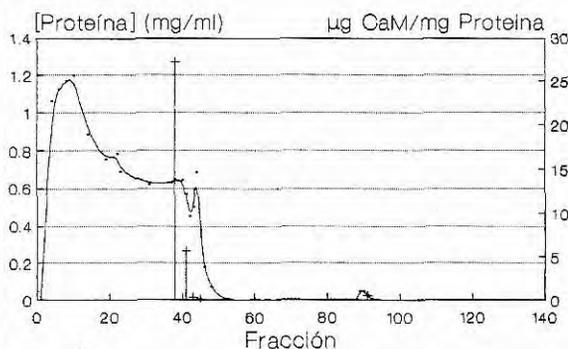
### Caracterización física parcial

La determinación del peso molecular por Western blot se realizó sobre las muestras que presentaron actividad de CaM de acuerdo con el ensayo de actividad de la ATPasa de calcio: II(150), PS(41) e II(38) (figura 4).

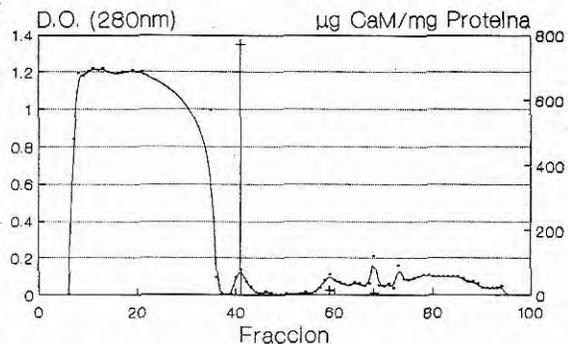
El peso molecular promedio fue calculado a partir de las migraciones relativas de la banda reconocida por el anticuerpo contra CaM en cuatro electroforesis independientes empleando la muestra PS(41) en ausencia de calcio y la muestra II(150) en presencia y ausencia del ion. Se encontró una valor de peso molecular de  $12.564 \pm 605.59$  dalton en el caso de la banda más conspicua reconocida por los anticuerpos.



**Figura 1.** Perfil cromatográfico del sobrenadante dialisado de la precipitación con sulfato de amonio en DEAE-Sepharosa CL 6B. Fracciones separadas con NaCl 50mM : 1 -25. Fracciones separadas con NaCl 150mM : 26 - 34. Fracciones separadas con NaCl 600mM : 35 - 38. Las barras corresponden a actividad de CaM.



**Figura 2.** Perfil cromatográfico del sobrenadante dialisado obtenido después de sonicación del último grupo de parásitos. Cromatografía en DEAE-Sepharosa CL 6B. Elución con gradiente continuo empleando NaCl 0 - 600mM. Las barras señalan actividad de CaM. Se recuperó el 23% (74.37µg) de la cantidad esperada de CaM.



**Figura 3.** Perfil cromatográfico de la muestra II(150) en Fenil superosa. Fracciones separadas con  $\text{CaCl}_2$  0.1mM más NaCl 0.5M : 23 -32. Fracciones separadas con  $\text{CaCl}_2$  0.1mM : 33 - 54. Fracciones separadas con EGTA 2mM : 55 - 85. Las barras señalan actividad de CaM.

En la muestra PS(41) de la cromatografía en Fenil Superosa, además de la banda de 12.600 dalton, el anticuerpo reconoció una banda en la zona peso molecular de 43.000 dalton. En la muestra II(38) de la última cromatografía en DEAE-Sepharosa, el anticuerpo reconoció tres bandas en la zona de pesos moleculares entre 36.000 y 57.000 dalton.

Se presentó migración electroforética, de la banda de 12.600 dalton de *Plasmodium falciparum*, aparentemente independiente de la presencia de calcio, en tres electroforesis diferentes, en las que los controles correspondientes a CaM de testículo bovino y CaM de eritrocito migraron de manera adelantada en presencia de éste ion (figura 4).

**Caracterización funcional de la proteína parcialmente purificada de *Plasmodium falciparum***

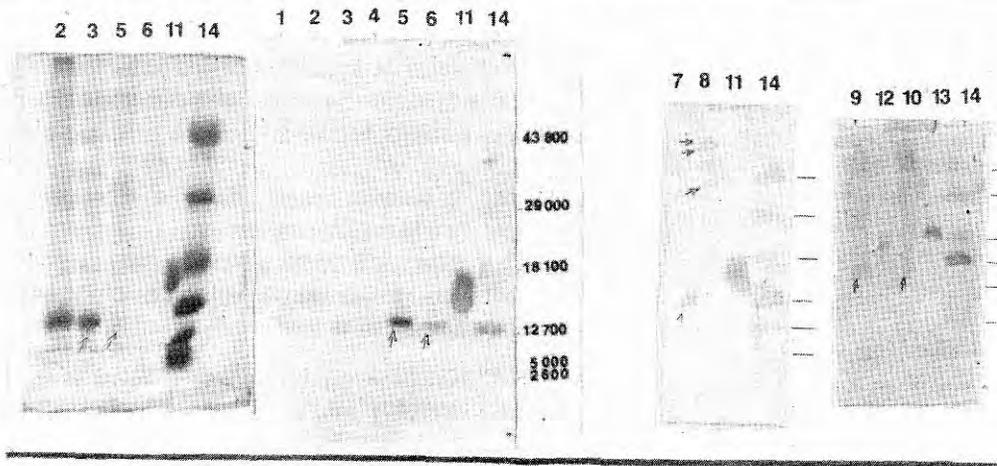
Los ensayos empleando el sistema estandarizado para la ATPasa de calcio segun Tinjaca y Wasserman (9), permitieron establecer que la proteína con actividad de CaM de las fracciones II(150) separada por cromatografía en DEAE-Sepharosa y PS(41) separada por cromatografía

en Fenil Superosa es capaz de estimular la actividad de la enzima con respecto a la actividad dependiente exclusivamente de calcio 2.28 y 3.88 veces respectivamente (figura 5). La actividad de la enzima en presencia de II(150) fue de 0.8 micromoles de fosfato por miligramo de proteína de membrana por hora, mientras que en presencia de PS(41) fue de 1.36 micromoles de fosfato por miligramo de proteína por hora.

El comportamiento de la CaM de *Plasmodium falciparum* y de la CaM de eritrocito frente a los inhibidores W-7 y Calmidazolium (CdZ) se presenta en las figuras 6 y 7. En ellas se observa que en presencia de ambos inhibidores la CaM

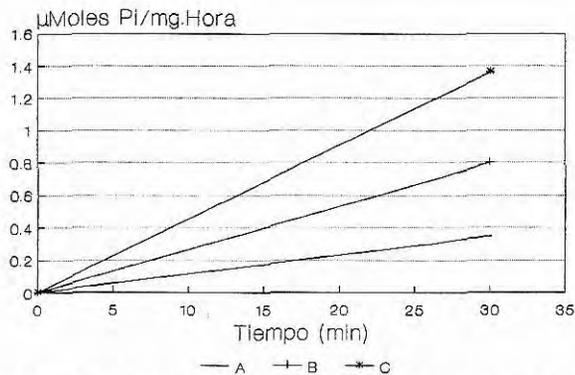
**Tabla 2.** IC<sub>50</sub> (µM) interpolados en la gráfica de porcentaje de actividad contra concentración de inhibidor.  
IC<sub>50</sub>: Concentración a la cual se inhibe el 50% de la actividad de la enzima en presencia de CaM.

Fuente de CaM	W-7 (IC50)	CdZ (IC50)
Eritrocito	200	20
<i>Plasmodium falciparum</i>	262,5	>100

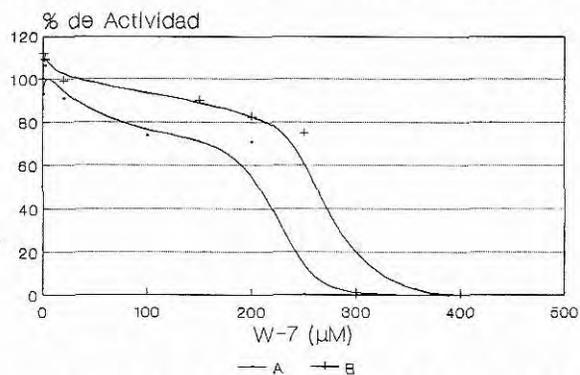


**Figura 4.** Patrones electroforéticos y electrotransferencias de las fracciones II(150), PS(41) e II(38). Localización de la banda de CaM con anticuerpos.

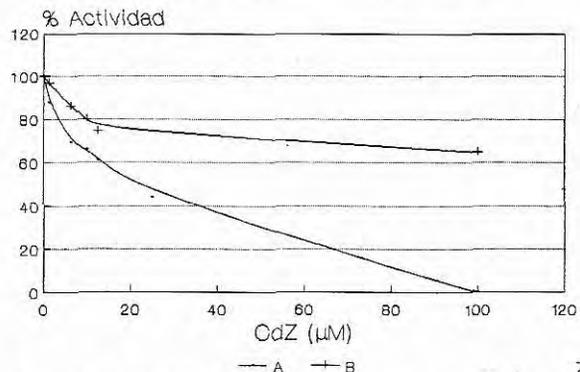
- 1 Parásito completo
- 2 Sobrenadante de sonicación
- 3 Sobrenadante de la precipitación con sulfato de Amonio
- 4 el mismo dialisado
- 5 II(30)
- 6 PS(41)
- 7 II(150)
- 8 II(38)
- 9 II(150) + calcio
- 10 II(150) + EGTA
- 11 Cam Testículo bovino
- 12 CaM eritrocito + calcio
- 13 CaM eritrocito + EGTA
- 14 patrones de peso molecular preteñidos.



**Figura 5.** 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).



**Figura 6:** Efecto del inhibidor W-7 sobre la actividad de la ATPasa de calcio del eritrocito. A En presencia de CaM de eritrocito. B En presencia de CaM de *Plasmodium falciparum*. Promedios de los datos de tres ensayos (DE (%)) = (A) 4.73 y (B) 6.6, n = 3).



**Figura 7.** Efecto del inhibidor CdZ sobre la actividad de la ATPasa de calcio del eritrocito. A En presencia de CaM de eritrocito. B En presencia de CaM de *Plasmodium falciparum*. Promedio de los datos de tres ensayos (DE (%)) = (A) 6.26 y (B) 5.76, n = 3).

de *Plasmodium falciparum* es menos inhibida que la de eritrocito. Los  $IC_{50}$  determinados por interpolación directa en las gráficas de comportamiento frente al aumento de la concentración de inhibidor aparecen en la tabla 2.

A partir de los valores  $IC_{50}$  de ambos inhibidores se pudo establecer, que aparentemente el CdZ es mejor inhibidor de la CaM de eritrocito que el W-7; lo que no se pudo saber en el caso de *Plasmodium falciparum* teniendo en cuenta que el  $IC_{50}$  para CdZ no se determinó con exactitud.

### Discusión

En éste trabajo de caracterización inicial de la CaM de *Plasmodium falciparum* se presentan evidencias inmunológicas, bioquímicas y farmacológicas que identifican a la proteína parcialmente purificada como CaM, conjuntamente con hallazgos que sugieren una modificación estructural de la CaM de *Plasmodium falciparum*, que sin embargo no altera su función moduladora de la ATPasa de calcio.

En primer lugar, de acuerdo con el ensayo de actividad de CaM en función de la ATPasa de calcio, en el parásito completo solo se detecta un 2.46% de la cantidad esperada de la proteína, calculada de acuerdo con los estudios empleando anticuerpos contra CaM descritos por Scheibel y colaboradores (4); éste valor podría estar asociado a: 1. su inactivación natural por el parásito, 2. su degradación durante el procedimiento previo a la ruptura mecánica de las membranas o 3. la diferencia de los sistemas de medición, el de ellos con anticuerpos y el nuestro por actividad bioquímica.

Durante la cromatografía de intercambio iónico, se presenta disminución en la afinidad de la forma mejor representada de la proteína que podría estar asociada a la modificación de su carga negativa a pH neutral, que por otro lado no la inactiva en su función estimuladora de la ATPasa de calcio del eritrocito; dando pie a pensar en que se trata de un estado natural de la proteína en el parásito.

A su vez la disminución en la carga negativa de la proteína podría ser responsable del cambio en la

afinidad de la misma por el calcio, lo que explicaría en parte: 1. la necesidad del aumento en la fuerza iónica para lograr la interacción del complejo proteína calcio con la matriz de fenil supe-rosa, 2. su débil interacción con la misma matriz, en condiciones en las que la CaM purificada a partir de otras fuentes presenta mayor afinidad, haciendo indispensable el uso de EGTA para su elución (10,11) y 3. su movilidad electroforética aparentemente independiente de calcio.

El empleo de anticuerpos comerciales desar-rollados contra CaM de *Dyctiostelium discoi-deum* hace posible localizar cuatro formas dife-rentes de CaM en *Plasmodium falciparum*, en las zonas de pesos moleculares entre 12 a 13 y 36 a 50 kilodaltons. La forma de mas bajo peso mo-lecular (12.600 dalton) parece ser la mas estable, teniendo en cuenta que corresponde a la banda mejor representada, reconocida por los anti-cuerpos. Se requieren condiciones de fuerza ióni-ca diferentes para su separación de las tres restantes por cromatografía de intercambio iónico, lo que da lugar a pensar en diferencias de carga, además de las diferencias en tamaño. Una vez llevada a cabo la separación cromatográfica es posible observar actividad moduladora de la ATPasa de calcio en presencia de las formas de mayor peso molecular independientemente de la forma de 12.600 dalton.

El peso molecular de la banda de menor tamaño (12.600), así como los pesos de las bandas de la zona entre 36.000 y 50.000 dalton resultan ser diferentes tanto al peso molecular de la CaM deducido de la secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la secuencia del gen encontrado por Robson (5), como al peso molecular de la CaM de *Plasmodium falciparum* observado luego de la expresión del gen de CaM en bacterias (7) y al peso molecular de la CaM de otros orígenes (13,14,15).

Estos resultados, que se presentan en favor de una proteólisis parcial de la CaM de *Plasmodium falciparum* a partir de las formas de tamaño mayor aparente, hacen posible proponer que la proteína sea modificada por el parásito en condiciones naturales, ocasionando el comportamiento elec-

troforetico aparentemente independiente del calcio de la banda de 12.600 dalton de *Plasmodium falciparum*.

Por otro lado, con la CaM de *Plasmodium falci-parum*, en las condiciones del ensayo de actividad de la ATPasa de calcio, se logra estimu-lar la enzima al 54% y 90% de la actividad máxima detectada en presencia de CaM de eritrocito y testículo bovino, con lo que se confirma la iden-tidad funcional de la proteína parcialmente puri-ficada de *Plasmodium falciparum*.

Lo anterior se ve reforzado por el comportamiento frente al uso de inhibidores de CaM. Los ensayos en presencia de Calmidazolium (CdZ) y W-7 revelan que aparentemente la CaM de eritrocito es mejor inhibida por los inhibidores específicos de CaM, que la CaM de *Plasmodium falciparum* parcialmente purificada; lo que permite plantear la posibilidad de que la CaM de *Plasmodium falciparum* presente diferencias estructurales con respecto a la CaM de eritrocito, que hacen que su afinidad por los inhibidores específicos de CaM, CdZ y W-7, sea menor. En éste caso, se podría pensar que la calmodulina del parásito no consti-tuye un blanco ideal para diseño de agentes quimioterapéuticos contra la Malaria, o que por lo menos éstos dos inhibidores no constituyen can-didatos ideales para su uso como agentes anti-maláricos.

## Referencias

1. **Scheibel LW, Colombani PM, Hess AD, Aikawa M, Atkinson CT y Milhous WT.** Ca<sup>2+</sup> and Calmodulin antago-nists inhibit human malaria parasites (*P. falciparum*): Impli-cations for drug design. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:7310-7314
2. **Tanabe K, Isumo A, Kato M, Miki A y Doi S.** Stage depen-dent inhibition of *P. falciparum* by potent Ca<sup>2+</sup> and Calmodulin modulators. J Protozool 1989;36(2):139-143
3. **Matsumoto Y, Perry G, Scheibel LW y Aikawa M.** Role os Calmodulin in *P. falciparum* : Implications for erythro-cyte invasion by the merozoite. Eur J Cell Biol 45:36-43
4. **Scheibel W, Colombani PM y col.** Ca<sup>2+</sup>/Cam Functions in *P. falciparum* in vitro - implications for antiprotozoal drug design. Chap. 2 In: Progress in clinical Parasitology. Vol 1 (Ed.Sun T) Field and Wood, New York, 21 - 56 (1989)
5. **Robson KJH y Jennings MW.** Structure of the Calmodulin gen of *P. falciparum*. Mol Biochem Parasitol 1991;46:19-34

6. **Bannister LH y Dluzewsky AR.** The ultrastructure of red cell invasion in malaria infections: A review. *Blood cells* 16:257-292 (1990)
7. **Cowman AF y Galatis DG.** *Plasmodium falciparum*: The Calmodulin gene is not amplified or overexpressed in Chloroquine resistant or sensitive isolates. *Exp Parasitol* 1991;73:269-275
8. **Trager W y Jansen JE.** Human malarial parasites in continuous culture. *Science* 193:673-675 (1976)
9. **Tinjacá CP y Wasserman M.** Estandarización de un ensayo de actividad para la ATPasa de Calcio del eritrocito. En impresión.
10. **Lukas TJ y Watterson DM.** purification of Calmodulin and preparation of immobilized Calmodulin. En: *Methods in Enzimology*. Vol 157: Biomembranes. Fleischer y Fleisher Eds Acad Press Inc San Diego California pp 1988;328-340
11. **Guerini D y Krebs J.** Separation of various Calmodulin triptic fragments and different homologous Ca<sup>2+</sup> binding proteins by reverse phase, hydrophobic interaction and ion exchange high performance liquid chromatography techniques. *Anal Biochem* 1985;150:178-187
12. **Cohen P y Klee CB.** Calmodulin. En: *Molecular aspects of cellular regulation*. Vol 5. Elsevier Science Publishers BV (Biomedical division). Amsterdam (1988)
13. **Jarret HW y Penniston JT.** Purification of the Calcium stimulated ATPase activator from human erythrocytes. *J Biol Chem* 1978;253 (13):4676-4682
14. **Cheung WY.** Calmodulin : An introduction. *Calcium and cell function*, Vol I Academic Press Inc Pp 1980;1-40
15. **Brostrom ChO y Wolf DJ.** Properties and functions of Calmodulin. *Biochem. Pharmacol* 30(12):1395-1405 (1981)
16. **Kobayashi K y col.** Monoclonal antibodies toward Scallop (*Patinopecten yessoensis*) testis and wheat Calmodulins. *J Biochem* 1991;109: 551-558