

03062



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UACyP DEL CCH

EFFECTO DE COMPUESTOS ANFIFILICOS SOBRE
LA H^+ -ATPase DE LA MEMBRANA PLASMATICA
DE Saccharomyces cerevisiae

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A ;
HIRAM OLIVERA DIAZ

MEXICO. D. F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
1 Las membranas biológicas.....	1
1.1 Los lípidos de las membranas.....	1
Fluidez de la bicapa.....	4
Carga eléctrica de superficie.....	4
1.2 Las proteínas de la membrana.....	5
1.3 Los carbohidratos de la membrana... ..	5
2 Transporte a través de la membrana.....	6
2.1 Transporte activo y pasivo.....	6
2.2 Translocadores primarios y secundarios.....	6
2.3 ATPasas.....	8
3 La ATPasa de la membrana plasmática de la levadura.....	9
3.1 Bioquímica de la ATPasa.....	10
Mecanismo de reacción y ciclo catalítico.....	11
pH óptimo.....	12
Especificidad y afinidad por el sustrato.....	13
Efecto de los cationes metálicos.....	13
Cationes Divalentes.....	13
Cationes Monovalentes.....	14
Inhibidores de la ATPasa.....	14
4 Uso de compuestos hidrofóbicos en el estudio de los sistemas de membrana.....	15
5 Objetivos.....	16
Purificación de la ATPasa.....	16
Efecto de compuestos hidrofóbicos sobre la ATPasa.....	16
II MATERIALES Y METODOS.....	17
Material Utilizado.....	17
1 Activación de las levaduras.....	17
2 Aislamiento de la membrana plasmática.....	17
3 Purificación de la ATPasa.....	20
3.1 Método de Foury y cols (1981).....	20
3.2 Método de Malpartida y Serrano (1981B).....	20
3.3 Cromatografía en Sefarosa-hexilamina.....	21
3.4 Preparación utilizada.....	22
4 Determinaciones de actividad....	22
4.1 Método colorimétrico.....	22
4.2 Oxidación de NADH.....	23
4.3 Liberación de 32P Pi.....	23
5 Determinaciones de proteína.....	24

6 Cálculo de las concentraciones de metales, ligandos y complejos metal-ligando en las soluciones.....24

7 Constantes de disociación de metales y ligandos.....25

8 Análisis cinéticos.....25

9. Absorción Atómica.....25

10. Electroforesis.....25

III RESULTADOS..... 27

1 Purificación de la H⁺-ATPasa....27

1.1 Uso de la columna de sefarsa-aminoxil..... 27

Opciones de elución para la columna..... 28

1.2 Uso de inhibidores de proteasas..... 30

1.3 Uso de una columna de sefadex G4030

1.4 Preparación utilizada..... 30

Estabilidad de la preparación..... 32

2 Inhibición por cationes lipofílicos.....32

2.1 Importancia de la preparación utilizada..... 32

2.2 Estudios cinéticos..... 32

2.3 Reversión de la inhibición por solventes orgánicos..... 39

3 Efecto de la carga eléctrica.....41

4 Al Bajar el pH del medio de reacción la inhibición fue menor...43

5 Relación con los cationes inorgánicos.....44

6 Efecto de diferentes fosfolípidos en la ATPasa45

IV DISCUSION..... 47

1 Preparación utilizada.....47

Uso de la levadura de panadería.....47

Purificación de la ATPasa.....47

2 Características necesarias para que una molécula lipofílica se comporte como activador o inhibidor de la H⁺-ATPasa..... 48

2.1 Papel de la hidropatía de los compuestos.....48

2.3 Papel de la carga eléctrica.....49

2.4 Papel de la estructura de la región polar.....49

3 Posibles interacciones entre las moléculas lipofílicas y la H⁺ ATPasa..... 49

3.1 Competencia con los cationes inorgánicos..... 50

3.2 Competencia con el protón por el sitio de transporte.....51

3.3 Bloqueo del sitio activo..... 51

3.4 Interacción con múltiples sitios inespecíficos..... 52

3.5 Alteración de las interacciones proteína-fosfolípidos..... 52

4. Perspectivas..... 53

4.1 Sobre la purificación	53
4.2 Sobre las interacciones de los compuestos anfilílicos con la ATPasa.....	53

V CONCLUSIONES.....	55
----------------------------	-----------

VI. BIBLIOGRAFIA	56
-------------------------------	-----------

I. INTRODUCCION

Las levaduras se encuentran entre los microorganismos eucariontes más estudiados desde los puntos de vista genético y bioquímico (Rose, 1987). En este trabajo analizamos las interacciones de una de las enzimas más importantes de la membrana plasmática de las levaduras, la H^+ -ATPasa, con una serie de compuestos anfífilicos, de diferente carga eléctrica, tamaño y grado de lipofiliidad, y trataremos de explicar los resultados en función de lo que se conoce actualmente sobre otras enzimas y sistemas de membrana. Hemos dividido la introducción en 5 partes. En la primera se describen las membranas biológicas. En la segunda se analiza una de sus funciones más importantes, el transporte; en la tercera se revisa la información existente sobre la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de la levadura; en la cuarta se revisa el uso de los compuestos hidrofóbicos para estudiar los sistemas de membrana; y finalmente se enumeran los objetivos del presente trabajo.

1 Las membranas biológicas.

Las membranas lipídicas son uno de los principales elementos estructurales de todas las células vivas, se encuentran presentes a todo lo largo de la escala evolutiva, desde los más sencillos organismos unicelulares hasta las más complejas células eucariontes. La existencia de membranas y la formación espontánea de vesículas constituyen uno de los puntos más importantes en las teorías

sobre la evolución temprana de la vida (Montal, 1974). La vida celular sería imposible sin la existencia de las membranas, y éstas están involucradas en funciones que van desde la simple separación de compartimentos hasta ser el soporte para las complejas reacciones de conversión de energía en mitocondrias y cloroplastos.

La estructura general de las membranas biológicas es un empaquetado de lípidos y proteínas unidos por interacciones hidrofóbicas. De acuerdo con el modelo más aceptado de la estructura de las membranas (Singer, 1972) (fig 1A), las proteínas se encuentran embebidas en una bicapa fluida formada por las moléculas de lípidos. Además algunas membranas contienen también polisacáridos que están unidos covalentemente a las proteínas o a los fosfolípidos. Las fuerzas que mantienen unida esta estructura son principalmente interacciones hidrofóbicas.

1.1 Los lípidos de las membranas.

La estructura esquemática de un lípido se puede ver en la figura 1B, donde se destaca la naturaleza anfífilica de estas moléculas, que tienen una cabeza polar hidrofílica, y una cola no polar hidrofóbica. En la membrana los lípidos se orientan de manera que las cabezas polares están en contacto con el agua mientras las colas apolares se orientan hacia el centro de la bicapa creándose una zona altamente hidrofóbica (fig 1A).

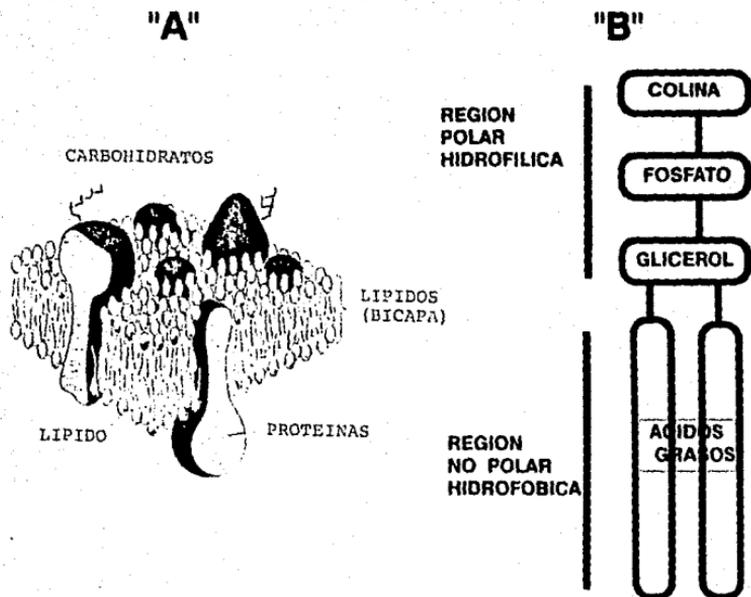


Figura 1. Modelo de una membrana biológica (A) y esquema de un fosfolípido (B). "A" tomada de Alberts (1983).

Los tres tipos principales de lípidos en las biomembranas son: fosfolípidos, colesterol y glicolípidos (Stein, 1986); de estos, los más abundantes son los fosfolípidos. En la figura 2 se muestran varias clases de fosfolípidos, que se diferencian porque tienen diferentes cabezas polares. Además, dentro de una misma clase de fosfolípidos, los ácidos grasos pueden ser de

diferentes longitudes -normalmente entre 14 y 24 átomos de carbono- y tener insaturaciones en diferentes posiciones (Alberts, 1983).

Las membranas biológicas no están constituidas por un solo tipo de fosfolípido sino de mezclas, lo que les confiere propiedades específicas. Y se piensa que las proteínas pueden interactuar selectivamente

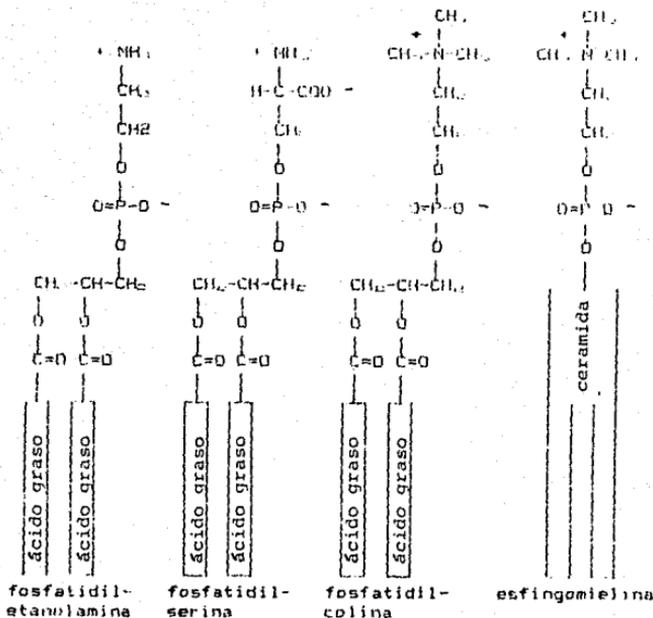


Figura 2. Fosfolípidos más usualmente encontrados en las membranas biológicas.

con los diferentes lípidos que forman la mezcla (Marsh, 1987).

Finalmente los diferentes fosfolípidos suelen encontrarse en diferentes proporciones en cada cara de la bicapa, por ejemplo en la membrana del eritrocito alrededor de un 70% de la fosfatidilcolina y un 80% de la esfingomieline que constituyen la bicapa se encuentran en la monocapa exter-

na mientras que solo un 20% de la fosfatidiletanolamina se localizan en esa monocapa. Por lo que se dice que las membranas biológicas son **asimétricas** (Rothman y Lenard, 1977).

Entre las propiedades de las membranas más afectadas por la composición lipídica encontramos la fluidez y la carga eléctrica de superficie. A continuación

discutiremos la manera en que las características de los fosfolípidos afectan estas propiedades de las membranas.

1.1.1 Fluidez de la bicapa.

Una de las propiedades más importantes de las membranas es su fluidez; es decir, la libertad que tienen sus componentes de rotar o difundir lateralmente. Podemos ver las membranas como un fluido bidimensional donde los diversos componentes se encuentran flotando más o menos libremente en el plano lateral, pero no en el transversal. Esta visión tiene ciertas restricciones como veremos a continuación. La primera es que las membranas tienen lo que se llama un punto de transición de fase en el cual, al bajarse la temperatura pasan del estado líquido a un estado cristalino en el que la movilidad se pierde. La temperatura a la cual ocurre esta transición de fase es altamente dependiente de los lípidos que integran la membrana; es más baja (las membranas permanecen líquidas a menor temperatura) cuando las cadenas de ácidos grasos son más cortas o tienen insaturaciones en *cis*.

Otro factor que afecta la fluidez de las membranas es la presencia de colesterol o lípidos parecidos. Estos tienen una estructura plana que reduce el movimiento de los lípidos vecinos, disminuyendo la fluidez y aumentando la resistencia mecánica de la bicapa. Además, la presencia de estos lípidos hace menos brusca la transición de fase de las membranas biológicas.

El control de la fluidez de la membrana parece ser relevante; puesto que se ha comprobado que los organismos unicelulares modifican la composición de sus membranas

cuando se ven expuestos a cambios de temperatura de manera que mantienen la fluidez casi constante.

Finalmente, en los eucariontes, el citoesqueleto parece participar en la regulación de la difusión lateral de las proteínas de la membrana (Malhotra, 1983).

1.1.2 Carga eléctrica de superficie.

La mayor parte de los lípidos que constituyen las membranas son zwitteriónicos o son ácidos, lo cual da carga eléctrica a la superficie de las membranas. Para cada membrana la carga depende del tipo y proporción de los lípidos que la constituyen. Por ejemplo, membranas con una alta concentración de fosfatidilserina tendrán una carga muy negativa, y membranas con altas proporciones de lípidos neutros van a tener densidades de carga muy pequeñas.

Dos tipos de estudios han indicado la importancia de la carga de superficie en la función de las membranas:

Los primeros son estudios de reconstitución, en los cuales se han aislado enzimas de membrana, que luego se reincorporan en membranas lipídicas de composición definida. Así se ha encontrado que la actividad de algunas enzimas aumenta o disminuye dependiendo de la carga de los lípidos con los que se ha formado la bicapa (Eytan, 1978; Carafoli, 1988).

Los otros son estudios que indican que la concentración de moléculas con carga eléctrica en la vecindad de la membrana, es diferente a la que existe en el resto del medio (Borst-Pauwels, 1981). Según estos estudios la concentración de un catión metálico monovalente es varias veces mayor en las regiones inmediatas a la superficie de la

bicapa (Gage y cols., 1985). Dado que muchas de las moléculas transportadas a través de las membranas biológicas poseen carga eléctrica a pH fisiológico, es de esperarse que el transporte de estos compuestos esté influenciado por la carga eléctrica de los lípidos.

1.2 Las proteínas de la membrana.

Las funciones específicas de cada membrana son llevadas a cabo principalmente por las proteínas. Estas constituyen en promedio alrededor del 50% de la masa de una membrana, aunque esa proporción varía dependiendo de la función de esta última.

Las proteínas de membrana se han clasificado de acuerdo a la facilidad con que pueden ser extraídas de la membrana. Si solamente pueden extraerse con detergentes que rompen la estructura de la bicapa se les llama integrales. Si pueden extraerse con métodos más suaves como tratamientos con soluciones salinas, se les llama periféricas. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que esta clasificación es operacional y no se refiere a la forma como están ancladas a la membrana. Cuando se sabe con certeza que una proteína tiene regiones que atraviesan la membrana se le denomina **proteína transmembranal**.

Las regiones de una proteína que atraviesan la membrana deben formar estructuras de alfa-hélice o beta-plegada, que reducen al mínimo las interacciones de los sitios polares de los aminoácidos con el medio hidrofóbico de la bicapa y que maximizan la formación de puentes de hidrógeno internos. Se han desarrollado métodos computacionales para predecir la posición de estas regiones cuando se conoce la secuen-

cia de aminoácidos de la proteína (Chou y Fasman, 1978), aunque la exactitud de tales predicciones está entre el 65 y el 80 por ciento (Fasman, 1989).

Para aislar estas proteínas se requiere romper la estructura de la bicapa, para lo que habitualmente se utilizan detergentes. El uso de detergentes para solubilizar proteínas membranales es un campo donde se realiza una gran cantidad de trabajo porque, aunque cualquier detergente puede romper la membrana y solubilizar las proteínas que en ella se encuentren, las posibilidades de que las proteínas solubilizadas conserven una configuración semejante a la que tenían en su ambiente nativo y retengan su actividad, son pequeñas. Hasta la fecha la elección de un detergente y las condiciones adecuadas para aislar una enzima de membrana en una configuración activa sigue realizándose en forma bastante empírica (Neugebauer, 1987).

1.3 Los carbohidratos de la membrana.

La membrana plasmática de las células eucariontes contiene también carbohidratos. Estos suelen ser oligosacáridos unidos covalentemente a los lípidos y proteínas de la membrana, y solamente se encuentran en la cara externa. Se sospecha que estos carbohidratos están implicados en el reconocimiento celular; sin embargo, los datos en este sentido todavía no son concluyentes (Lis y Sharon, 1986).

2 Transporte a través de la membrana.

Las membranas lipídicas permiten el libre paso al agua y a pequeñas moléculas no polares, mientras que son prácticamente impermeables al paso de moléculas polares. Estas características permiten la creación de compartimentos con diferentes concentraciones de solutos, pero también impiden el paso de nutrientes y la eliminación de productos de desecho. Por esta razón, las células han desarrollado complejos sistemas de transporte que les permiten controlar el movimiento de una gran cantidad de sustancias a través de sus membranas. Estos sistemas cumplen las siguientes funciones:

1. Regular el volumen celular -en el caso de las células vegetales y los hongos, la presión de turgencia-, el pH y la composición iónica para mantener un ambiente favorable a los procesos enzimáticos.
2. Tomar del medio y concentrar en el interior de la célula los metabolitos necesarios.
3. Expulsar de la célula los productos de desecho y sustancias tóxicas.

Estos procesos pueden tener lugar en forma activa o pasiva como veremos a continuación.

2.1 Transporte activo y pasivo.

El transporte de un compuesto a través de una membrana se considera activo o pasivo dependiendo del cambio de energía libre durante el proceso.

Para un soluto no cargado que se va a transportar del compartimento 1 donde está

presente a la concentración c_1 hacia el compartimento 2, esta energía libre se representa de la siguiente forma

$$\Delta G = RT \log_e \frac{C_2}{C_1} = 2.303 \log_{10} \frac{C_2}{C_1} \quad (1)$$

donde R es la constante de los gases y T es la temp. en grados Kelvin.

Cuando la molécula transportada tiene además carga eléctrica, es necesario considerar también el potencial eléctrico a través de la membrana. A la suma de ambos componentes (químico y eléctrico) se le denomina potencial electroquímico y la energía libre se representa entonces como

$$\Delta G = RT \log_e \frac{C_2}{C_1} + ZF \Delta V \quad (2)$$

donde Z es la carga eléctrica de la molécula y F es la constante de Faraday.

El transporte es pasivo cuando ΔG es negativo y tiene que ser activo si ΔG es positivo. Para una revisión más completa ver a Stein (1986) y Harold (1986).

2.2 Translocadores primarios y secundarios.

A las proteínas que llevan a cabo funciones de transporte se les denomina acarreadores o translocadores. Cuando las moléculas se transportan contra gradientes de concentración, los acarreadores se consideran activos y se han dividido, de acuerdo con la energía que utilizan, en primarios y secundarios.

Los primarios utilizan directamente distintas formas de energía contenida en la luz,

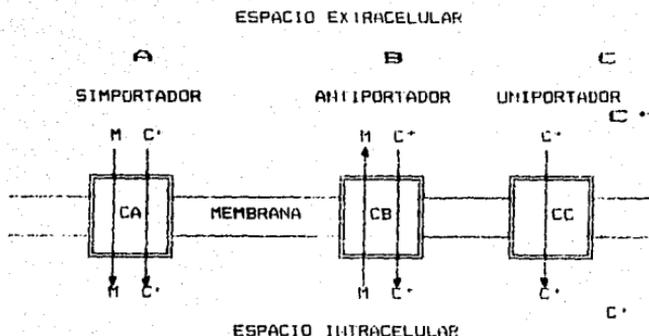


Figura 3. Diferentes tipos de translocadores. M es la molécula transportada y C^+ es el catión que forma el gradiente, CA es el acarreador que funciona como simportador, CB es el acarreador que funciona como antiportador y CC el que funciona como uniportador.

enlaces químicos o coeficientes redox, para generar gradientes a través de la membrana. Estos translocadores generalmente transportan cationes inorgánicos generando gradientes electroquímicos. La energía contenida en estos gradientes se describe con la ecuación (1).

Los translocadores secundarios transportan todas las demás moléculas que

la célula requiere, utilizando la energía contenida en gradientes. Generalmente utilizan mecanismos de simportador, antiportador o uniportador. Son simportadores cuando la molécula transportada y la que forma el gradiente se transportan en el mismo sentido (fig 3A), antiportadores cuando se mueven en sentidos contrarios (fig 3B) y uniportadores cuando únicamente transportan una

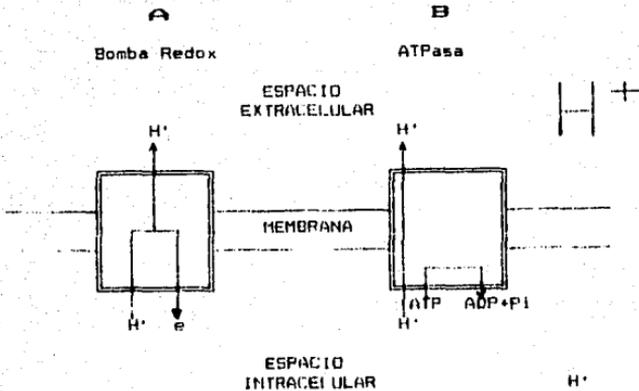


Figura 4. Tipos de translocadores primarios.
 A. Bomba Redox.
 B. ATPasa.

molécula a favor de su propio gradiente de concentración.

2.3 ATPasas

Las células utilizan diversas fuentes de energía para sus translocadores primarios. En unos casos utilizan la energía que proviene de reacciones de oxido-reducción; como la citocromo oxidasa de la mitocondria

y del centro de reacción de los organismos fotosintéticos (fig. 4A). En otros utiliza la energía almacenada en las moléculas de ATP (fig. 4B), este es el caso de las ATPasas de membrana, que se han clasificado en tres tipos.

Las ATPasas tipo F son dependientes de Mg^{2+} y están compuestas de al menos 6 tipos diferentes de polipéptidos organizados

en 2 sectores: el sector F_1 que sobresale de la membrana y se puede separar de ésta por métodos físicos, es la parte que hidroliza el ATP; y el F_0 o sector hidrofóbico, que está integrado a la membrana y tiene la capacidad de translocar protones.

Este tipo de enzimas no forma intermediarios fosforilados durante la hidrólisis del ATP, y su función es sintetizar ATP utilizando el gradiente de protones generado en la respiración o la fotosíntesis, por lo que también se les conoce como ATP-sintetasas.

Las ATPasas tipo **P** también son dependientes de Mg^{2+} , pero se pueden estimular con otros cationes. Estas enzimas tienen una sola subunidad que pesa alrededor de 100,000 daltones, forman un intermediario fosforilado inestable durante la hidrólisis, y están involucradas en la translocación de iones y el mantenimiento de gradientes de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y H^+ . Estas enzimas energizan las membranas a expensas de ATP. Este tipo de enzimas también es llamado en la literatura ATPasas $E_1 E_2$ debido a que muestran dos conformaciones diferentes durante su ciclo de reacción, sin embargo debido a que se ha demostrado que los otros tipos de ATPasas también presentan cambios conformacionales, se ha recomendado no utilizar esa clasificación.

Finalmente se clasifican como ATPasas tipo **V** a las que provienen de organelos diferentes de las mitocondrias cloroplastos o retículos. Esta clasificación es muy amplia por lo que incluye enzimas que pueden tener propiedades muy diferentes. Son las menos conocidas de las ATPasas, están compuestas de varios polipéptidos los dos mayores de ~115 y ~70 Kd y no se inhiben por vanadato ni por oligomicina (Pedersen y Carafoli, 1987).

3 La ATPasa de la membrana plasmática de la levadura.

Una de las características de las levaduras que más ha llamado la atención de los científicos desde finales del siglo pasado, es su capacidad de acidificar el medio en que se encuentran; sin embargo, es hasta mediados de este siglo que se empezaron a realizar estudios para entender las causas de este fenómeno.

En 1950 Conway y colaboradores confirmaron que durante la fermentación de la glucosa la levadura acidifica rápidamente el medio. Conway propuso que el responsable de ese bombeo de protones, podía ser un catalizador metálico redox localizado en la membrana plasmática del microorganismo, que expulsaría los protones al medio y donaría los electrones a algún aceptor intracelular (fig. 4A). Posteriormente Slayman & Slayman (1970) pudieron medir un intercambio H^+/K^+ y propusieron la existencia de un acarreador electroneuro basado en determinaciones de los flujos de Na^+ , K^+ y H^+ . Esta proposición tiene la desventaja de que no explica como se acopla la energía al proceso.

Por otro lado, Eddie and Idjge (1962) propusieron la existencia de una actividad de ATPasa en la membrana plasmática y trataron de medirla sin éxito. Esta actividad fue demostrada por primera vez por Matile y cols. (1967 y 1970), y posteriormente por Nurminen (1970 y 1976), Schibeci (1973) y Fuhrmann (1974).

Finalmente, la relación entre la actividad de ATPasa y el bombeo de protones fue

propuesta por Peña y cols (1972). Al estudiar los efectos del K^+ y el pH en la glucólisis y la respiración, observaron que al añadir potasio o aumentar el pH del medio de incubación se produce una disminución en las pozas de ATP y a un aumento en las de ADP y fosfato (Peña y cols, 1969 y 1972) que conllevan una aceleración de la glucólisis y la respiración (Peña y cols, 1967). A partir de esos datos se propuso que la hidrólisis de ATP observada era producto de una ATPasa anisotrópica semejante a la propuesta por Mitchel en 1961 para la mitocondria y que estaba acoplada a un mecanismo que expulsa protones al medio (fig. 4B).

La actividad de la ATPasa produce un descenso en el pH extracelular y genera un gradiente electroquímico a través de la membrana. Una vez formado el gradiente, la velocidad de hidrólisis de ATP se reduce debido a que ahora el sistema de expulsión de protones tiene que trabajar contra los dos componentes del gradiente; la diferencia de pH y el potencial eléctrico (Peña y cols, 1972). Este freno se puede compensar aumentando el pH del medio externo, lo cual colapsa el gradiente de pH, o adicionando KCl, el K^+ penetra en las células neutralizando el potencial eléctrico y permitiendo nuevamente a la ATPasa funcionar a su máxima capacidad.

Posteriormente se demostró que diferentes drogas que inhiben la actividad de la ATPasa *in vitro*, también inhiben el bombeo de protones *in vivo* (Serrano, 1980). Estos experimentos fueron realizados con cepas de levadura deficientes en su capacidad respiratoria para evitar artificios debidos a efectos de las drogas en la ATPasa mitocondrial.

Otros estudios han demostrado que el transporte de metabolitos como aminoácidos, azúcares y fosfato se lleva a cabo por cotransporte con protón (Cockburn, 1973, Seaston, 1973 y Rose, 1989). Esto indica la existencia de un mecanismo quimiosmótico de acoplamiento de energía semejante al propuesto por Mitchel (1961). En el caso de la levadura la energía generada por la hidrólisis del ATP, es empleada por la bomba para generar el gradiente, que posteriormente es utilizado por los acarreadores para transportar los diferentes metabolitos al interior de la célula.

3.1 Bioquímica de la ATPasa.

La H^+ -ATPasa ha sido objeto de numerosos estudios realizados por diferentes grupos, para una revisión ver a Serrano (1988). Se ha purificado a partir de difentes microorganismos como *Neurospora crassa* (Addison 1981), *Schizosaccharomyces pombe* (Dufour 1978 y 1988) y *Saccharomyces cerevisiae* (Malpartida 1979 y 1981, Foury 1981, Koland 1986 y Serrano 1988) aunque para esta última la purificación solo ha sido parcial. Se ha reconstituido en liposomas y su actividad como bomba electrogénica de protones dependiente de ATP ha sido demostrada (Malpartida, 1980; Dufour, 1982 A y B; Villalobo, 1981 y 1982, y Perlin, 1984); se han analizado sus propiedades como son la respuesta al pH, especificidad y afinidad de sustrato, efecto de cationes mono y divalentes y sensibilidad a diferentes inhibidores. Estos estudios se han realizado con la membrana completa y con la enzima purificada, y los resultados se han comparado con los obtenidos para las ATPasas de otros microorganismos y de

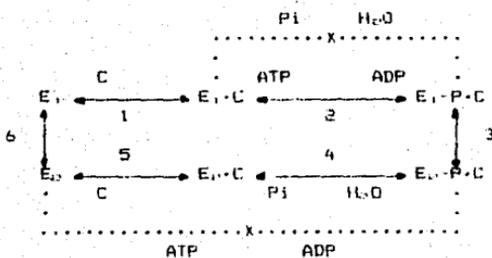


Figura 5. Ciclo catalítico de las ATPasas clase II. Las (X) son bloqueos cinéticos que obligan el acoplamiento del transporte del catione (C) con la hidrólisis de ATP (Tomada de Serrano, 1988).

otros organelos de la levadura (Peters y cols. 1979, Kakinuma y cols. 1981 y Uchida y cols. 1985).

El gene que codifica la enzima ha sido identificado (Ulaszewski y cols. 1987), clonado y secuenciado (Serrano y cols. 1986), y se ha expresado en bacterias para las que es letal (Holzer y Hammes, 1989).

A continuación se presenta un breve sumario de lo que se sabe sobre esta enzima.

Mecanismo de reacción y ciclo catalítico.

En la figura 5 se muestra el modelo actualmente más aceptado para el ciclo catalítico de las ATPasas tipo P. En el podemos ver los dos estados confor-

macionales E_1 y E_2 , y en el sentido de las manecillas del reloj, el ciclo de hidrólisis de ATP acoplado a la translocación del catión C de el lado de alta afinidad E_1 hacia el de baja E_2 . Este ciclo procede de la siguiente manera:

1. El ciclo comienza con la enzima en la conformación E_1 y en el paso 1 el catión C se une a su sitio de alta afinidad.
2. El ATP se une y se hidroliza a ADP y Pi. El ADP se libera y el fosfato permanece unido covalentemente a un aspártico conservado en todas las enzimas de este tipo que se han secuenciado.
3. En el paso 3 ocurre el cambio conformacional que pasa el catión C al sitio de baja afinidad al lado opuesto de la membrana quedando la enzima en el estado E_2 .
4. El enlace aspartil-fosfato se hidroliza y el fosfato se libera al medio.
5. El catión C se libera del sitio de baja afinidad.
6. La enzima retorna a la conformación E_1 .

Hay que notar dos cosas sobre el modelo presentado:

Primero, aunque se ha demostrado (teóricamente) que no es necesario que los dos estados conformacionales de un acarreador tengan diferentes afinidades para que exista transporte unidireccional (Tanford, 1983). Estudios cinéticos han demostrado que, al menos para la ATPasa de calcio, los dos estados (E_1 y E_2) tienen diferente afinidad por el catión transportado.

Segundo, de Meis y cols. (1980) propusieron que los pasos 2 y 4 del modelo mostrado se desglosen: El 2 en 2A, donde el ATP se une a la enzima, formándose un intermediario, y 2B, donde el ATP se rompe, liberándose el ADP y formándose el enlace aspartil-fosfato. El 4o. en 4A, donde se rompe el enlace aspartil-fosfato, formándose un intermediario con el fosfato fuertemente unido a la enzima, y en 4B, en el que el fosfato es liberado al medio. En apoyo a esta idea, Smith y Hammes (1988) analizaron las constantes cinéticas del ciclo catalítico de la ATPasa y encontraron que el paso limitante es la salida del fosfato cuando éste ya no está unido covalentemente a la enzima.

Además de lo anterior, de Meis (1989) ha propuesto con respecto al mecanismo de reacción, que los cambios conformacionales que la enzima sufre durante el ciclo catalítico modifican la polaridad del sitio activo haciéndolo más hidrofóbico. Como consecuencia el equilibrio de la reacción $ATP \rightleftharpoons ADP + Pi$ se desplaza, y la síntesis del ATP ocurre espontáneamente. Así se ha explicado el que varias drogas hidrofóbicas inhiben las reacciones de recambio y síntesis de varias ATPasas en forma competitiva con el fosfato (de Meis y cols. 1988).

pH óptimo.

Los trabajos en donde se ha analizado la respuesta de la ATPasa de *S. cerevisiae* a diferentes valores de pH, han dado resultados muy variados, indicando diferentes valores para el pH óptimo.

En 1979 Peters reporta un valor de 5.0 y Willsky reporta un valor de 5.5; Borst-Pauwels en 1981 indica un pH óptimo de 5.8, pero señala que este valor puede variar si se

utiliza ATP contaminado con Vanadato. Serrano (1983) encontró que si se preincuban las células con glucosa antes de obtener extraer las membranas, se obtiene una ATPasa cinco veces más activa, y el pH óptimo para la enzima cambia de 5.7 a 6.5.

Para otras levaduras los valores reportados son los siguientes: 5.0 para *Schizosaccharomyces pombe* (Delhez y cols., 1977), 6.4 para *Candida tropicalis* (Blasco y cols., 1981) y 7.0 y 6.0 respectivamente, en ausencia y en presencia de concentraciones muy pequeñas de vanadato para *Neurospora crassa* (Bowman y Slayman, 1979).

La explicación que se ha propuesto para estas variaciones en el pH óptimo reportado, es que se deben a diferencias en las condiciones experimentales, o a contaminación con ATPasa mitocondrial o vacuolar (Goffeau y Slayman, 1981). Los valores de pH óptimo reportados para estas dos enzimas son de 9.0 para la mitocondrial y 7.0 y 7.5 para la vacuolar (Peters y Borst-Pauwels, 1979; Kakinuma y cols, 1981, y Blasco y cols, 1981).

Nosotros pensamos que las variaciones en el pH óptimo reportado también pueden deberse a cambios en las constantes de formación del complejo Mg-ATP (verdadero sustrato de la enzima) o en la fuerza iónica del medio de reacción. En un trabajo anterior realizamos experimentos controlando estos parámetros como lo indican Fabiato y Fabiato (1978), y utilizando una concentración de Mg libre de 1 mM y 2.5 mM de Mg-ATP y una fuerza iónica de 140 mM encontramos un pH óptimo de 6.5 (Olivera, 1986).

Especificidad y afinidad por el sustrato.

La H^+ ATPasa de membrana plasmática muestra una especificidad muy alta, con valores de hidrólisis para ITP, UTP, TTP y GTP menores al 2% de los mostrados con ATP en *S. cerevisiae* (Borst-Pauwels, 1979) y *S. pombe* (Duffour, 1980) y cero hidrólisis para otros compuestos fosforilados.

A partir de estudios cinéticos es ahora bastante claro que, lo mismo que para otras ATPasas, el sustrato de la ATPasa de membrana plasmática es el complejo Mg-ATP (Scarborough, 1977; Delhez, 1977), y las constantes de afinidad (K_m) calculadas oscilan entre 0.05 mM. (Borst-Pauwels, 1981) y 1.7 mM. (Willisky, 1979). Según Ahlers (1981), las diferencias en las K_m reportadas son debidas a que altas concentraciones de Mg^{2+} libre ejercen un efecto de inhibición pseudocompetitiva, disminuyendo la afinidad de la ATPasa por el sustrato.

Efecto de los cationes metálicos.

Cationes Divalentes.

El Mg^{2+} parece ser el cofactor fisiológico de la enzima. La actividad de la H^+ ATPasa es máxima cuando en el medio de ensayo se agrega Mg^{2+} en concentraciones equimolares con el ATP (Serrano, 1978; Borst-Pauwels, 1981). Otros cationes como el Co^{2+} y el Mn^{2+} también permiten la expresión de la actividad; el Ni^{2+} , el Zn^{2+} y el Fe^{2+} son menos efectivos, y con Sr^{2+} y Ca^{2+} no hay actividad (Scarborough, 1977; Bowman, 1977; Serrano, 1978; Peters, 1979; Duffour, 1980).

Además de formar parte del sustrato de la enzima se requiere la presencia de iones Mg^{2+} libres para detectar actividad de hidrólisis. Hay que notar sin embargo que, en presencia de Mg^{2+} , el Zn^{2+} y el Ca^{2+} actúan inhibiendo la enzima, e inclusive el Mg^{2+} , si se encuentra presente en altas concentraciones tiene un efecto inhibitorio.

Debido al comportamiento bifásico del Mg^{2+} se ha propuesto la existencia de dos sitios alostéricos para magnesio en la ATPasa, uno de alta afinidad que activa la enzima y uno de baja afinidad que la inhibe.

Es importante notar aquí que algunos experimentos cinéticos realizados previamente (Olivera, 1986) en los cuales compensamos los cambios en fuerza iónica que se producen cuando se varía la concentración de ATP, indicaron que con un solo sitio para el magnesio es posible explicar las dos fases de las curvas de actividad contra concentración del metal. Sin embargo, se requiere otro tipo de estudios con una preparación muy pura de la ATPasa para poder definir con certidumbre si la enzima tienen uno o dos sitios regulatorios para el Mg^{2+} .

Cationes Monovalentes.

Se han descrito efectos activadores de los cationes inorgánicos monovalentes en la actividad de la ATPasa. Algunos grupos han reportado que el K^+ tiene un efecto específico y que además protege a la enzima de ciertos inhibidores (Borst-Pauwels, 1981; Malpartida y Serrano, 1980 y Villalobo, 1982), estos resultados han dado lugar a la idea propuesta originalmente por Malpartida y Serrano (1980) y desarrollada por Villalobo

(1981 y 1982) de que la ATPasa tiene la función de realizar un intercambio H^+/K^+ .

En estos trabajos existe la posibilidad de que el intercambio H^+/K^+ observado se debiera a proteínas de bajo peso molecular contaminantes de la preparación utilizada, y el grupo de Slayman (Perlin y cols, 1984), utilizando una preparación muy pura de la ATPasa de *N. crassa* encontró que no se observa un efecto específico del potasio sobre el potencial generado por la enzima. Nosotros encontramos que la estimulación por potasio no se presentó cuando determinamos la actividad manteniendo constantes la fuerza iónica y la concentración del complejo MgATP (Olivera, 1986). De cualquier manera, los estudios de reconstitución (Malpartida y Serrano, 1980 y Villalobo, 1981 y 1982) han abierto un debate que no podrá ser resuelto satisfactoriamente mientras no se disponga de una preparación pura de la ATPasa de *S. cerevisiae*.

Inhibidores de la ATPasa.

El uso de inhibidores en el estudio de las enzimas ha permitido llegar a un mejor conocimiento de sus mecanismos y facilitado su manejo e identificación. Por esta razón se han realizado muchos estudios de la H^+ -ATPasa de membrana plasmática utilizando compuestos que se sabe que inhiben otras ATPasas; por ahora se conoce con mayor o menor detalle el efecto de los siguientes:

La oligomicina, la azida de sodio y la venturicidina, inhiben específicamente a la ATPasa mitocondrial a concentraciones que no afectan sensiblemente a la de membrana plasmática.

El DCCD (50 μ M.), el Dio-9 (18 gr./ml.), el NaF (2 mM.), la quercetina (24 μ M.) μ y el

p-cloromercuribencensulfonato ($3 \mu\text{M}$) inhiben inespecíficamente tanto la ATPasa mitocondrial como la de la membrana plasmática (Goffeau y Slayman, 1981).

Finalmente el ortovanadato ($11 \mu\text{M}$) y el dietilstilbestrol ($27 \mu\text{M}$) son inhibidores específicos que no tienen efecto sobre la ATPasa mitocondrial. De éstos, el ortovanadato ha recibido mayor atención, debido principalmente a que ciertos lotes de ATP de algunas marcas estaban contaminados con este compuesto, y por un tiempo éste produjo resultados contradictorios en los estudios de la enzima (Borst-Pauwels, 1981).

4 Uso de compuestos hidrofóbicos en el estudio de los sistemas de membrana.

Los primeros estudios sobre el efecto de compuestos hidrofóbicos en sistemas de membrana fueron realizados hace alrededor de treinta años por Pressman (1963), quien describió los efectos inhibitorios de una serie de derivados de la guanidina sobre la respiración en mitocondrias de hígado de rata.

Posteriormente se han realizado varios trabajos sobre el efecto inhibitor de compuestos hidrofóbicos y también sobre los efectos activadores de algunos detergentes sobre otros sistemas de membrana. Sin embargo, todavía no se han podido comprender las bases moleculares de las interacciones de estas moléculas anfifílicas con los sistemas de membranas.

En la literatura encontramos las siguientes explicaciones a los fenómenos descritos: bloqueo o inactivación de moléculas que normalmente actúan como reguladores de las enzimas como la calmodulina (Levin, 1977); unión a múltiples sitios inespecíficos causando alteraciones de la estructura tridimensional de las enzimas (Adade y cols, 1987); ocupación y bloqueo de los sitios donde se unen normalmente las moléculas transportadas (Peña, 1973), alteración de las interacciones lípido proteína, desplazamiento y sustitución de ciertos lípidos que puedan estar actuando como reguladores de la actividad de la enzima. Por otra parte, las activaciones inducidas por detergentes, normalmente se interpretan como el desmascaramiento de sitios activos latentes (De Duve y cols, 1975), la alteración de interacciones entre diferentes subunidades de las enzimas (Vazquez-Laslop y cols, 1986) y recientemente Monk y cols. (1989) han sugerido que algunos detergentes como el ácido lisofosfatídico podrían actuar directamente sobre la enzima, aunque no proponen un mecanismo.

Estos mecanismos fueron propuestos separadamente para explicar las interacciones observadas de moléculas relativamente complejas y diferentes enzimas. El primer trabajo encaminado a obtener una explicación general para la inhibición de las ATPasas por compuestos hidrofóbicos lo llevaron a cabo de Meis y cols. (1988), quienes analizaron el efecto inhibitor de varias drogas lipofílicas sobre la Ca^{2+} -ATPasa de músculo cardíaco y la ATP sintetasa de corazón de res, y propusieron un modelo en el cual las drogas interactúan directamente con el sitio activo de esas enzimas.

Con respecto a los efectos de compuestos lipofílicos sobre la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática encontramos, además del trabajo de Monk y cols (1989) mencionado arriba, que algunos derivados de la fenotiazina como la trifluoperazina (TFP) -una droga utilizada tradicionalmente como antagonista de calmodulina y que fue usada en los estudios de de Meis y cols (1988)- inhiben la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática (Eilam, 1984). Nosotros habíamos observado (Olivera, 1986), que el calmidazolium (otro antagonista de la calmodulina) también inhibe a la enzima. Pero no se ha presentado ninguna hipótesis para explicar estos resultados.

5 Objetivos.

Purificación de la ATPasa.

El primer objetivo de este trabajo fue obtener una preparación pura de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de la levadura *S. cerevisiae*. Como mencionamos anteriormente esta purificación ha sido intentada por otros grupos pero la enzima obtenida está contaminada y tiene baja actividad.

Efecto de compuestos hidrofóbicos sobre la ATPasa.

En el curso de la purificación encontramos dos evidencias que nos condujeron hacia lo que es el segundo objetivo de este trabajo. Estas fueron:

1. Que la ATPasa es inhibida por la octilguanidina y se une a una columna de sefarosa-aminohexil.

2. Se publicó el trabajo de de Meis y cols (1988) donde se intenta hacer una generalización sobre los efectos de diferentes compuestos hidrofóbicos en las ATPasas.

El objetivo que se planteó a partir de lo mencionado fue el de analizar los efectos de una serie de compuestos anfílicos sobre tres preparaciones diferentes de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de la levadura: estado nativo unida a membranas, purificada en estado soluble y purificada y reconstituida con fosfolípidos.

Las razones para realizar este estudio son las siguientes:

1. El uso de las alquil-guanidinas y otros compuestos relacionados nos puede ayudar a comprender el mecanismo molecular del ciclo catalítico de la ATPasa.
2. Entender el efecto de este tipo de compuestos sobre la enzima permitirá entender el mecanismo de unión de la enzima a la columna de hexil-amina, y posiblemente contar con un nuevo método para obtener una preparación más activa de la enzima.
3. El estudio del efecto de los alquil-iones en la ATPasa puede darnos información sobre las interacciones de la ATPasa con los lípidos de la membrana. Las interacciones de las proteínas de las membranas con los fosfolípidos es un tema muy interesante pero que ha sido difícil de tratar. El uso de estos compuestos podría facilitar esta tarea.

II MATERIALES Y METODOS.

Material Utilizado.

La levadura de panadería fue comprada de "LA AZTECA S.A.". Las alquil aminas fueron obtenidas de Merck y redestiladas a presión reducida antes de utilizarlas. Los alcoholes y ácidos orgánicos fueron de Sigma Chemicals. Las alquil guanidinas fueron sintetizadas a partir de las aminas primarias utilizando una adaptación del método de Phillips (1923). Los fosfolípidos fueron de Avanti Polar Lipids, Inc o de Sigma Chemical Company, obteniéndose prácticamente los mismos resultados con ambas marcas. El γ - 32 P-ATP radioactivo fue donado por el Dr. Dreyfus (IFC. UNAM).

1 Activación de las levaduras.

La H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* se inactiva rápidamente cuando las células se encuentran en ausencia de glucosa (Serrano 1983). Para obtener la enzima en estado activo, se incubaron 100 gr. de levadura de panadería de "LA AZTECA S. A." durante una hora en 500 ml. del medio de activación antes de proceder a la purificación de las membranas. Las levaduras convierten rápidamente la sacarosa en glucosa lo que nos permite obtener una actividad elevada de ATPasa en nuestras membranas.

Medio de Activación:

Sacarosa	8.0%
K ₂ HPO ₄	0.2 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2 %
CaCl ₂	1 mM.

2 Aislamiento de la membrana plasmática.

La membrana se aisló utilizando una modificación del método de Franzusoff y Cirillo (1983). El método final se encuentra esquematizado en la figura 6.

Las células incubadas en el medio 1 se cosecharon por centrifugación (5 min a 3000xg.), y se lavaron una vez resuspendiendo en 5 vols. de amortiguador A y centrifugando nuevamente.

Amortiguador "A".

Sacarosa	250 mM.
Imidazol	10 mM.
EDTA	1 mM.
PMSF	1 mM.
Azida de Sodio	3 mM.
+ TEA -->	pH7.5

Inmediatamente después, las células fueron resuspendidas en amortiguador "A", y se procedió a romperlas con un tercio de

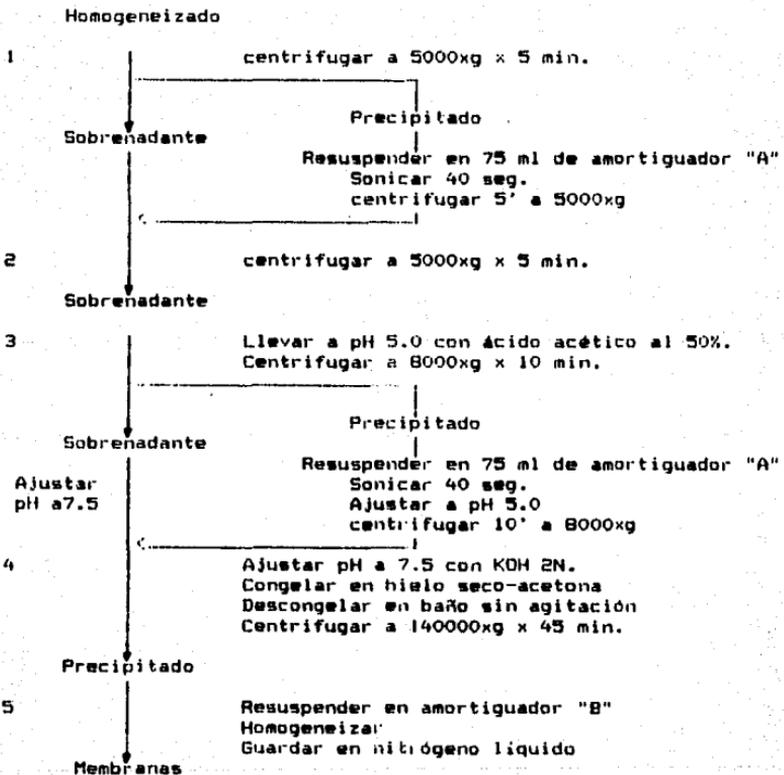


Figura 6. Método utilizado para el aislamiento de la Membrana plasmática.

volumen de perlas de vidrio de .45-.5mm, en un "Bead-Beater" de Biospec Products, en pulsos de 30 seg, alternados con descansos de 45 seg. Se utilizó la cámara de homogenización de 250 ml, enfiada con una mezcla de hielo y etanol.

Después de romper, se decantó el homogenado para separarlo de las perlas y se lavó a estas últimas con 50 ml de amortiguador "A", para recuperar la parte del homogenado que se les queda adherido. Las dos fracciones así obtenidas se mezclaron y se les sometió al procedimiento descrito a continuación e ilustrado en la figura 6.

1. El homogenado se centrifugó durante 5 min a 5000xg; se utilizó la centrifuga Sorvall RC-5B con el rotor SS34 a 3500rpm.

En esta centrifugación se obtuvo un precipitado grande formado principalmente por núcleos y células que no se rompieron que se resuspendió en 100 ml de amortiguador "A"; se sonicó durante 40 seg en fracciones de 15 ml en un sonicador de baño de Laboratory Supplies Company Inc. modelo G112SPIT, y se volvió a centrifugar 5 min. a 5000 x g. El sobrenadante obtenido se reunió con el anterior y se continuó con el procedimiento.

2. Los dos sobrenadantes reunidos se centrifugaron una vez más 5 minutos a 5000 x g.

3. Se recuperó el sobrenadante y se le ajustó el pH a 5.01 con una solución de ácido acético al 50%; este paso es sumamente crítico. Si el pH baja a menos de 5.00, la ATPasa de la membrana plasmática se inactiva rápidamente y por otro lado, si el pH no se baja lo suficiente, la preparación final quedará contaminada con membranas

mitocondriales. El sobrenadante ajustado a pH 5.01 se sometió a una centrifugación de 10 min a 8000 x g.

Igual que en el paso 1, el precipitado que contiene las mitocondrias se resuspendió en 75 ml de amortiguador "B", se sonicó 40 seg y se volvió a centrifugar 10 min a 8000 x g. El sobrenadante obtenido se reunió con el anterior y se continuó con el procedimiento.

4.A la mezcla de los sobrenadantes se le ajustó el pH a 7.5 con NaOH 2N. se congeló en hielo seco acetona y se dejó descongelar en un baño a temperatura ambiente sin agitación.

Una vez descongelada, se centrifugó durante 45 min a 140,000xg en una ultracentrifuga Beckman L8M en el rotor 45Ti (37,500rpm).

5. El precipitado, conteniendo la membrana plasmática, se resuspendió en amortiguador "B" con 20% glicerol, se homogenizó utilizando un pequeño homogenizador de vidrio (volumen máximo de trabajo, 2.5 ml) y se guardó en nitrógeno líquido hasta ser utilizado.

Amortiguador "B"

Tricina	10.0 mM.
EDTA	1.0 mM.
PMSF	1.0 mM.
b-mercaptoetanol	2.8 mM.
+ TEA	pH 7.5

+ los porcentajes de glicerol indicados en el texto.

3 Purificación de la ATPasa.

Se han publicado diferentes métodos para la purificación de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de la levadura (Malpartida y Serrano, 1980 y 1981 A y B; Foury y cols., 1981; Koland y Hammes, 1986; Serrano, 1988; Goffeau y Dufour, 1988). En el curso del presente trabajo probamos los métodos reportados en Foury y cols. (1981) y Malpartida y Serrano (1981B), y tratamos también de combinar el último con un método descrito por Dreyfus y cols., (1984). A continuación describiré brevemente los dos métodos utilizados, las modificaciones intentadas y el finalmente el método utilizado para los experimentos con los compuestos lipofílicos.

3.1 Método de Foury y cols (1981).

Este método se basa en solubilizar una preparación cruda de membranas de levadura con 3 detergentes diferentes, ninguno de los cuales solubiliza a la ATPasa. Al final se obtiene la enzima todavía unida a las membranas pero libre de una gran cantidad de proteínas que si son liberadas por los detergentes utilizados. El procedimiento es como sigue:

1. Se resuspenden las membranas crudas a una concentración de 25 mg de proteína por ml.
2. Agregar lentamente y con agitación suave una solución de desoxicolato 10%, hasta obtener una concentración final de 20 mg/ml.
3. Incubar 30 min en hielo.
4. Centrifugar 45 min a 80,000 x g; descartar el sobrenadante.

5. Resuspender el precipitado a una concentración de proteína de 4 mg/ml.
6. Agregar Triton X-100 al 10% lentamente y con agitación suave hasta obtener una concentración final de 2.5%.
7. Incubar 30 min en hielo.
8. Centrifugar 45 min a 80,000 x g; y descartar el sobrenadante.
9. Resuspender el precipitado a una concentración de proteína de 2.5 mg/ml.
10. Agregar una solución de lisofosfatidilcolina al 10% hasta obtener una concentración final de 2.0 mg/ml. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
11. Centrifugar 45 min a 80,000 x g, y descartar el sobrenadante.
12. Resuspender el precipitado (donde se encuentra la actividad de ATPasa) a la concentración deseada y guardar a 70°C.

3.2 Método de Malpartida y Serrano (1981B).

Para este método se requiere comenzar con membrana plasmática aislada como se describió anteriormente (parte 2), y en él se introduce el uso de un detergente zwitteriónico sintético, el Zwittergent TM-314 para solubilizar la enzima. Este detergente ha sido usado posteriormente por otros grupos de investigación para solubilizar esta enzima (Koland, 1986). El amortiguador utilizado es el amortiguador "B" descrito en la sección anterior y el procedimiento es el siguiente:

1. Se resuspenden las membranas en amortiguador "B" con 20% de glicerol a una concentración de 3 mg de proteína por ml.

2. Se añade guanidina 5M hasta una concentración final de 0.5M.
3. En un tubo del Rotor 60Ti se ponen 15ml de amortiguador "B" con glicerol al 35%, y cuidadosamente se depositan 5 ml de las membranas con la guanidina procurando que no se mezclen.
4. Se centrifuga 45 min. a 35,000 rpm.
5. Las membranas forman un precipitado que se resuspende en amortiguador con 20% de glicerol a una concentración de 3 mg prot/ml.
6. A las membranas se les añade lentamente y con agitación suave una solución de 10 mg/ml del Zwittergent TM-314 en el mismo amortiguador hasta obtener una concentración final de 2.5 mg/ml
7. Se incuban 3 min a 37°C sin agitar.
8. Se sonicán 3 min en un sonicador de baño.
9. Se centrifugan 35 min a 35,000 rpm en el rotor 60Ti.
10. Se toma el sobrenadante que contiene a la ATPasa solubilizada y se deposita con cuidado sobre un gradiente continuo de glicerol (15ml), de 20 a 50%, en amortiguador "B" con 0.1mg/ml del zwittergent TM314, previamente formado en un tubo del rotor 60Ti.
11. Se centrifuga el gradiente durante 16hrs a 35,000rpm.
12. La ATPasa forma un pequeño precipitado transparente en el fondo del tubo. Este se resuspende en amortiguador "B" con 20% glicerol.
13. Se repiten los pasos del 2 al 5.

14. La ATPasa se recupera del precipitado se resuspende en amortiguador "B" con 20% de glicerol y se guarda a -70°C.

3.3 Cromatografía en Sefarosa-hexilamina.

Dado que la enzima obtenida con estos métodos se ve muy contaminada cuando se analiza por electroforesis de poliacrilamida SDS teñida con plata, decidimos estudiar la posibilidad de purificarla más añadiendo al final del procedimiento una cromatografía en una columna de sepharosa-hexilamina como la utilizada por Dreyfus y cols. (1984).

El procedimiento seguido fué el siguiente:

1. Se montó una columna de 10 ml de la resina.
2. Se equilibró con el amortiguador "B" con 20% glicerol, 0.1 o 0.01 mg/ml del zwittergent y opcionalmente 1mg/ml de PC (fosfatidilcolina).
3. Se pasó por la columna la ATPasa obtenida en el paso 12 del procedimiento de Malpartida y Serrano (1981 A), utilizándose un flujo de .33 ml/min.
4. Se lavó la columna con 10 ml del amortiguador "B" con 20% glicerol.
5. Se eluyó la columna en un paso con el mismo amortiguador mas KCl 1M o con un gradiente continuo de 0 a 1M de KCl.
6. Se colectaron fracciones de 0.5 ml durante todo el proceso, se determinó proteína y actividad de ATPasa.
7. Se guardaron las fracciones a -70°C.

3.4 Preparación utilizada.

La preparación utilizada para los experimentos con los compuestos lipofílicos fue obtenida de acuerdo con el procedimiento de Malpartida y Serrano (1981 A) con las siguientes modificaciones.

1. en el paso 6 agregamos 1 mg/ml de fosfolípidos.
2. En el paso 11 se redujo el tiempo de corrida del gradiente a 12 hrs.
3. Omitimos el paso 13.

Posteriormente mencionaremos y discutiremos las ventajas que presenta el uso de éstas.

4 Determinaciones de actividad.

La H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de levadura cataliza la siguiente reacción:



en donde el valor exacto de "n", o sea la estequiometría H^+ (transportados) / ATP (hidrolizado) de la reacción aun no se conoce con exactitud suponiéndose un valor de uno (Malpartida y Serrano 1981B).

Existen muchas enzimas que catalizan este tipo de reacción; por lo tanto se han desarrollado diferentes métodos para medir su actividad. Generalmente lo que se hace es determinar la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) que una determinada cantidad de la enzima libera por unidad de tiempo. Para medir este fosfato existen varias alternativas, que incluyen medir la liberación de marca

radioactiva de γ - ^{32}P -ATP, acoplar a la reacción un sistema que reduce NADH, o determinar el fosfato liberado del ATP por métodos colorimétricos. En el curso de este trabajo utilizamos los tres métodos.

4.1 Método colorimétrico.

Para detectar por colorimetría el fosfato inorgánico liberado, utilizamos una modificación del método de Fiske y Subbarow (1925). El procedimiento realizado fue el siguiente:

La reacción se inició agregando un volumen de 5 a 10 μ l de la enzima (entre 10 y 100 μ g. de proteína) a 350 μ l del medio de reacción. Se incubó a temperatura ambiente $\sim 22^\circ C$ de 2 a 10 minutos, y la reacción se detuvo adicionando 1ml de la solución de molibdato y 250 μ l de la solución de ELON. Después de 15 minutos se leyó la densidad óptica en un espectrofotómetro, usando una longitud de onda de 700 nm. Para construir una curva patrón se utilizó una solución de KH_2PO_4 2.5 mM.

Soluciones para la determinación de la actividad de ATPasa:

1. Medio de Reacción para la ATPasa:

HEPES	25.0 mM.
KCl	99.0 mM.
MgCl ₂	2.6 mM.
ATP	8.0 mM.
TEA -->	pH 7.0

2. Solución de molibdato:

Molibdato de Amonio	12.5 gr
H ₂ SO ₄ 36N	28 ml

SDS 40 gr
H₂O cbp 1000 ml

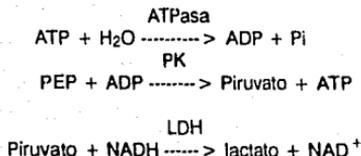
3. Solución de ELON:

Elon Sulfato 10 gr
Metabisulfito de sodio 30 gr
H₂O cbp 1000 ml

Las concentraciones de MgCl₂ y ATP indicadas en el medio de reacción nos dan concentraciones de 2.5 mM. para el complejo Mg-ATP y 100 μM. para el Mg²⁺ libre a pH 7.0 y 25°C.

4.2 Oxidación de NADH.

Los nicotinamida adenindinucleótidos reducidos (NADH⁺ y NADPH⁺) a diferencia de los oxidados absorben la luz a una longitud de onda de 340 nm. Esto permite registrar en un espectrofotómetro la concentración de dinucleótidos reducidos en una solución. Esta propiedad se utiliza para determinar la actividad de enzimas, siempre que la reacción que estas catalicen pueda acoplarse a un sistema que oxide los dinucleótidos. Para la ATPasa las enzimas que se utilizan para acoplar las reacciones son la piruvato cinasa (PK) y la lactato deshidrogenasa (LDH)



Estas reacciones además regeneran el ATP hidrolizado de manera que su concentración permanece constante. El método usado en este trabajo fue descrito por Dufour y cols (1988 A). Las soluciones utilizadas son las siguientes:

1. PEP 40 mM.
2. NADH 10 mM.
3. LDH 0.1 mg/ml.
4. PK 0.5 mg/ml.

La mezcla de reacción en que se realiza la determinación contiene 15 μl/ml de la solución 1 y 10 μl/ml de las otras tres, 25 mM de MES-KOH pH 6.8 más las cantidades necesarias de MgCl₂ y ATP para obtener las concentraciones de complejo Mg-ATP y Mg libre indicadas en cada experimento. De esa mezcla se pone 1 ml en una celda del espectrofotómetro Beckman DU-50 y se espera a que la absorbencia a 340 nm. se establezca. Se agrega la enzima y se registran en forma continua los cambios de absorbencia en una impresora conectada al espectrofotómetro.

La cantidad de ATP hidrolizado se calcula utilizando la fórmula:

$$\mu\text{molas ATP} = \frac{(D.O./\text{ln} - D.O./\text{inc}) \times \text{Vol. Tot}}{6.22 \times \text{tiempo}}$$

4.3 Liberación de ³²P Pi.

Para determinar liberación de fosforo inorgánico radioactivo del γ-³²P-ATP se utilizó el método reportado por de Meis y Carvalho (1974). La reacción de ATPasa se llevó a cabo en 800 μl del medio de reacción usado para el ensayo colorimétrico más 10

μl de ATP radioactivo ACT ESPI. Se inició agregando de 10 a 50 μl de la preparación de la ATPasa, se incubó durante 10 min a 25°C y se detuvo agregando 200 μl de ácido tricloroacético al 30%.

La mezcla se centrifugó 10 min en una centrífuga clínica de International equipment rp. a máxima velocidad. Se tomaron 700 μl del sobrenadante, se le añadió 300 μl de acetona y 1 ml de la solución de molibdato y se agitaron en el vortex durante 1 min. A continuación se añadió 1 ml de acetato de butilo, se agitó la nuevamente en el vortex 1 min y se centrifugó 1 min en la centrífuga clínica. Con cuidado para evitar goteos, se pusieron 400 μl del sobrenadante en un rectángulo de entre 6 y 10 cm^2 de papel filtro grueso, y se dejó secar el papel para luego ponerlo en un vial de vidrio con 5ml de líquido de centelleo y contarlo en un contador Packard Tri-Carb 300 con el programa de fósforo.

5 Determinaciones de proteína.

Las determinaciones de proteína se hicieron utilizando la técnica de Bradford (1976). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 1 ml; se leyó la absorbencia a 595 nm utilizando la albúmina de suero bovino como patrón. Determinaciones paralelas realizadas con la técnica de Lowry (1951) dieron siempre valores del doble de proteína; sin embargo para poder comparar nuestros resultados con los encontrados en la literatura reportamos aquí los valores obtenidos con el método de Bradford.

6 Cálculo de las concentraciones de

metales, ligandos y complejos metal-ligando en las soluciones.

Para calcular las concentraciones totales de los diferentes metales y ligandos que hay que agregar para tener las concentraciones de iones libres y complejos metal-ligando en las soluciones de ensayo, se utilizó un juego de tres programas desarrollado por Fabiato y Fabiato (1979).

El primer programa calcula las constantes de disociación metal-ligando aparentes, al pH utilizado en los ensayos, a partir de las constantes absolutas encontradas en las tablas y de las constantes de disociación H^+ -ligando. Además calcula la fuerza iónica contribuida por el amortiguador, la cual depende de lo cerca que se encuentren el pH del ensayo y el pK del compuesto amortiguador y nos indica la carga del ligando al pH del ensayo. Esto último es importante para calcular la fuerza iónica total en el ensayo utilizando la fórmula

$$I/2 = (1/2) \sum_i (Z_i)^2 C_i$$

donde Z_i es la carga del ión i y C_i es su concentración.

El segundo programa, dadas las concentraciones de cationes libres y complejos metal-ligando deseadas, utiliza las constantes de disociación aparentes obtenidas con el primer programa, para calcular las concentraciones totales que debe llevar el ensayo. Además calcula la cantidad de una sal monovalente que se debe agregar al ensayo para obtener la fuerza iónica indicada y recal-

Ligando	No. de sitio	Metal				
		H ⁺	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	Sr ⁺⁺	Zn ⁺⁺
EGTA ⁴⁻	1	9.46	10.72	5.24	8.24	14.36
	2	8.85	5.33	3.37	-	9.14
	3	2.68	-	-	-	-
	4	1.99	-	-	-	-
EDTA ⁴⁻	1	10.26	10.70	8.69	8.75	15.31
	2	6.16	3.51	2.28	2.15	4.22
	3	2.67	1.5	-	-	-
	4	1.99	1.0	-	-	-
ATP ⁴⁻	1	6.73	3.45	4.04	3.2	4.76
	2	4.26	2.15	2.55	1.0	2.4
	3	1.99	-	-	-	-

Tabla 1. Logaritmo de las constantes de disociación metal ligando utilizadas en este trabajo. Dado que los ligandos tienen más de un proton disociable, listamos las constantes reportadas de mayor a menor afinidad.

cula todas las demás concentraciones totales, tomando en cuenta las posibles asociaciones entre el catión monovalente agregado y los ligandos.

El tercer programa realiza exactamente la función inversa: teniendo las concentraciones totales y las constantes de disociación, calcula las concentraciones de los complejos y de los cationes libres. Su utilidad principal es revisar los resultados obtenidos con el segundo programa y probar diferentes juegos de constantes para ver que tan diferentes podrían ser las concentraciones libres si nuestras constantes fueran incorrectas.

Para realizar los cálculos con mayor velocidad y comodidad, se realizó una versión del segundo programa para computadoras personales IBM compatibles y del tercero se utilizó una versión que existe en la PDP-11 de la unidad de cómputo del IFC.

7 Constantes de disociación de metales y ligandos.

Para los cálculos se utilizaron las constantes absolutas que se encuentran en el manual de Sillen y Martell (1971), selec-

cionando las que se obtuvieron en condiciones lo más parecidas a las que nosotros usamos para medir la actividad, y que están listadas en la Tabla 1.

El uso de el programa tres con otras constantes reportadas diferentes de éstas no dió diferencias significativas.

8 Análisis cinéticos.

Los experimentos de cinética fueron analizados utilizando el algoritmo Simplex como lo describe Caceci (1984); en el laboratorio desarrollamos una adaptación para ajustar ecuaciones definidas por el usuario y producir gráficos.

9. Absorción Atómica.

La concentración de KCl en las fracciones colectadas de la columna de sefrosa-hexilamina se determinó utilizando absorción atómica en muestras diluidas de

las fracciones. Para ello se utilizó un espectrógrafo marca Carl Zeiss modelo PF5 con flama de gas butano, utilizando el filtro interno de potasio. Como referencia se utilizaron diluciones de una solución 100mM de KCl preparada en el laboratorio.

10. Electroforesis.

Las electroforesis se realizaron con el método de Laemmli (1970). Las muestras se pusieron en un amortiguador conteniendo 20% de SDS y se incubaron 1 hr a 50°C porque la ATPasa forma un precipitado cuando se calienta a temperaturas mayores y no penetra en los geles (Fourey y cols., 1981).

Los barridos de los geles se tomaron en un espectrofotómetro Beckman DU-50 utilizando el accesorio para transporte de geles.

III RESULTADOS

1 Purificación de la H^+ -ATPasa.

El primer objetivo de este trabajo fue obtener una preparación de la H^+ -ATPasa de *S. cerevisiae* con alto grado de pureza y elevada actividad específica. Actualmente se reconoce que obtener una preparación con estas características a partir de *S. cerevisiae* es muy difícil; siendo más fácil obtener la enzima a partir de *Schizosaccharomyces pombe* o *Neurospora crassa* (Dufour y cols., 1988).

Cuando iniciamos este trabajo existían dos reportes sobre la purificación de la enzima de *S. cerevisiae* (Foury y cols., 1981; Malpartida y Serrano, 1981 B), en los cuales nos basamos para iniciar la purificación. La descripción de estos procedimientos puede verse en Materiales y Métodos (3.1 y 3.2).

Como se muestra en la Tabla 2, los resultados obtenidos utilizando el método de Malpartida y Serrano (1981B) fueron mejores que los obtenidos con el de Foury y cols. (1981); sin embargo en ambos casos las actividades específicas fueron menores que las reportadas. Con el método de Foury y cols., incluso se requirió un poco de prueba y error, porque la técnica es difícil de reproducir, por ejemplo, se indican en diferentes lugares 3 concentraciones diferentes de Tritón X100 que van desde el 25 hasta el 0.25 por ciento.

1.1 Uso de la columna de sefarosa-aminohexil

Para obtener una preparación más limpia, decidimos utilizar una columna de Seфарosa-aminohexil, que ha sido utilizada con éxito para purificar otras ATPasas (Dreyfus y cols., 1984). Para esto primero analizamos si la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática también se inhibía con octilguanidina, que es una molécula con propiedades parecidas a la que se encuentra en la columna, y que se sabe inhibe a otras ATPasas, como la F_1 mitocondrial. Encontramos que nuestra enzima se inhibió incluso a concentraciones menores de las requeridas para inhibir a la F_1 (los datos serán mostrados y analizados posteriormente).

Nuestra enzima también mostró poca inhibición con hexilamina, lo que indica que su afinidad hacia el aminohexilo de la columna no debe ser muy alta. Esto es conveniente, porque cuando una enzima tiene mucha afinidad por el ligando de la columna, es a veces difícil liberarla.

La figura 7A muestra el perfil obtenido al eluir la enzima en un solo paso utilizando KCl 1M en un amortiguador de tricina 10mM con 1mM de EDTA ajustado a pH 7.5 con TEA en presencia de 0.1 mg/ml del zwittergent TM-314 y 1mg/ml de lecitina de soya. Como puede verse, la actividad de ATPasa se fijó a la columna y pudo eluirse, al igual que la F_1 , utilizando KCl 1M, pero la actividad

Método	Actividad obtenida	veces de purificación	Actividad reportada
Membranas completas	1.5	0	1.5
Foury y cols.	4.5	3	7.0
Malpartida y Serrano.	8-14	5	14-21
Nuestro método	11-14	9	---

Tabla 2. Resultados de la purificaciones. Realizadas de acuerdo a Foury y cols. (1981) y Malpartida y Serrano (1981 B) y con las modificaciones indicadas en Materiales y Métodos sección 3.4. Las actividades están reportadas en molas/mg/min.

específica fue igual o menor que la de la preparación inicial.

Una observación importante es que después de usar la columna dos o tres veces, la actividad de ATPasa ya no se unió a ella, y fue necesario regenerarla utilizando NaOH. Esto no sucede en el caso de la F_1 -ATPasa (Dreyfus y cols., 1984) y sugiere que en nuestra preparación existe algo que se une a la columna y no se libera con 1M de KCl.

Opciones de elución para la columna.

Para obtener una enzima con una actividad específica mas elevada se intentaron las siguientes modificaciones:

1. Eluir la columna con ATP o Mg^{2+} . Se utilizaron concentraciones desde 2 hasta 100 mM. de ATP o MgATP, o 500 mM. de Mg solo. La enzima no se pudo liberar con ATP ni con MgATP. Aunque se encontró que al añadir 2mM. de ATP y 1mM. de EDTA en los amortiguadores usados para lavar y eluir la columna, se obtuvo una enzima un poco más activa. La elución con 250mM de $MgCl_2$ liberó a la enzima de la columna pero la actividad específica obtenida fue muy baja.
2. Eluir con un gradiente de KCl de 0 a 1M. Esto dió los mejores resultados. La enzima obtenida en las fracciones entre 600 y 800mM se vió más limpia analizada por electroforesis en geles de

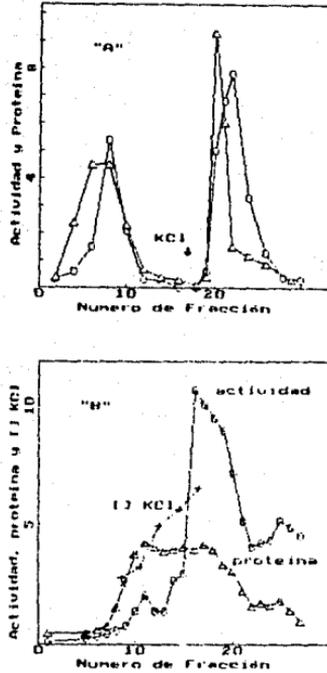


Figura 7. Perfil de elución de la columna de Sepharosa aminoetil. La columna de 4 ml de volumen se equilibró utilizando el amortiguador "B" con 15% de glicerol y 0.01 mg/ml del Zwittergent. Se cargó con 1.5 ml de muestra y se lavó con 8.5 ml del mismo amortiguador, colectando fracciones de 0.5 ml. En el punto indicado se inició la elución utilizando el mismo amortiguador más 1M de KCl (A) o un gradiente continuo de 0-1M de KCl (B). Los símbolos son: 'Δ', proteína en 0.1 μ g/ μ l; '+', actividad en μ moles Pi/mg/min y '+', concentración de KCl determinada por absorción atómica y expresada en 100x mM.

poliacrilamida, (dato no mostrado) aunque la actividad específica no aumentó (fig 7B).

3. Añadir lípidos y detergentes a los amortiguadores. Esta alternativa no dio buenos resultados. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando una concentración de 0.01 mg/ml del Zwittergent 314. No se obtuvieron resultados diferentes al añadir los fosfolípidos.

1.2 Uso de inhibidores de proteasas.

Uno de los problemas en el aislamiento de proteínas de levaduras es la proteólisis. Para evitarlo añadimos una serie de inhibidores de proteasas a los amortiguadores utilizados en el proceso de aislamiento de las membranas y purificación de la enzima. Desafortunadamente, muchos inhibidores de proteasas inactivaron a la H^+ -ATPasa, por lo que no fue posible utilizarlos; entre ellos contamos la N-etilmaleimida y todos los compuestos mercuriales inhibidores de proteasas. Los inhibidores que se pudieron utilizar son la yodoacetamida 5mM, la paminobenzamida 10mM y el PMSF 1mM, además del EDTA (1mM) que inhibe metaloproteasas por su acción quelante de cationes.

Otra de las razones por la que se pierde actividad en el proceso de purificación, es que la enzima se inactiva rápidamente al estar descongelada, por lo que se intentó reducir al mínimo el tiempo empleado en la purificación.

1.3 Uso de una columna de sefadex G400.

Intentamos cambiar el gradiente de glicerol 20-50% por una columna de sefadex

G400. Un resultado extraño de esto es que a pesar de que el sephadex separó, al igual que el gradiente de glicerol, dos picos de proteína de los cuales sólo el primero tuvo actividad, la actividad específica de ese pico fue igual a la obtenida del gradiente. Esto sugiere que las bajas actividades se deben a otro factor que no hemos considerado. Una posibilidad es que la enzima delipidada por estos procedimientos se vuelva inestable, sin embargo el añadir lípidos exógenos afectó al gradiente y no se probó añadir lípidos a la columna de Sefadex.

1.4 Preparación utilizada.

La preparación final se obtuvo mediante una modificación del método de Malpartida y Serrano (1981 B). Las modificaciones que realizamos al método y las razones para hacer esas modificaciones fueron las siguientes:

1. Agregar lípidos al paso de solubilización. Esta modificación nos permitió resultados más constantes, aunque no aumentó la actividad específica máxima obtenida en la purificación.
2. Reducir el tiempo de corrida del gradiente de glicerol de 16 a 8 horas. Esto se hizo para reducir el tiempo de purificación y no redujo sensiblemente el rendimiento obtenido.
3. Eliminar el último tratamiento con guanidina (paso 13 de la sección 3.2). Esto se hizo porque en nuestro sistema la guanidina afectó la determinación de proteína por el método de Bradford y no aumentó realmente las actividades específicas.

La actividad específica de la preparación obtenida con estas modificaciones estuvo

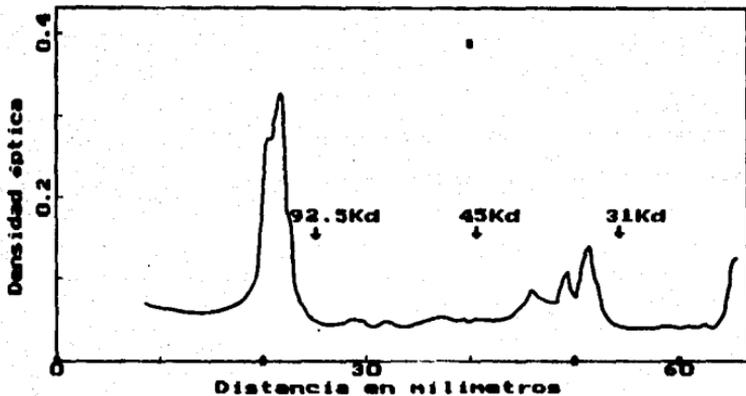


Fig 8. Barrido de un gel de poliacrilamida de la preparación de la ATPasa utilizada.

entre 11 y 14 μ molas/mg/min, y los resultados fueron mas reproducibles .

En la figura 8 podemos ver el barrido de un gel de poliacrilamida al 7.5% de nuestra preparación. En la literatura se ha identificado al pico de ~ 100 Kd -que contiene alrededor del 80% de la proteína de nuestra preparación- como la H^+ -ATPasa y se han

descrito algunos contaminantes que migran en la misma posición que los tres picos de bajo peso molecular que se observan en la figura (Malpartida y Serrano, 1981 B). Esto nos indica que la preparación es muy semejante a las descritas en la literatura.

Estabilidad de la preparación.

La enzima purificada y mantenida en el amortiguador "B" con 50% glicerol a -70°C tuvo una vida media de aproximadamente 10 días. A diferencia de lo reportado por Malpartida y Serrano (1981B) nuestra enzima no fue estable en el amortiguador con 20% glicerol, obteniéndose en ese medio una vida media de menos de 48 hrs a -70°C . En cualquiera de los amortiguadores la estabilidad de la enzima no mejoró al mantenerse en nitrógeno líquido.

2 Inhibición por cationes lipofílicos.

Los cationes lipofílicos inhibieron la actividad hidrolítica de la H^{+} -ATPasa. En la figura 9 podemos ver el efecto de concentraciones crecientes de dos alquilaciones diferentes. Las alquilguanidinas (figura 9A) que se sabe que inhiben la respiración en mitocondrias completas (Pressman 1963) y a la F_1F_0 ATPasa (Gómez-Puyou y cols., 1977 A y B); y las alquil-aminas (figura 9B) que poseen una carga eléctrica similar a las guanidinas pero una estructura más simple y un peso molecular menor. La inhibición observada fue mayor al incrementarse la longitud de la cadena asociada -y por lo mismo la hidrofobicidad del compuesto-, y también fue mayor en las guanidinas que en las aminas.

En las gráficas de Dixon (fig 10) puede observarse también que mientras la inhibición por las guanidinas es lineal, las aminas producen una inhibición que no se hace lineal en esta regraficación.

Otros compuestos del mismo tamaño y carga eléctrica pero de naturaleza hidrofílica como los aminoácidos básicos arginina e histidina a concentraciones hasta 50 mM no tuvieron ningún efecto sobre la ATPasa (dato no mostrado).

2.1 Importancia de la preparación utilizada.

El efecto de los cationes lipofílicos fue analizado en las tres preparaciones de la ATPasa disponibles: enzima aislada en forma soluble, reconstituida con fosfolípidos, y membranas completas.

En la figura 11 observamos que la inhibición fue mayor sobre la preparación desprovista de lípidos que sobre las otras dos. En esta figura los valores fueron normalizados para permitir una comparación directa, los valores correspondientes al 100% fueron $6.8 \mu\text{mol}$ de Pi $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ para la enzima soluble y 11.9 para la enzima reconstituida.

2.2 Estudios cinéticos.

Los estudios cinéticos proporcionan información sobre las interacciones de las enzimas con los diferentes compuestos que modulan su actividad. Por esta razón decidimos analizar los efectos de los cationes lipofílicos sobre la cinética de la ATPasa para el complejo Mg-ATP .

Los resultados de un experimento típico utilizando la enzima purificada y reconstituida con fosfolípidos se muestran en la figura 12. En este experimento se usaron concentraciones de octil guanidina dentro del rango en el cual las gráficas de Dixon

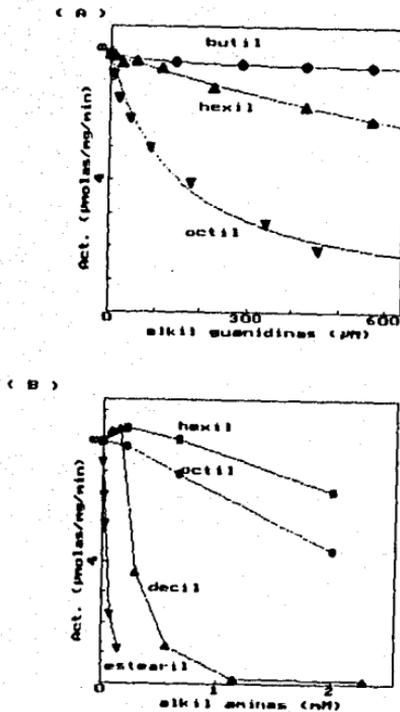


Figura 9. Inhibición de la ATPasa por alquili cationes. Las actividades fueron determinadas utilizando el método colorimétrico. El medio de reacción contenía MES-TEA 25mM pH 6.5 con 2.5 mM de MgATP y 100 μM de Mg^{2+} libre. La enzima utilizada fue ATPasa purificada soluble. Los alquili cationes fueron agregados al medio de reacción en soluciones concentradas preparadas en etanol al 50%. La reacción se inició agregando la enzima. Los símbolos son: en la figura A butil (●), hexil (▲) y octil (▼) guanidina y en la figura B hexil (■), octil (●) decil (▲) y estearil (▼) amina.

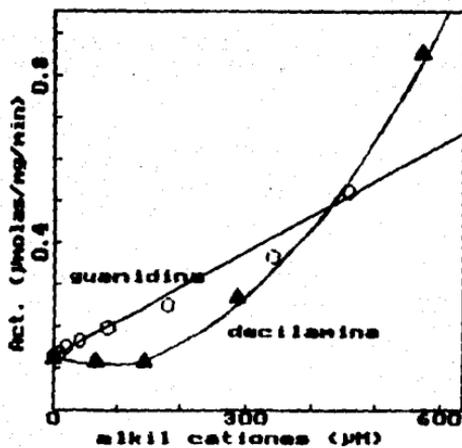


Figura 10. Regrificación de Dixon de la inhibición de la ATPasa por alquil cationes. Las actividades fueron tomadas de la figura 9.

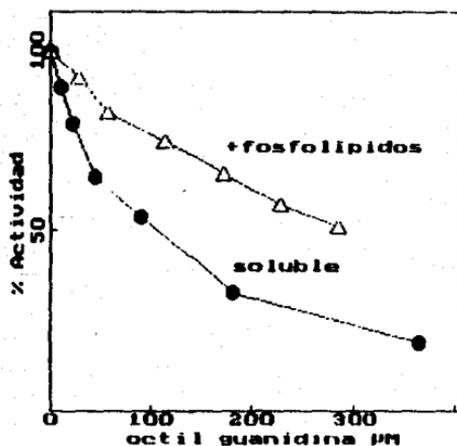


Figura 11. Inhibición por octilguanidina en diferentes preparaciones de la ATPasa. Las actividades fueron determinadas igual que en la figura 9. Los símbolos son (●) ATPasa purificada soluble y (▲) ATPasa purificada determinada en presencia de 3 mg/ml de azolectina (principalmente fosfatidil colina). Los valores del 100% equivalen a actividades de 6.8 μ molas/mg/seg para la enzima soluble y 11.9 para la enzima con fosfolípidos.

fueron lineales (entre 5% y 80%, ver figura 10). Los datos fueron ajustados a las ecuaciones para los tipos más comunes de inhibición y mostraron el mejor ajuste cuando se utilizó la ecuación para una inhibición no competitiva. Las ecuaciones utilizadas, las

desviaciones estándar de los diferentes ajustes y los parámetros calculados se presentan en la tabla 3.

Las líneas dibujadas en la figura 12A son el resultado de una simulación utilizando la ecuación y los parámetros indicados en la

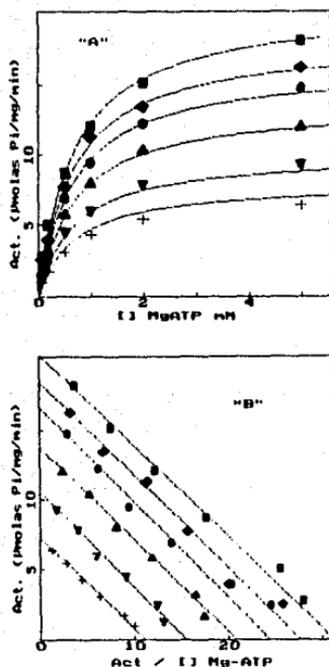


Figura 12. Cinéticas de la ATPasa para MgATP y octil guanidina. Las actividades fueron determinadas con enzima purificada y reconstituida con fosfolípidos, usando el método colorimétrico, pero se obtuvieron resultados similares con los otros métodos y preparaciones. El medio de reacción es MES-TEA 25 mM pH 6.5. Las cantidades totales de Mg y Na_2ATP necesarias para obtener 2.5 mM de Mg^{2+} libre y las concentraciones indicadas de complejo MgATP fueron calculadas como se indicó en materiales y métodos. Las concentraciones de octil guanidina fueron (\blacklozenge) 28, (\bullet) 57, (\blacktriangle) 114, (\blacktriangledown) 228 y ($+$) 342 μM . La figura A es la gráfica directa del experimento, las líneas trazadas son una simulación por computadora utilizando la ecuación para una inhibición no-competitiva. La figura B es una gráfica de Hofstee de los mismos datos, cada línea es resultado de una regresión no lineal independiente sobre la ecuación de Michaelis-Menten.

TABLA 3

tipo de Inhibición	Ecuación Ajustada	σ	Parámetros calculados
competitiva	$V = \frac{V_{max} * S}{(K_m * (1 + I/K_i) + S)}$	1.1	$V_{max} = 17.47$ $K_m = 387$ $K_i = 42$
incompetitiva	$V = \frac{V_{max} * S}{(K_m + S * (1 + I/K_i))}$	0.58	$V_{max} = 22.25$ $K_m = 883$ $K_i = 149$
no competitiva	$V = \frac{V_{max} * S}{(K_m * (1 + I/K_i) + S * (1 + I/K_i))}$	0.26	$V_{max} = 20.67$ $K_m = 660$ $K_i = 217$

TABLA 3. Resultados del ajuste de los datos cinéticos a ecuaciones correspondientes a los tres tipos más comunes de inhibición. Este experimento fue realizado utilizando ATPasa purificada y reconstituida con fosfolípidos. El medio de reacción contenía 25 mM de HEPES, 1mM EDTA y las concentraciones necesarias de $MgCl_2$ y Na_2ATP (calculadas como se indicó en materiales y métodos sección 6) para obtener las concentraciones deseadas de Mg^{2+} libre y complejo Mg-ATP. Las unidades son para la V_{max} μ molas de Pi por mg de proteína por minuto y para la K_m y la K_i en μ M.

tabla 3 para una inhibición no-competitiva. Las líneas de la figura 12B. fueron trazadas utilizando parámetros calculados aplicando regresiones no-lineales sobre la ecuación de Michaelis-Menten para cada concentración de octil-guanidina.

Otros experimentos utilizando membranas completas o la ATPasa en forma

soluble dieron resultados semejantes, aunque los valores obtenidos para la K_i y la V_{max} variaron dependiendo del tipo de preparación empleada. Para la membrana completa los valores fueron $K_i = 250 \mu$ M y $V_{max} = 1.8 \mu$ molas $mg^{-1} min^{-1}$ y para la enzima soluble $K_i = 85$ y $V_{max} = 9.1$ en las mismas unidades.

Adición	Ki observada	
	membranas	ATPasa soluble
Control	296	101
KCl		
90mM	165	85
180mM	110	89
500mM	90	53
Guanidina		
100mM	208	112
MgCl ₂		
2.5mM	295	101
5.0mM	253	112
7.5mM	263	108
10.0mM	263	114
12.5mM	313	121
TEA + PO ₄ ³⁻		
5mM	298	92
20mM	271	92
50mM	248	92

Tabla 4. Efecto de diferentes sales en la Ki para la octil guanidina. Las actividades se determinaron por el método colorimétrico. Los valores de Ki están en μM y fueron calculados a partir de las gráficas de Dixon. Las concentraciones de las sales utilizadas mayores que las mostradas en la tabla inhibieron a la ATPasa y no permitieron la determinación de la Ki.

El ciclo catalítico de la ATPasa implica cambios conformacionales en la enzima (fig 5), y se ha propuesto que estos cambios se reflejan en la polaridad del sitio activo (de Meis y cols., 1988). Por lo tanto, es posible que un inhibidor hidrofóbico actúe sobre el sitio activo únicamente cuando éste se encuentra en una conformación apolar con baja afinidad por el MgATP y alta afinidad por el fosfato. Por esta razón, al estudiar el

posible efecto de un inhibidor sobre el sitio activo de una ATPasa es importante analizar las interacciones cinéticas del inhibidor con el fosfato.

En la tabla 4 se muestra el efecto de concentraciones crecientes de fosfato sobre la Ki observada para la octilguanidina. Los efectos observados fueron muy pequeños, por lo que puede decirse que en nuestro sistema no existió interacción del sitio donde

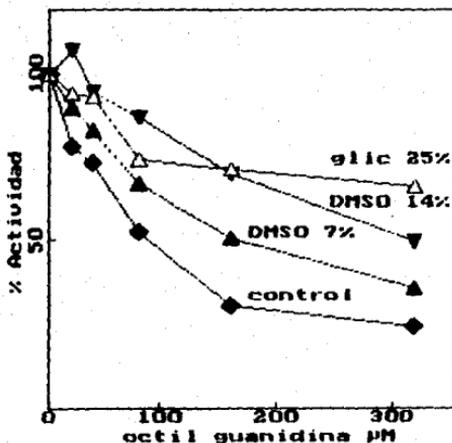


Figura 13. La inhibición por octil guanidina es menor cuando se mide en presencia de solventes. La actividad fue determinada por el método colorimétrico utilizando curvas estándar determinadas en presencia de los solventes. El medio de reacción fue similar al utilizado en la figura 9. La reacción se inició con la adición de la ATPasa. Las actividades están normalizadas para facilitar la comparación, el 100% corresponde a 12.8 molas/mg/min para el control (♦), 10.9 para DMSO 7% (▲), 6.3 para DMSO 14% (▼) y 5.8 para glicerol al 25% (△).

actúa la octil-guanidina con el sitio de unión del fosfato. Tomando en cuenta que la afinidad de la octil-guanidina por la ATPasa parece ser muy elevada, mientras que la del fosfato es muy pequeña, es posible que aunque ambas moléculas compitan por el mismo sitio, el fosfato no pueda desplazar a la guanidina. Por esta razón repetimos el experimento utilizando ahora como inhibidor a

la hexil-amina, los resultados obtenidos fueron muy semejantes.

2.3 Reversión de la inhibición por solventes orgánicos.

La inhibición de la ATPasa inducida por los cationes lipofílicos fue revertida parcialmente al agregar un solvente orgánico al medio de reacción (fig 13). Los resultados se

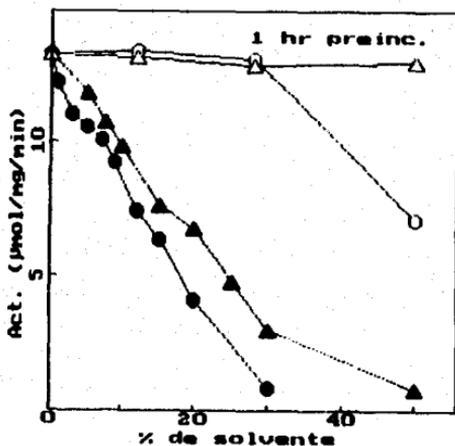


Figura 14. Inhibición de la ATPasa por los solventes. La actividad se determinó igual que en la figura 9. En los símbolos abiertos el solvente se agregó a la enzima, se incubó una hora y posteriormente se tomó una alícuota para determinarle la actividad diluyéndola al menos 20 veces. En los símbolos llenos el solvente se puso en el medio de reacción a las concentraciones indicadas, y se inició la reacción poniendo la enzima. (○, ●) DMSO, (△, ▲) glicerol.

muestran normalizados porque los solventes provocaron por sí mismos una cierta inhibición de la enzima (fig 14). Esta inhibición fue parcialmente reversible, siendo posible recuperar el 100% de la actividad después de incubar la enzima por una hora en 20% de dimetilsulfóxido o en 50% de glicerol. De hecho el amortiguador utilizado para guardar la ATPasa purificada contiene

glicerol al 50% (ver 1.2.1 de esta sección) y al diluirse en el medio de reacción (la concentración final de glicerol es entre 1 y 1.5 por ciento) la enzima recupera su actividad.

Concentraciones mayores de DMSO inactivaron irreversiblemente a la ATPasa. El efecto de concentraciones de glicerol mayores al 50% no fue analizado.

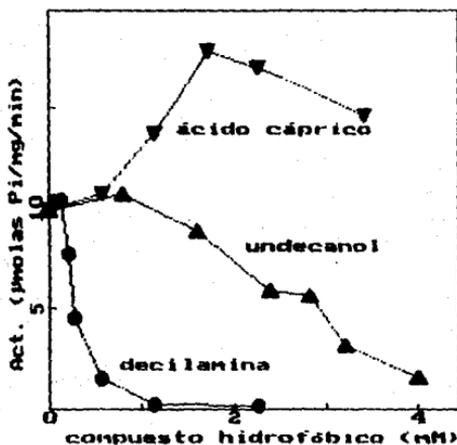


Figura 15. Papel de la carga eléctrica en el efecto de los compuestos anfífilos. Las actividades se determinaron igual que en la figura 9. La enzima utilizada fue ATPasa soluble. Los compuestos se añadieron al medio de reacción como soluciones concentradas en etanol al 50%. Los símbolos son: (▼) ácido cáprico, (▲) undecanol y (●) decilamina.

3 Efecto de la carga eléctrica.

La importancia de la carga eléctrica de los compuestos lipofílicos fue analizada utilizando moléculas que tuvieran la misma cadena lateral pero cuyas cabezas polares tuvieran diferente carga eléctrica; éstas

fueron el ácido cáprico (aniónico), el undecanol (neutro) y la decilamina (catiónico). Los resultados mostrados en la fig. 15 indican que el papel de la carga eléctrica fue decisivo en el efecto de los compuestos probados. A concentraciones pequeñas las moléculas aniónicas se comportaron como activadores de la enzima, los catiónicos - como ya habíamos visto- fueron inhibidores,

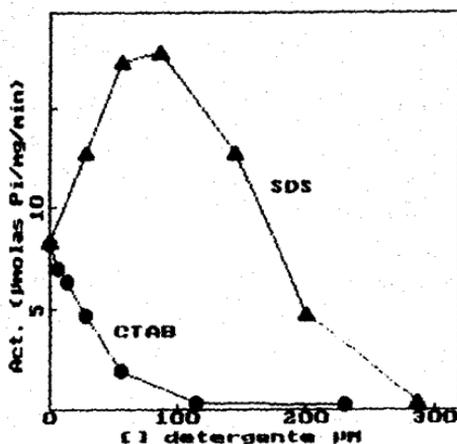


Figura 16. Efecto de dos detergentes con carga diferente sobre la actividad de la ATPasa. Experimento igual al de la figura 14, excepto que los detergentes son fácilmente solubles en agua y no fue necesario disolverlos en etanol al 50%.

mientras que los neutros tuvieron poco efecto.

En la figura 16 podemos ver que otras moléculas anfífilas como los detergentes CTAB y SDS (este último a bajas concentraciones) se comportaron de la misma manera.

El efecto de activación producido por los compuestos aniónicos, al igual que la inhibición ejercida por los catiónicos, fue dependiente de el tamaño de la cadena alifática asociada. Los compuestos con cadenas más largas activaron a menores concentraciones. También, al igual que los

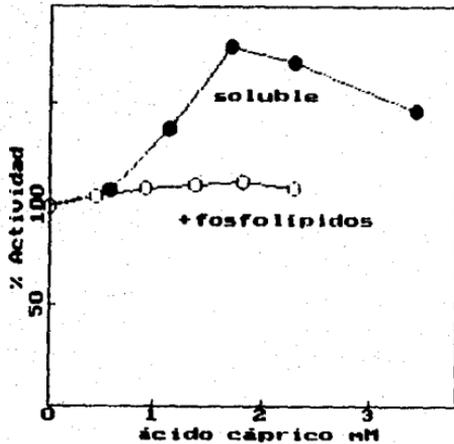


Figura 17. Efecto del ácido cáprico sobre la ATPasa soluble y la reconstituida. Las actividades fueron determinadas como en la figura 9, y fueron normalizadas para facilitar la comparación. Los valores absolutos correspondientes al 100% fueron $7.2 \mu\text{molas/mg/min}$ para la enzima soluble y 11.1 para la reconstituida.

cationes, los aniones lipofílicos tuvieron efectos más pronunciados sobre la preparación soluble que sobre las membranas completas o la enzima reconstituida (fig 17).

4 Al Bajar el pH del medio de reacción la inhibición fue menor.

Uno de los resultados más interesantes fue que la inhibición inducida por los cationes hidrofóbicos fue menor cuando se determinó

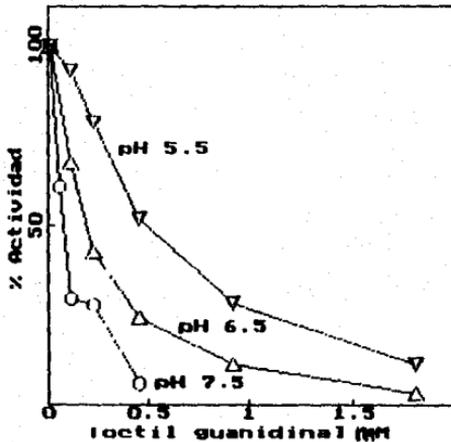


Figura 18. Efecto del pH en la inhibición inducida por la octil guanidina. La actividad fue determinada por el método colorimétrico. Las concentraciones de Mg y Na₂ATP fueron ajustadas para compensar los cambios de ionización del ATP a los diferentes valores de pH.

en un medio de reacción de pH bajo (fig 18). Este resultado abre varias posibilidades que serán analizadas posteriormente.

5 Relación con los cationes inorgánicos.

Dado que se han descrito varios sitios de regulación por iones metálicos sobre la ATPasa, decidimos analizar si la inhibición inducida por los cationes lipofílicos era debida a un efecto de competencia entre los

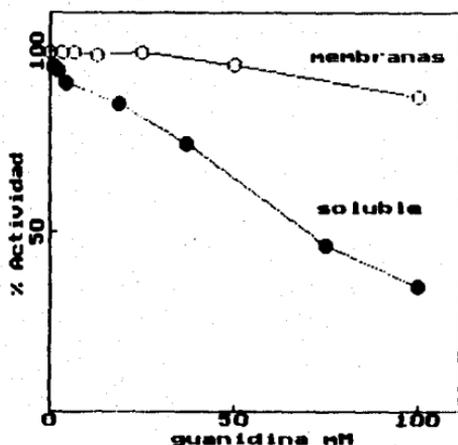


Figura 19. Efecto de la guanidina no sustituida sobre la actividad de ATPasa soluble y unida a membranas. Las actividades fueron determinadas como en la figura 9, y fueron normalizadas para facilitar la comparación. Los valores absolutos correspondientes al 100% fueron $6.2 \mu\text{molas/mg/min}$ para la enzima soluble y 1.2 para las membranas.

cationes hidrofóbicos y los iones metálicos. De ser así, la inhibición inducida por los primeros podría ser modulada por la concentración de los últimos.

Los resultados mostrados en la tabla 4 indicaron que no hubo reversión de la inhibición en la presencia de Mg^{2+} , K^+ o Na^+ . La guanidina no sustituida tampoco revirtió la inhibición, e incluso mostró un pequeño efecto inhibitorio sobre la ATPasa

purificada sin lípidos añadidos (Fig 19), que no se observó en las otras preparaciones.

6 Efecto de diferentes fosfolípidos en la ATPasa

Vista la importancia de la carga eléctrica en el efecto de las moléculas anfífilas sobre la ATPasa decidimos analizar también el

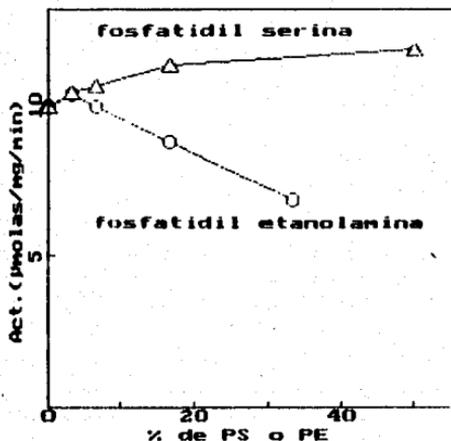


Figura 20. Papel de la carga eléctrica de los fosfolípidos en la actividad de la ATPasa. La actividad de la ATPasa purificada fue determinada en un medio conteniendo 3.1 mg/ml de mezclas de fosfatidil colina con fosfatidil etanolamina (O) o fosfatidil serina (Δ) en las proporciones indicadas. Las actividades se midieron por el método de liberación de fosfato radioactivo.

papel de la carga de los fosfolípidos que se añaden a la ATPasa para recuperar su máxima actividad. Determinamos la actividad de la enzima en un medio con 3.1 mg/ml de fosfolípidos, utilizando diferentes proporciones de fosfatidil serina/fosfatidil colina o fosfatidil etanolamina/fosfatidil colina. Los

resultados de la figura 20 muestran que al igual que con las otras moléculas estudiadas, los fosfolípidos ácidos indujeron una mayor actividad de la enzima.

IV DISCUSION

1 Preparación utilizada.

Uso de la levadura de panadería.

Se utilizó levadura comercial de panificadora. La ventaja de esta levadura es la facilidad de obtenerla en grandes cantidades, lo que es muy importante para iniciar una purificación. La principal desventaja es que es una mezcla de varias cepas en algunas ocasiones contaminada con bacterias. Esto se traduce ocasionalmente en dificultades para reproducir algunos resultados en diferentes lotes de levadura. Sin embargo en el laboratorio hemos encontrado que los resultados reproducibles con levadura de panadería son reproducibles con cepas aisladas.

Purificación de la ATPasa.

Tres grupos de investigación han reportado diferentes métodos para la purificación de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* (Malpartida y Serrano, 1980 y 1981 B; Dufour y cols., 1988 B; y Koland y Hammes, 1986). Sin embargo, las preparaciones reportadas presentan en las electroforesis, además de la banda de ~100Kd que corresponde al polipéptido de la ATPasa, varias bandas de menor peso molecular. Además las actividades específicas son bajas (14-21 molas $mg^{-1} min^{-1}$ según Serrano, 1988 B y Dufour y cols., 1988 B) si se comparan con las obtenidas de otros microorganismos (por ejemplo 45

μ molas $mg^{-1} min^{-1}$ para la ATPasa de *S. pombe* (Dufour y cols., 1988 A)).

En el curso de este trabajo tratamos de obtener una preparación más pura y activa que las descritas en la literatura. La preparación que obtuvimos fue electroforéticamente similar a las reportadas anteriormente (fig 8) y las actividades específicas fueron menores que las reportadas por Malpartida y Serrano (Tabla 2). Sin embargo el método publicado por ellos ha sido difícil de reproducir y en una publicación más reciente Serrano (1988) lo ha modificado para hacerlo muy semejantes al descrito aquí.

La columna de sefarosa-aminohexil que utilizamos para tratar de mejorar la preparación no incrementó los valores de actividad específica obtenidos. Sin embargo, la enzima se unió a la columna y pudo separarse de ella con KCl, como sucede con otras ATPasas (Dreyfus y cols 1984). Consideramos importante mencionar en este trabajo los resultados obtenidos incluyendo los intentos fallidos de mejorar la metodología de manera que en un futuro sea posible superar los problemas y obtener una preparación comparable a las que se describen para otros organismos.

La preparación aquí descrita no es lo bastante pura para utilizarla en los estudios sobre cationes metálicos planteados inicialmente, pues está contaminada con varias proteínas de bajo peso molecular (fig 8). Sin embargo, el método fue muy reproducible y

embargo, el método fue muy reproducible y la enzima obtenida es activa y estable, por lo que la consideramos adecuada para estudiar los efectos de compuestos anfifílicos. Para estos estudios lo que se requiere es una enzima parcialmente delipidada, de manera que su actividad se pueda modular añadiendo fosfolípidos exógenos.

2 Características necesarias para que una molécula lipofílica se comporte como activador o inhibidor de la H^+ -ATPasa.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar las interacciones de los sistemas de membrana con moléculas lipofílicas. Entre los primeros trabajos para abordar este problema en forma general encontramos los realizados por Mazzanti y cols (1986), de Meis y cols. (1988) y Monk y cols. (1989) que han generado resultados bastante interesantes.

En este trabajo analizamos las propiedades que requiere una molécula lipofílica para comportarse como un activador o como un inhibidor sobre la H^+ -ATPasa, y encontramos dos muy importantes, la hidropatía y la carga eléctrica de la molécula; encontramos además que la estructura de la molécula no es tan importante.

2.1 Papel de la hidropatía de los compuestos.

La hidropatía de las moléculas estudiadas afectó la magnitud de los efectos

observados. Los compuestos más hidrofóbicos tuvieron mayor actividad a concentraciones menores que los más hidrofílicos. Esto fue analizado utilizando compuestos que tienen una región polar idéntica, pero cadenas alifáticas de diferentes longitudes (figura 9 A y B). De esta manera pudimos descartar el papel que juega la región polar del compuesto y concentramos en el de la región hidrofóbica.

Las diferencias en el peso molecular de las diferentes cadenas no son suficientes para explicar los efectos observados, porque algunos aminoácidos como la arginina y la histidina que tienen carga eléctrica positiva y pesos moleculares semejantes a los compuestos utilizados en los experimentos de la figura 9, no tuvieron efecto sobre la enzima.

Estos datos confirman lo reportado por otros grupos que han analizado el efecto de varias moléculas catiónicas anfifílicas sobre la depresión de la función cardíaca (Girke y cols, 1989), la fosfolipidosis en los pulmones (Joshi y cols, 1989), la actividad de la acetilcolinesterasa de eritrocitos (Mazzanti y cols, 1986) y la bomba de calcio de retículo sarcoplásmico (Petretski, 1989). En esos estudios las propiedades lipofílicas de las drogas utilizadas se determinaron mediante calorimetría diferencial de barrido, fluorometría, resonancia paramagnética electrónica y solubilidad en agua y solventes orgánicos.

Otros datos que confirman la importancia de la hidrofobicidad de los compuestos son los de la figura 13, donde se observa que se requieren mayores concentraciones de octilguanidina para inhibir a la enzima en presencia de los solventes orgánicos.

Este efecto fue descrito anteriormente por de Meis y cols. (1988) y se ha explicado indicando que, en presencia de un solvente orgánico, los compuestos hidrofóbicos pueden permanecer en el medio de reacción y distribuirse menos hacia las regiones hidrofóbicas de la enzima.

Sin embargo existen otras explicaciones alternativas como serían los cambios en la carga de superficie de las membranas y en los estados de ionización de diferentes grupos de la enzima al variarse la constante dieléctrica del medio, y las alteraciones en la estructura tridimensional de las enzimas inducidas por los solventes (Beharry y Bragg, 1989), que pueden afectar la afinidad de éstas por los inhibidores. Estas alternativas son mas importantes si se recuerda que los solventes **per se** inhiben a la enzima (fig 14) lo que indica que de alguna manera estan alterándola.

2.3 Papel de la carga eléctrica.

La carga eléctrica de los compuestos tuvo un papel cualitativo. A concentraciones moderadas los compuestos con carga eléctrica positiva fueron inhibidores, los compuestos negativos fueron activadores de la enzima y los neutros tuvieron un efecto intermedio (Fig 15). Para estos experimentos utilizamos compuestos con estructura muy sencilla, de manera que fuera posible descartar interacciones específicas entre alguna parte de la molécula y la enzima, y lo más relevante en ellos fuera la carga eléctrica y el tamaño de las cadenas alifáticas. Al igual que las aminas (fig 9B) los ácidos grasos con cadenas alifáticas mas pequeñas tuvieron menor efecto (dato no mostrado), y que otros compuestos con estructuras más complejas, probados en este estudio, se compor-

taron de acuerdo a este patrón (figuras 9A, 16 y 17).

2.4 Papel de la estructura de la región polar

La estructura de la región polar de los compuestos modificó el efecto observado aunque en forma menos notoria que la hidropatía. Por ejemplo las guanidinas fueron mas potentes que las aminas primarias con la misma cadena alifática, teniendo ambos compuestos carga eléctrica positiva.

Se observó que las guanidinas son mas solubles mientras que las aminas tienden a precipitarse aunque utilizemos como solventes etanol, dimetil formamida o dimetil sulfoxido o diferentes mezclas de estos y agua. Por lo que el menor efecto observado al igual que el comportamiento no lineal en las graficas de Dixon (Fig. 10) podrían deberse a las diferencias de solubilidad. Se requieren estudios mas completos para saber si es esa la explicación de los resultados observados.

3 Posibles interacciones entre las moléculas lipofílicas y la H⁺ ATPasa.

Las diferentes posibilidades contempladas en este trabajo para explicar los efectos de las moléculas anfífilicas sobre la H⁺ ATPasa se encuentran esquematizadas en la figura 21, y serán explicadas a continuación. Es importante mencionar que es posible que ninguna de las hipótesis propuestas en este trabajo sea suficiente para explicar todos los fenómenos observados. El mecanismo operante en ese caso

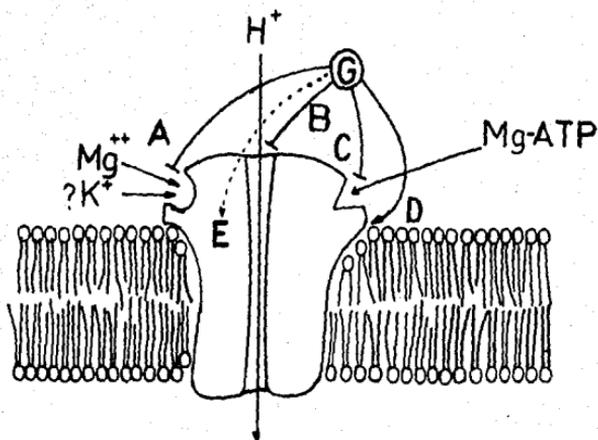


Figura 21. Posibles interacciones entre las moléculas anfifílicas y la ATPasa.

- A. Competencia con los sitios de regulación para cationes inorgánicos.
- B. Bloqueo de los sitios de transporte.
- C. Bloqueo del sitio activo.
- D. Alteración de las interacciones proteína fosfolípido.
- E. Interacciones múltiples e inespecíficas.

podría ser una mezcla de varias de ellas, e inclusive de otras no mencionadas aquí.

3.1 Competencia con los cationes inorgánicos.

La actividad de hidrólisis de la ATPasa está modulada varios cationes metálicos. Los principales son el Mg^{2+} libre que es un activador esencial a bajas concentraciones ($<500 \mu M$) y un inhibidor pseudocompetitivo a concentraciones mayores (Ahlers, 1981) y los cationes monovalentes que incrementan

la actividad de la enzima (Olivera, 1986). Dado que los compuestos inhibidores fueron de naturaleza catiónica, sería posible que los cationes lipofílicos inhibieran a la enzima desplazando los cationes metálicos de sus sitios regulatorios (fig 21A). Esta alternativa quedó prácticamente descartada al no observarse ninguna interacción cinética entre las moléculas lipofílicas y los cationes inorgánicos.

3.2 Competencia con el protón por el sitio de transporte.

Otra explicación podría ser que los compuestos catiónicos bloqueen el sitio donde se unen los protones para ser transportados por la enzima a través de la membrana (fig 21B). En este caso los compuestos más lipofílicos deben tener más problemas para atravesar el canal hidrofílico de la enzima, lo cual explicaría el patrón de inhibición observado al utilizar compuestos con cadenas alifáticas de diferentes tamaños (fig 9). Esta posibilidad fue propuesta inicialmente por Peña (1973 y 1975) para explicar la inhibición competitiva que ejercen las guanidinas sobre el transporte de potasio en las levaduras.

Un dato que apoya esta hipótesis es que la ATPasa mostró menor afinidad por la octilguanidina cuando se determinó la inhibición a bajo pH (fig 18). Esto fue un poco inesperado, porque no se había observado ninguna interacción cinética de las drogas hidrofóbicas con otros cationes inorgánicos (Tabla 4). Más aún, los resultados sugieren que el sitio de acción de estas drogas debe estar embebido en un ambiente hidrofóbico y por lo tanto, no debería ser accesible a los protones.

De cualquier forma, es importante tomar con cautela este resultado porque los cambios en el pH también modifican los estados de ionización de muchos otros sitios de la enzima y de otras moléculas presentes. Esta hipótesis sería más fácil de comprobar utilizando una enzima que transporte otros iones, como las ATPasas de calcio o de sodio-potasio.

3.3 Bloqueo del sitio activo.

La posibilidad de que las moléculas hidrofóbicas inhiban a las ATPasas bloqueando el sitio activo (fig 21C) fue propuesta por de Meis y cols (1988), basado en el hecho de que el sitio activo de estas enzimas debe tener propiedades hidrofóbicas durante algunos pasos del ciclo catalítico. Además el sitio activo de las ATPasas tipo P tiene un aspártico lo que le confiere una naturaleza aniónica.

Recientemente se ha propuesto un mecanismo de este tipo para explicar la inhibición de la acetilcolinesterasa de eritrocitos por drogas anfífilas, basándose en evidencias cinéticas y en el hecho de que estas drogas afectan la actividad de la enzima a concentraciones a las que no se altera el estado físico del ambiente lipídico (Spinedi y cols, 1989).

Los resultados en favor de esta hipótesis son: la mayor inhibición inducida por los compuestos más hidrofóbicos comparados con los hidrofílicos, la menor inhibición observada en presencia de solventes orgánicos y las diferencias encontradas entre los compuestos catiónicos y los neutros, que indican la naturaleza hidrofóbica y aniónica de los sitios donde las drogas interactuaron con la enzima. Los resultados en contra son la falta

de competencia entre las drogas lipofílicas y el complejo Mg-ATP o el fosfato inorgánico, que indican que las moléculas hidrofóbicas no interactúan con el sitio activo de la enzima.

3.4 Interacción con múltiples sitios inespecíficos.

Otra posibilidad es que los compuestos interactúen con un número muy grande de sitios inespecíficos de la enzima inestabilizando su estructura tridimensional. Estos sitios pueden además tener diferentes afinidades.

Esta idea fue propuesta por Adade y cols (1987) para explicar el efecto de la tetracaína (un anestésico local) sobre la $F_1ATPasa$ de mitocondria, donde se sabe que al menos 60 moléculas del anestésico se unen por molécula de ATPasa, y se ha encontrado que la inhibición de la enzima es proporcional a la fracción de sitios de unión que estén ocupados por la tetracaína. Para el caso de los cationes lipofílicos utilizados en nuestro estudio no se ha hecho ningún estudio para determinar la estequiometría de las interacciones con las ATPasas, ese estudio sería muy importante para entender el mecanismo de acción de estos compuestos.

Esta hipótesis podría explicar las complejas cinéticas de inhibición (fig 10) que aunque se han descrito anteriormente (Barzu y cols, 1987), no han sido explicadas. Las cinéticas complejas también podrían explicarse como artificios debidos a problemas de solubilidad de los compuestos y a problemas para controlar la concentración de los mismos en presencia de varias fases (agua, lípido y proteína) hacia las cuales pudieran tener diferentes coeficientes de partición.

3.5 Alteración de las interacciones proteína-fosfolípidos.

La última posibilidad contemplada en este estudio -que nos parece la más factible- es que los compuestos lipofílicos inhiban a la ATPasa alterando las interacciones entre la enzima y los lípidos de la membrana (fig 21D). Estas interacciones se pueden clasificar en dos tipos: el primero es el efecto de las propiedades básicas de las membranas como fluidez y carga de superficie sobre la actividad de las proteínas; el segundo son los efectos específicos de algunos fosfolípidos sobre las enzimas. Los compuestos utilizados en este estudio podrían alterar ambos tipos de interacciones.

Los efectos de las propiedades básicas se han analizado en experimentos de reconstitución donde las enzimas se incorporan en liposomas a los que se varía la proporción de lípidos ácidos, neutros y básicos modificando la carga eléctrica de la membrana; o la longitud y grado de saturación de los ácidos grasos, con lo que se modifica la fluidez (Eytan y Broza, 1978; Ottolenghi, 1979; Carafoli, 1984; Serrano y cols, 1988; Rajan y cols, 1989; Rossi y Rega, 1989). Estos estudios han demostrado que diferentes enzimas pueden tener muy variados requerimientos en cuanto a la carga eléctrica y fluidez de las membranas.

Otro enfoque para estudiar estos efectos ha sido utilizar microorganismos con mutaciones que les impiden sintetizar ácidos grasos o las bases de los fosfolípidos, de manera que variando el tipo y concentración de estos compuestos en el medio de cultivo se puede variar la composición de las membranas. Estos estudios han demostrado que el transporte de azúcares y

aminoácidos y la actividad de muchas enzimas se ven alterados al variar la composición lipídica (Trivedi y cols, 1982).

Los efectos específicos de los fosfolípidos se han estudiado añadiendo estos en sistemas delipidados o bien con resonancia de espín. Como ejemplo de estas interacciones podemos citar el control que ejerce el 1,2-diacilglicerol sobre la proteína cinasa C (Downes y Michell, 1985), las interacciones de algunos fosfolípidos con la ATPasa de calcio de retículo (Marsh, 1987) y los efectos de inositol monofosfato (Memon y cols, 1989) y algunos esteroides (Sandstrom y Cleland, 1989) sobre las ATPasas de plantas.

Los datos en favor de esta hipótesis son:

Primero, el que los compuestos más hidrofóbicos tuvieron mayores efectos sobre la enzima (fig 9), lo cual apoya esta hipótesis dada la naturaleza hidrofóbica de las interacciones enzima membrana.

Segundo, el patrón observado con respecto a la carga eléctrica de los compuestos anfifílicos, que coincide con los requerimientos de lípidos mostrados por la ATPasa, ya que para obtener una actividad específica más alta es conveniente agregar fosfolípidos ácidos a los amortiguadores utilizados en el procedimiento de purificación (Serrano, 1988 y Koland y Hammes, 1986). Además nosotros encontramos que la enzima delipidada funcionó con mayor velocidad cuando se añadieron fosfolípidos ácidos al medio de reacción que cuando se añadieron fosfolípidos zwitteriónicos (fig 20).

Y tercero, el menor efecto que estos compuestos ejercieron sobre las membranas intactas o sobre la ATPasa reconstituida al compararlo con los ejercidos

sobre la enzima soluble (figs 11 y 17). En los primeros casos los lípidos asociados a la enzima pueden ejercer un efecto de competencia, mientras que en la enzima soluble los sitios de unión de los fosfolípidos estarán más expuestos.

En contra de esta hipótesis el único dato que hemos encontrado es que la F_1 ATPasa de mitocondria siendo una enzima que no interactúa directamente con la membrana también se inhibe con las alquilguanidinas (Tuena y cols, 1977 A y B) y otros alquil cationes (Barzu y cols, 1989).

4. Perspectivas.

4.1 Sobre la purificación.

Hemos presentado algunas alternativas a los métodos de purificación descritos anteriormente. Entre ellas consideramos que sería interesante estudiar las que ofrecen el uso de la columna de sefadex G-400 para sustituir el gradiente de glicerol que consume mucho tiempo, y la columna de sefarosa hexilamina utilizando la cual consideramos posible obtener una preparación de la ATPasa libre de las proteínas de bajo peso molecular que contaminan las descritas hasta ahora.

4.2 Sobre las interacciones de los compuestos anfifílicos con la ATPasa.

Este es un campo que ofrece muchas posibilidades, entre ellas están:

El análisis de la estequiometría de la interacción entre la enzima y los compuestos lipofílicos. Para estudiar esta existe el problema de que se debe tomar en cuenta la

unión de los compuestos a los fosfolípidos que tiene la enzima, de cualquier manera su estudio es muy importante para comprender los mecanismos moleculares de la inhibición de la ATPasa.

Estudiar en forma directa la interacción enzima-inhibidor. Esto se puede hacer

utilizando inhibidores y fosfolípidos a los que se les hayan unido marcadores para resonancia paramagnética o para fluorescencia.

V CONCLUSIONES

1. La preparación de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de la levadura *S. cerevisiae* de que disponemos actualmente es comparable con las descritas en la literatura.
2. El efecto de los compuestos anfífilicos sobre la ATPasa dependen de la carga eléctrica de la región polar. Los compuestos aniónicos activan a la enzima; los catiónicos la inhiben y los neutros tienen un efecto intermedio.
3. Los compuestos más hidrofóbicos -tanto aniónicos como catiónicos- tienen mayores efectos y a concentraciones más bajas que los más hidrofílicos.
4. La estructura de las regiones polares tiene un efecto menos importante que la hidropatía y la carga eléctrica.
5. El modelo más aceptable para explicar los efectos de los compuestos anfífilicos sobre la ATPasa es una alteración de las interacciones de la enzima con los lípidos de la membrana. Otra posibilidad es que exista una interacción entre los compuestos y el sitio activo de la enzima o el sitio de unión del catión transportado.
6. Probablemente ninguno de los modelos mencionados sea suficiente para explicar todos los fenómenos relacionados con las interacciones entre las moléculas anfífilicas y las enzimas de membrana que se han descrito. En ese caso la explicación podría ser que varios de estos mecanismos ocurran simultáneamente.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Adade, B. A., O'Brien, K. L. and Vanderkooi, G. (1987). Temperature dependence and mechanism of local anesthetic effects on mitochondrial Adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* 26, 7297-7303.
- Addison, R. y Scarborough, G. A. (1981). Solubilization and purification of the *Neurospora* plasma membrane H^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 256,24,13165-13171.
- Ahlers, J. (1981). Temperature effects of kinetic properties of plasma membrane ATPase from the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*; *B. B. Acta*, 649,550-556.
- Ahlers, J. (1984). Effects of different salts on the plasma membrane ATPase and on proton transport in yeast; *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62,998-1005.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, Roberts, K. and Watson, J. D. (1983) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. New York & London.
- Askelof P., Korsfeldt M. and Mannervik B. (1979). Error Structure of Enzyme Kinetic Experiments: implications for weighting in regression analysis of experimental data; *Eur. J. Biochem.* 69, 61-67.
- Barzu, O., Guerrieri, F., Scarfo, R., Capozza, G. and Papa, S. (1989). Effect of cetyltrimetilammonium on ATP hydrolysis and proton translocation in the FO-F1 H^+ -ATP synthase of mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21, 403-414.
- Beharry, S. and Bragg, P. D. (1989) Conformational change in beef-heart mitochondrial F_1F_0 ATPase to ATP synthase mode induced by dimethylsulfoxide and ATP revealed by sulfhydryl group labeling; *FEBS Letters* 253, 1 y 2, 276-280.
- Blasco, F., Chapuis, J. P. and Giordani, R. (1981). Characterization of the plasma membrane ATPase of *Candida tropicalis*; *Biochimie*, 63, 507-514.
- Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1981). Ion transport in yeast. *Biochim. et Biophys. Acta.* 650,88-97.
- Borst-Pauwels, G. W. F. H. and Peters P. H. J. (1981). Factors affecting the inhibition of yeast plasma membrane ATPase by vanadate. *B. B. Acta* 642,173-181.
- Bowman, B. J. and Slayman, C. W. (1979). The effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*; *J. Biol. Chem.* 254, 8, 2928-2934.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein by the principle of protein dye binding; *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Caccesi, M. S. and Cachéris, W. P. (1984). Fitting curves to data, the simplex algorithm is the answer; *Byte*, May 340-362.
- Calahorra, F. M. (1986). Generación de pH y transporte de K^+ y Ca^{2+} en vesículas de

membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*; Tesis de Maestría. UNAM. México.

Carafoli, E. (1988). Calmodulin-sensitive calcium-pumping ATPase of plasma membranes: isolation, reconstitution and regulation; *Fed. Proc.* 43, 15, 3005-3010.

Chou, P. D. and Fasman, G. D. (1978) Empirical predictions of protein conformation. *Annu. Rev. Biochem.* 47, 251-276.

Davis, C. B. and Hammes, G. G. (1989). Topology of the yeast plasma membrane proton-translocating ATPase; *J. Biol. Chem.* vol. 264, 1, 370-374.

de Meis, L. and Carvalho, M. G. C. (1974) Role of the Ca^{2+} concentration gradient in the adenosine 5'-triphosphate-inorganic phosphate exchange catalized by sarcoplasmic reticulum; *Biochemistry* 13, 24, 5032-5038.

de Meis, L. (1989). Role of water in the energy of hydrolysis of phosphate compounds - energy transduction in biological membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* 973, 333-349.

de Meis, L., Tuena de Gómez puyou, M and Gómez puyou, A. (1988). Inhibition of mitochondrial F_1F_0 ATPase and sarcoplasmic reticulum ATPase by hydrophobic molecules; *Eur. J. Biochem.* 171, 343-349.

Delhez, J., Dufour, J. P., Thines, D. and Goffeau, A. (1977). Comparison of the properties of Plasma membrane-bound and mitochondria-bound ATPases; *Eur. J. Biochem.* 79, 319-328.

Downes, C. P. and Michell, R. H. (1985) Inositol phospholipid breakdown as a receptor-controlled generator of second messengers.

En Molecular mechanisms of transmembrane signalling. Conen and Houslay (eds.) Elsevier Science Publishers B. V. pp. 3-48.

Dreyfus, G., Celis, H. and Ramirez, J. (1984). Isolation of the mitochondrial F_1F_0 adenosine triphosphatase by sepharose-hexilammonium chromatography: properties and reconstitution in liposomes. *Anal. Biochem.* 142, 215-.

Dufour, J. and Tsong, T. Y. (1982 A). ATP-dependent proton pumping catalized by the purified yeast plasma membrane ATPase reconstituted into phospholipid vesicles; *Biophys. J.* 37, 96-97.

Dufour, J. Goffeau, A. and Tsong, T. Y. (1982 B). Active proton uptake in lipid vesicles reconstituted with the purified yeast plasma membrane ATPase; *J. Biol. Chem.* 257, 16, 9365-9371.

Dufour, J. P. and Goffeau, A. (1978). Solubilization by lyssolecithin and purification of the Yeast *Schizosaccharomyces pombe* plasma membrane ATPase; *J. Biol. Chem.* 258, 19, 7026-7032.

Dufour, J. P., Boutry, M. and Gouffeau, A. (1980). Plasma membrane ATPase of yeast; *J. Biol. Chem.* 255, 12, 5735-5741.

Dufour, J., Amory, A. and Goffeau A. (1988 A) Plasma membrane ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in enzymology* 157, 513-528.

Dufour, J., Amory, A. and Goffeau A. (1988 B) Plasma membrane ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in enzymology* 157, 528-533.

Eddy, A. A. and Indge, K. J. (1962). The dependence of aminoacid transport in yeast

on both, energy supply and intracellular potassium ions; *Biochem J.* 82, 15-17.

Eilam, Y. (1984). Effects of phenothiazines on inhibition of plasma membrane ATPase and hyperpolarization of cell membranes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; *B. B. Acta* 769, 601-610.

Eytan, G. D. and Broza, R. (1978) Role of charge and fluidity on the incorporation of cytochrome oxidase into liposomes. *J. Biol. Chem.* 253,9, 3196-3202.

Fabiato, A. and Fabiato, F. (1979). Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells; *J. Physiol., Paris* 75, 463-505.

Fasman, G. D. (1989) Protein conformational prediction. *TIBS* 14, 7, 295-299.

Fiske, C. A. and Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.* 177, 751-766.

Foury, A., Amory, A. and Gouffeau, A. (1981). Large scale purification and phosphorylation of a detergent-treated Adenosine Triphosphatase complex from plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* 119,395-400.

Franzoso, A. J. and Cirillo, V. P. (1983). Glucose transport activity in isolated plasma membrane vesicles from *Saccharomyces cerevisiae*; *J. Biol. Chem.* 258, 6, 3608-3614.

Fuhrmann, G. F. (1974). Preparation and identification of yeast plasma membrane vesicles; *B. B. Acta* 363, 295-310.

Gage, R. A., Van Wijngaarden, W. Theuvenet, A. P. R., Borst-Pauwels, G. W. F. H. and Verleij, A. J. (1985) Inhibition of Rb^+ uptake in yeast

by Ca^{2+} is caused by a reduction in the surface potential and not in the Donnan potential of the cell wall. *B. B. Acta* 812, 1-8.

George, R., Lewis, R. N. A. H., Mahajan, S. and McElhaney, R. N. (1989) Studies on the purified, lipid-reconstituted $(Na^+ + Mg^{2+})$ -ATPase from *Acholeplasma laidlawii* B membranes; *J. Biol. Chem.* 264, 20, 11598-11604.

Girke, S., Mohr, K. and Schrape, S. (1989) Comparison between the activities of cationic amphiphilic drugs to affect phospholipid-membranes and to depress cardiac function. *Biochem. Pharmacol.* 38, 15, 2487-2496.

Goffeau, A. and Dufour, J. (1988 B) Plasma membrane ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Enzymology* 157 [39], 529-533.

Goffeau, A. and Slayman, C. W. (1981). The proton translocating ATPase of the fungal plasma membrane; *B. B. Acta.* 639, 197-223.

Harold, F. M. (1986) *The vital force: a study of bioenergetics*; W. H. Freeman and Company New York.

Joshi, U. M., Kodavanti, P. R. S., Lockard, V. G. and Mehendale H. M. (1989). Fluorescence studies on binding of amphiphilic drugs to isolated lamellar bodies: relevance to phospholipidosis. *B. B. Acta.* 1004, 309-320.

Kakinuma, Y., Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1981). Properties of H^+ -translocating Adenosine Triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*; *J. Biol. Chem.* 256, 21, 10859-10863.

Koland, J. G. and Hammes, G. G. (1986) Steady state kinetic studies of purified yeast

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA
Bibliografía DE CTA

plasma membrane protontranslocating ATPase. *J. Biol. Chem.* 261 (13), 5936-5942.

Kolarov, J., Kulpa, J. and Goffeau, A. (1988) *J. Biol. Chem.* vol. 263, 22, 10613-10619.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)*, 227, 680-685.

Lis, H. and Sharon, N. (1986). Lectins as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.* 55, 53-67.

Lowry, O. H. (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent; *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Malhotra, S. K. (1983) *Plasma Membrane*. Ed Malhotra, S. K. John Wiley & Sons. Cap 15, 123-132.

Malpartida, F. and Serrano, R. (1980). Purification of the yeast plasma membrane ATPase solubilized with a novel zwitterionic detergent; *FEBS letters* 111, 69-72.

Malpartida, F. and Serrano, R. (1981 A). Phosphorylated intermediate of the ATPase from plasma membrane of yeast; *Eur. J. Biochem.* 116, 2, 413-417.

Malpartida, F. and Serrano, R. (1981 B). Reconstitution of the proton-translocating Adenosine Triphosphatase of Yeast plasma membranes; *J. Biol. Chem.* 256, 9, 4175-4177.

Marsh, D. (1987) Selectivity of lipid-protein interactions. *J. Bioenerg. Biomemb.* 19, 6, 677-689.

Matile, P. (1970). Properties of the purified cytoplasmic membrane of yeast *Rhodotorula gracilis*; en *Membranes structure and func-*

tion, *FEBS Symp.* vol. 20, pp. 39-49. Academic Press. London and N. Y.

Matile, P., Moor, M. and Muhlethaler, K. (1967). Isolation and properties of the plasmalemma in yeast; *Arch. Mikrobiol.* 58, 201-211.

Memon, A. R., Chen, Q. and Boss, W. F. (1989) Inositol phospholipids activate plasma membrane ATPase in plants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162, 3, 1295-1301.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism; *Nature* 191, 144-148.

Montal, M. (1974) La membrana y la evolución prebiótica. En *Los perfiles de la bioquímica en México*. Eds. Mora, J., Estrada, S. y Martuschell, J. Edic. UNAM. p321-333.

Neugebauer, J. (1987) A guide to the properties and uses of Detergentes in biology and biochemistry. Publicado por CALBIOCHEM Brand Biochemicals. La Jolla CA.

Nurminen, T., Oura, F. and Suolomainen, H..(1970). The enzymic composition of the isolated cell wall and plasmamembrane of bakers yeast; *Biochem J.* 116, 61-69.

Nurminen, T., Taskinen, L. and Suolomainen, H..(1976). Distribution of membranes especially the plasmamembrane fragments during zonal centrifugation of homogenates from glucose repressed *Saccharomyces cerevisiae*; *Biochem. J.* 154, 751-763.

Olivera, H. (1987) Inhibición por Ca^{2+} de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de licenciatura, Inst. de Fisiol. Cel. UNAM, Mexico.

- Ottolenghi, P. (1979) The relipidation of delipidated Na,KATPase. An analysis of complex formation with dioleoylphosphatidylcholine and with dioleoylphosphatidylethanolamine. *Eur. J. Biochem.* 99, 113131.
- Pedersen, P. L. and Carafoli, E. (1987). Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function; *TIBS* 12, 4, 146-150.
- Peña, A. (1975). Studies on the Mechanism of K^+ Transport in Yeast; *Arch. of Biochem. and Biophys.* 167, 197-409
- Peña, A., Cinco, G., García, A., Gomez-Puyou, A. and Tuena, M. (1967). Effects of externally added sodium and potassium ions on the glycolytic sequence of *Saccharomyces cerevisiae*; *B. B. Acta.* 148, 673-682.
- Peña, A., Cinco, G., Gomez-poyou, A. and Tuena, M. (1969). Studies on the mechanism of the stimulation of glycolysis and respiration by K^+ in *Saccharomyces cerevisiae*; *B. B. Acta.* 189, 1-8.
- Peña, A., Cinco, G., Gomez-Puyou, A. and Tuena, M. (1972). Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*; *Arch. Biochem. Biophys.* 153, 413-425.
- Peña, A. (1973). Studies with Guanidines on the Mechanism of K^+ Transport in Yeast; *FEBS Letters* 34, 1, 117-119,
- Peters, P. H. J. and Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1979). Properties of plasmamembrane ATPase and mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*; *Physiol. Plant.* 46, 330-337.
- Petretski, J. H., Wolosker, H. and de Meis, L. (1989). Activation of Ca^{2+} uptake and inhibition of reversal of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump by aromatic compounds. *J. Biol. Chem.* 264, 34, 20339-20343.
- Phillips, R. and Clark, H. T. (1923). *J. Am. Chem. Soc.* 45, 175.
- Pressman, B. C. (1963). The effects of Guanidine and Alkylguanidines on the energy transfer reactions of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 238, 401-109.
- Rose, A. H. and Harrison J. S. (1987) *The Yeast* Vol. II. 2nd. Ed. Academic Press Inc. (London) Ltd.
- Rose, A. H. and Harrison J. S. (1989) *The Yeast* Vol. III. 2nd. Ed. Academic Press Inc. (London) Ltd.
- Sandstrom, R. P. and Cleland, R. E. (1989) Selective delipidation of the plasma membrane with surfactants. Enrichment of sterols and activation of ATPase. *Plant. Physiol.* 90, 1524-1531.
- Serrano, R. (1978). Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces*; *Mol. Cell. Biochem.* 22, 51-63.
- Serrano, R. (1980). Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast; *Eur. J. Biochem.* 105, 419-424.
- Serrano, R. (1983). In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase; 156, 11-14.
- Serrano, R. (1988 A). The plasma membrane ATPase of plants and fungi; *Biochem. Biophys. Acta* vol.947, 1-28.
- Serrano, R. (1988 B) H^+ -ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces*

cerevisiae and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution. *Methods in Enzymology* 157 [40], 533-545.

Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C. and Fink, G. R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with $(\text{Na}^{++}/\text{K}^{+})$, K^{+} - and Ca^{2+} -ATPases. *Nature* Vol. 319, 689-693.

Serrano, R., Montesinos, C. and Sanchez, J. (1988) Lipid requirements of the plasma membrane ATPases from Oat roots and yeast. *Plant Sci.* 56, 117-122.

Sillen, L. G. and Martell, A. E. (1971). Stability constants for metal-ligand complexes. Supplement 1. The chemical Society. London and New York.

Singer, S. J. and Nicolson, G. L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720-731.

Slavik, J. and Kotyk, A. (1984). Intracellular pH Distribution and Transmembrane pH Profile of Yeast Cells; *B. B. Acta.* 766, 679-684

Smith, K. E. and Hammes, G. G. (1988). Studies of the phosphoenzyme intermediate of the yeast plasma membrane proton-translocating ATPase; *J. Biol. Chem.* vol. 263, 27, 13774-13778.

Spinedi, A., Pacini, L. and Luly, P. (1989) A study of the mechanism by which some amphiphilic drugs affect human eritrocite acetylcholinesterase activity. *Biochem. J.* 261, 569-573.

Stein, W. D. (1986) Transport and Diffusion across Cell Membranes. Academic Press, Inc. S. D. Cal.

Suomalainen, H. and Oura, E. (1971). Yeast nutrition and solute uptake in *The Yeast* Vol.

2 Physiology and Biochemistry of yeasts. Rose and Harrison editors. Academic Press. London and N. Y.

Tanford, C. (1983) Mechanism of free energy coupling in active transport; *Ann. Rev. Biochem.* vol. 52, 379-409.

Trivedi, A., Khare, S., Singhal, G. S. and Prasad, R. (1982) Effect of phosphatidylethanolamine enrichment on the structure and function of yeast membrane. *B. B. Acta*, 692, 202-209.

Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A. and Salmon, M. (1977a). Action of alkyl cations and the natural ATPase inhibitor from mitochondria on soluble mitochondrial ATPase. *B. B. Acta* 461, 101-108.

Tuena de Gomez-Puyou, M., Gomez-Puyou, A. and Salmon, M. (1977b). On the mechanism of action of alkylguanidines in oxidative phosphorylation: their action on soluble F_1 . *Arch. Biochym. Biophys.* 173, 326-332.

Uchida, E., Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1985). Purification and properties of the H^{+} -translocating, Mg^{2+} Adenosine Triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*; *J. Biol. Chem.* 260, 2, 1090-1095.

Ulaszewski, S., Balzi, E. and Goffeau, A. (1987). Genetic and molecular mapping of the *pma1* mutation conferring vanadate resistance to the plasma membrane ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 207, 38-46.

Villalobo, A. (1984). Energy dependent H^{+} and K^{+} translocation by the reconstituted yeast plasma membrane ATPase. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 865-877.

Villalobo, A., Boutry M. and Goffeau A..(1981). Electrogenic proton translocation coupled to ATP hidrolisis by the plasma membrane Mg^{2+} -dependent ATPase of yeast in reconstituted proteoliposomes; J. Biol. Chem. 250, 23, 12081-12087.

Villalobo, A..(1982). Potassium transport coupled to ATP hydrolysis in reconstituted proteoliposomes of yeast plasma membrane ATPase; J. Biol. Chem. 257, 4, 1824-1828.

Willsky, G. R..(1979). Characterization of the plasma membrane Mg^{2+} ATPase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*; J. Biol. Chem. 254, 9, 3326-3332.