

03062 20
20



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

**Caracterización de la Modificación Química en la
ATPasa de *Kluyveromyces lactis* por Carbodiimidias**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRIA EN INVESTIGACION

BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

BIOL. MA. ISABEL VELAZQUEZ LOPEZ

MEXICO D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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 esta 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.

Agradecimientos

A los sinodales la Dra. Marina Gavilanes Ruíz, el Dr. Edmundo Chávez Cosío, el Dr. Mario Calcagno Montáns, el Dr. Armando Gómez Puyou y el Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, por sus comentarios durante la revisión del manuscrito y su ayuda para mejorarlo.

Al Dr. Juan Pablo Pardo, por su confianza y apoyo en los momentos difíciles del trabajo.

A mis tutores, el Dr. Federico Martínez Montes y el Dr. Georges Dreyfus Cortés, por su ayuda durante la realización de la maestría.

A todos los compañeros del laboratorio 7 de la Facultad de Medicina: Oscar, Tere, Aida, Juan Pablo, Federico, Juan Luis, por el azúcar y la sal de estos años.

A Jorge... "Todo el Amor".

A mis amigos: Toly, Elena, Edgar, Emma, Enriqueta, Jorge, Luz, Rogelio...porque la amistad es el mejor de los negocios.

A todos los compañeros del Instituto: José, Alejandro, Ernesto, Manuel, Vicente, Pedro, Ma. Elena, Ember, Miriam, Bertha, Marcela, Rocio, Lourdes, por la buena experiencia de conocerlos.

A la siempre grata compañía de Joaquín Sabina.

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Federico Martínez Montes, bajo la dirección del Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, de la UNAM.

Durante la realización de los estudios de Maestría, recibí apoyo mediante una beca de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico y un complemento de la beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con el número de registro: 83963.

El presente trabajo de tesis es parte del proyecto de investigación el cual fue apoyado con el donativo IN20094 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico.

Indice

RESUMEN

ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La ATPasa de H ⁺ tipo P de la membrana plasmática de los hongos	3
1.2 Estrategias para la modificación por un agente químico	7
1.3 Consideraciones en la interpretación	8
1.4 Antecedentes sobre modificación de las ATPasas tipo P	9
1.5 Modificación de grupos carboxilo por carbodiimidas	10

OBJETIVO GENERAL	13
-------------------------	-----------

OBJETIVOS PARTICULARES	13
-------------------------------	-----------

2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1 Cultivo de levaduras	14
2.2 Obtención de membrana plasmática	15
2.3 Purificación de la ATPasa	16
2.4 Determinación de proteína	17
2.5 Ensayo de la actividad de ATPasa	17
2.6 Preparación de las carbodiimidas	17

2.7	Inactivación de la ATPasa por carbodiimidas	18
2.8	Columnas de Penefsky	20
2.9	Modificación con MMTS	20
2.10	Electroforesis en condiciones desnaturizantes	20
2.11	Electroelución	21
2.12	Digestión proteolítica	22
2.13	Determinación de SDS	22
2.14	Marcaje de la ATPasa con ¹⁴ C-DCCD	23
2.15	Simulación de la reacción de la enzima con el inhibidor	24
3.	RESULTADOS	27
3.1	Efecto del EDC sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa	27
3.2	Irreversibilidad de la inhibición por EDC y especificidad del grupo modificado	29
3.3	Uso de nucleófilos en la inhibición por EDC	36
3.4	Uso de geles de poliacrilamida para evidenciar fenómenos de entrecruzamiento	39
3.5	Uso de geles de poliacrilamida con amortiguador de fosfatos tipo Weber	41
3.6	Efecto de ligandos fisiológicos sobre la inhibición de la ATPasa por EDC	43
3.7	Inhibición de la ATPasa por EDC a diferentes valores de pH	45
3.8	Efecto del DCCD sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa	47
3.9	Irreversibilidad de la inhibición por DCCD y especificidad del grupo modificado	49

3.10	Uso de nucleófilo en la inhibición por DCCD	50
3.11	Uso de geles de poliacrilamida para evidenciar fenómenos de entrecruzamiento	54
3.12	Efecto de ligandos fisiológicos en la inactivación de la ATPasa por el DCCD	56
3.13	Inhibición de la ATPasa por DCCD a diferentes valores de pH	58
3.14	Determinación de la estequiometría en la inhibición de la actividad de la ATPasa con ^{14}C -DCCD	58
3.15	Uso de una carbodiimida con propiedades fluorescentes	60
4.	DISCUSIÓN	64
4.1	La reactividad de la ATPasa con las carbodiimidas	64
4.2	Las carbodiimidas reaccionan con los grupos carboxilo de la ATPasa	66
4.3	Efecto de los nucleófilos	66
4.4	Efecto de los ligandos	68
4.5	Dependencia de la inactivación con respecto al pH	69
4.6	Estequiometría	70
4.7	Uso del análogo fluorescente	71
4.8	Perspectivas	71
5.	CONCLUSIONES	73
6.	REFERENCIAS	75

Resumen

La membrana plasmática de *Kluyveromyces lactis* contiene una ATPasa de H⁺ que bombea protones hacia afuera de la célula, generando un gradiente electroquímico, que se emplea para el transporte de nutrientes, por medio de varios sistemas de cotransporte con protón. Esta enzima es muy similar a las ATPasas de H⁺ descritas en otras especies de levaduras. Las características principales de estas enzimas incluyen: estar compuestas de un solo polipéptido, tener una masa molecular aproximada de 100 kDa, formar un intermediario fosforilado en su ciclo catalítico y ser inhibidas a concentraciones micromolares de vanadato.

Para explicar el mecanismo de acción de las ATPasas de H⁺ se requiere conocer la localización y la composición del sitio de unión para el ATP, el mecanismo de la hidrólisis del ATP, el camino que sigue el protón para cruzar la membrana y el mecanismo de acoplamiento entre ambos procesos.

La modificación química es uno de los métodos que se usan en la identificación de grupos funcionales de las proteínas y se basa en el empleo de ciertos agentes que reaccionan selectivamente con la cadena lateral de un aminoácido, funcional o estructuralmente importante, lo que se refleja en algún parámetro medible. La identificación del residuo modificado es importante para completar el estudio de la relación estructura-función.

En el presente trabajo se usaron dos reactivos que modifican grupos carboxilo: el 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y el N,N' dieiclohexilcarbodiimida (DCCD).

La ATPasa de H⁺ incubada con EDC a concentraciones milimolares, se inactivó con una cinética compleja, lo cual indica la participación de por lo menos dos carboxilos con diferente

reactividad, y/o la degradación de la carbodiimida a tiempos largos. Se encontró que la segunda posibilidad era correcta, sin poder descartar la primera. Se hicieron experimentos a tiempos cortos para obtener cinéticas de pseudoprimer orden, encontrándose que la inhibición era irreversible y que se producía por la reacción de la carbodiimida con residuos de aspártico y/o glutámico. Mediante el empleo de nucleófilos exógenos se encontró que la mayor parte de la inhibición se debía a fenómenos de entrecruzamiento intermolecular, y un pequeño porcentaje de la inhibición era consecuencia de la modificación *per se* de algún carboxilo. Los ligandos Mg-ADP, Mg^{2+} o vanadato produjeron una pequeña protección. Se determinó el pK_a aproximado del grupo, que fue de 5.8, lo que indica que el residuo puede estar oculto.

Por otro lado, la inactivación de la ATPasa de H^+ a concentraciones micromolares de DCCD, también mostró una cinética compleja. La reactividad del grupo modificado se obtuvo trabajando a tiempos cortos, determinándose una constante de velocidad de segundo orden de $420 M^{-1} min^{-1}$, mucho mayor (por lo menos 40 veces), que la obtenida con el EDC en presencia de un nucleófilo ($9.9 M^{-1} min^{-1}$). El efecto de los nucleófilos sobre la inhibición con DCCD fue completamente diferente, ya que aceleraron la inactivación probablemente al inducir un cambio conformacional en la enzima, debido a una interacción directa con la ATPasa. La protección con ligandos (Mg-ADP, Mg^{2+} o vanadato) fue parcial. El pK_a aproximado fue de 6.5, sugiriendo que el carboxilo modificado se encuentra en un ambiente oculto. Por experimentos con ^{14}C -DCCD se determinó una estequiometría de 1 mol de DCCD por mol de ATPasa en ausencia de nucleófilo y de 2 moles de DCCD por mol de ATPasa en su presencia, lo cual sugiere que el nucleófilo expuso un nuevo carboxilo.

Abreviaturas

ATP	Trifosfato de adenosina
BA	Bencilamina
DCCD	N,N'diciclohexilcarbodiimida
DOC	Desoxicolato de sodio
EDA	Etilendiamina
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
GEE	Ester de etilglicina
GME	Ester de metilglicina
HEPES	N-(2-hidroxietyl)piperazine
MES	2-(N-morfolino)etano
MMTS	Metilmetanotiosulfonato
NEM	N-etilmaleimida
NCD-4	4-Ciclohexil-N'-(4-dimetilamino)naftilcarbodiimida
SDS	Duodecilsulfato de sodio
TCA	Acido tricloroacético
TEMED	Tetrametiletildiamina
TRIS	(Tris[hidroximetil]aminometano)

1. Introducción

Las células utilizan la energía de gradientes electroquímicos de iones creados por diferentes tipos de bombas. Ambos componentes de estos gradientes, el potencial de membrana y el gradiente de concentración se usan como fuentes de energía para la síntesis de ATP o para transporte de otros iones y metabolitos vía una serie de sistemas de transporte. En procariotes, el gradiente primario se produce por el metabolismo oxidativo o por la luz, y los primeros persisten en la mitocondria y el cloroplasto de eucariontes.

Las ATPasas de protones están entre las más importantes bombas de iones en la naturaleza. Hay 3 clases de estas enzimas, las cuales se distinguen por su estructura, función, mecanismo de acción y origen evolutivo (Nelson, 1988).

Las ATPasas de protones de las eubacterias, también presentes en mitocondrias y cloroplastos, consisten en tres distintas estructuras: un sector catalítico, de naturaleza hidrofílica, en donde se localiza el sitio activo que retiene su capacidad de hidólisis del ATP cuando se aísla; un sector membranal, de naturaleza hidrofóbica, que forma el conducto de protones a través de la membrana; y el cuello, que conecta a ambos sectores. La enzima está compuesta por 8 a 12 subunidades diferentes. La parte hidrofílica o F_1 contiene, al menos, cinco diferentes polipéptidos (alfa, beta, gamma, delta y epsilon). En las especies examinadas, estas subunidades se arreglan con una estequiometría $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, dando una masa molecular de 371, 406 y 382 kDa para la F_1 de mitocondria, cloroplasto y bacteria, respectivamente. En la subunidad β se encuentra el sitio

catalítico, mientras que la subunidad α contiene el sitio no catalítico de unión a nucleótidos. El sector hidrofóbico o F_0 es más variable en composición; en procariontes está compuesto de tres polipéptidos llamados a, b y c. Estas subunidades están presentes en una estequiometría de ab_2c_n , donde n es mucho más variable pero no excede de 12, mientras que en eucariontes contiene cinco péptidos adicionales llamados d, e, OSCP, Factor 6 y A6L. La función fisiológica del complejo F_1F_0 es la síntesis de ATP. Con respecto a su mecanismo cinético, estas enzimas no forman un intermediario fosforilado, su pH óptimo es alcalino (8-9) y se inhiben a concentraciones micromolares de DCCD y oligomicina (Hassinen, 1993).

Las ATPasas de protones de tipo vacuolar están presentes en lisosomas, en vacuolas de plantas y hongos, en el complejo de Golgi, en gránulos de clatrina, en vesículas sinápticas y en diversos gránulos de secreción. La función de estas ATPasas de H^+ es controlar la acidificación en el interior de los organelos y la formación de un potencial de membrana, positivo dentro y negativo fuera. El bombeo de protones de las ATPasas vacuolares se incrementa por iones de Cl^- y se inhibe por nitrato y bafilomicina. Estas enzimas son las más grandes, están compuestas de 3 a 8 diferentes polipéptidos, son más activas a pH neutro (7-7.5) y tampoco forman un intermediario fosforilado (Bowman, 1986).

Finalmente, las ATPasas de protones de la membrana plasmática de hongos y plantas, son bombas electrogénicas esenciales para el mantenimiento de un gradiente electroquímico de protones que se necesita para el transporte de iones y nutrientes y la regulación del pH intracelular. La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de levaduras pertenece a la clase tipo P, que incluye a las ATPasas de H^+/K^+ de mamíferos, ATPasas de Ca^{2+} y ATPasas de Na^+/K^+ . Las enzimas de animales involucran el transporte de sodio, potasio o calcio. Estas tienen un mecanismo catalítico similar, que incluye la

fosforilación de un residuo de aspartato y la presencia de dos estados conformacionales durante su ciclo catalítico. Además, las ATPasas tipo P son altamente sensibles a la inhibición por vanadato y su pH óptimo es ácido (5-6.7). (Bowman, 1986., Serrano, 1988., Slayman, 1989).

1.1 LA ATPasa DE H⁺ TIPO P DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE LOS HONGOS

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática está compuesta por un polipéptido con un peso molecular de aproximadamente 100 kDa. Los lípidos se requieren para la actividad enzimática y no hay evidencias de asociación con carbohidratos (Rest, 1995). Se presenta una gran similitud entre las ATPasas de este tipo, ya que anticuerpos de diferentes especies presentan reactividad cruzada, incluso con ATPasas de animales y de plantas (Surowy, 1986).

La comparación de las secuencias de aminoácidos de una variedad de ATPasas tipo P de hongos y mamíferos revelan un alto grado de similitud en el dominio catalítico para la hidrólisis del ATP, así como en la disposición de los residuos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos. Se concluye que todas estas enzimas podrían tener un gen ancestral común (Serrano, 1989). Por medio del análisis de hidropatía, se predice que todos los miembros de esta superfamilia de enzimas translocadoras de iones tienen una topología membranar similar. La mayoría ha propuesto una estructura que contiene entre 8 a 12 dominios transmembranales, con muy pocos residuos expuestos en la superficie externa. Cuatro porciones importantes se encuentran en el citosol, una cola N-terminal de alrededor de 115 aminoácidos, el extremo carboxilo terminal y 2 grandes asas que contienen el sitio de fosforilación y la región de unión e hidrólisis del ATP. Estas 2 asas citosólicas contienen las regiones que presentan la mayor similitud entre la ATPasa de Na⁺-K⁺, la ATPasa de Ca²⁺ de células animales y la ATPasa de K⁺ de *E. coli* (Nakamoto, 1989).

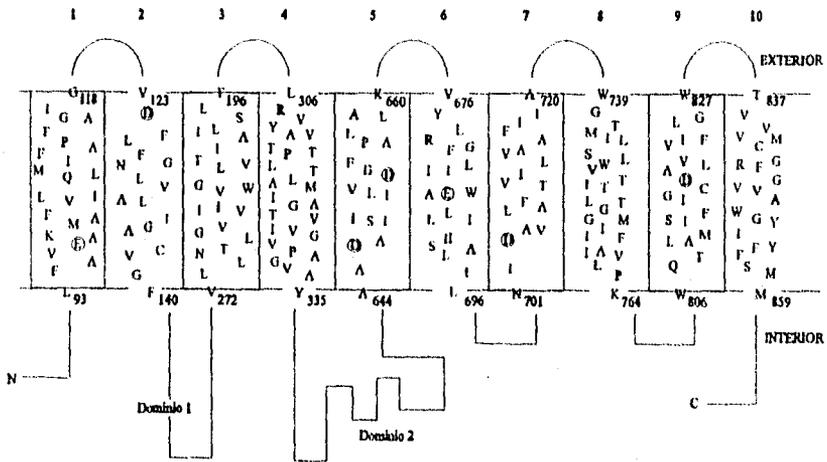


Figura 1. Modelo Topológico de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de *Kluyveromyces lactis*. Se observan los diez segmentos transmembranales. Las porciones amino y carboxilo terminal se encuentran en la parte citoplásmica. El dominio 1 es el de fosfatasa, en el dominio 2 está el sitio de fosforilación y el sitio de unión al ATP. En círculos se encuentran marcados los carboxilos que se encuentran en la membrana.

Por otra parte, estudios de mutagénesis de los segmentos transmembranales 1 y 2 de las ATPasas tipo P, han mostrado que estas regiones parecen ser conformacionalmente sensibles y altamente acopladas (Perlin, 1994). El segmento transmembranal 4 está muy conservado y se ha propuesto que forma parte de la vía de transducción de energía (Shull, 1985). Un pequeño dominio hidrofílico entre el segmento 2 y 3 podría tener una función de fosfatasa (Serrano, 1990). La región amino terminal es rica en aminoácidos ácidos y su función no se conoce, mientras que la región carboxilo terminal parece jugar un papel regulador (Portillo, 1989). Recientemente se realizó un trabajo analizando 47 ATPasas, tanto de bacterias como diversos eucariontes, en donde se muestra que las ATPasas tipo P comprenden una sola familia con cuatro clases que se relacionan con la especificidad y la fuente biológica: 1) ATPasa transportadora de Ca^{2+} ; 2) ATPasa de H^+ - Na^+ de la mucosa gástrica; 3) ATPasa translocadora de H^+ de membrana plasmática de plantas, hongos y eucariontes inferiores; y 4) ATPasas tipo P de bacterias (especificidad para K^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} y otros). Los datos de la secuencia de todas las enzimas E_1 - E_2 indican la conveniencia de utilizar el mismo modelo estructural (Fagan, 1994).

La purificación y reconstitución de la ATPasa ha permitido que se realicen estudios de catálisis y transporte, que junto con el análisis electrofisiológico, han aportando información significativa acerca de las etapas del ciclo de reacción. Esta ATPasa alterna, durante su ciclo catalítico, entre dos conformaciones que difieren en su sensibilidad a la tripsina y a inhibidores irreversibles. La conformación E_1 tiene afinidad por el sustrato Mg-ATP y por el H^+ , mientras que la afinidad de la forma E_2 por los protones es baja. Además E_1 tiene el sitio de reconocimiento para los protones en el lado citoplásmico y la forma E_2 en el lado extracelular. En presencia de vanadato y magnesio la enzima está en la conformación E_2 (Amory, 1982., Mandala, 1988).

En los últimos años se han realizado progresos considerables en el conocimiento de las relaciones estructura-función de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de la levadura. La mutagénesis dirigida ha tenido por blanco sustituciones de aminoácidos altamente conservados. Este acercamiento ha producido importante información acerca del papel de aminoácidos individuales y dominios estructurales de la proteína en la catálisis y la regulación enzimática. Esta alternativa produjo mutantes de la ATPasa de H^+ con un potencial de membrana reducido y resistencia al antibiótico higromicina B. Mutantes que tienen el fenotipo de resistencia a higromicina B se emplean para estudiar el transporte y las propiedades de acoplamiento de esta enzima. Además, el aislamiento de revertantes espontáneos y segundas revertantes ha provisto información importante acerca de las interacciones entre diferentes dominios estructurales y/o funcionales (Perlin, 1992).

Aunque se conoce mucho sobre las ATPasas de membrana, preguntas importantes aún no han sido contestadas. Estas están relacionadas con la ausencia de información estructural de la proteína, desconocimiento de los sitios que participan en el mecanismo del transporte de iones, la hidrólisis del ATP y la transducción de energía. No se conocen las relaciones espaciales entre las diferentes regiones de la estructura primaria, la localización de aminoácidos esenciales funcionalmente importantes, las interacciones entre las posibles subunidades o unidades monoméricas, la localización de sitios de pegado de cationes, etc (Pedemonte, 1990).

Para un conocimiento completo del mecanismo de transporte de los cationes, se necesita la información detallada de su estructura terciaria, de los sitios de fijación de los ligandos y de los cambios asociados con el transporte del catión y con la hidrólisis del ATP; por tanto, se requieren cristales de la proteína en varias conformaciones y de la identificación de residuos específicos asociados con diferentes funciones de la enzima.

Un paso en esta última dirección, es el uso de la modificación química, por medio de la cual se puede obtener información de los residuos involucrados en el sitio de unión de varios ligandos fisiológicos y residuos esenciales para la actividad. En este acercamiento, se marca a la proteína con un agente que forme un enlace covalente con algún residuo de la proteína, de tal manera que permita su aislamiento y caracterización.

1.2 ESTRATEGIAS PARA LA MODIFICACIÓN POR UN AGENTE QUÍMICO

Elección del agente. Un buen candidato es aquel que produce una modificación estable, importante para el aislamiento del péptido marcado. Un buen conocimiento del mecanismo de reacción química es de mucha ayuda para la interpretación de los datos. Ningún agente es totalmente específico para un solo aminoácido, y la reactividad para un mismo aminoácido en una proteína puede ser diferente, dependiendo del medio ambiente en el que se encuentre el residuo.

Unión y cinética de inhibición. El análisis cinético de la inhibición y de la unión son esenciales para optimizar las condiciones para el aislamiento del péptido modificado. Evidencias de protección por ligandos contra la unión y la inhibición se obtienen en esta etapa. Algunos residuos no interactúan directamente con el ligando particular, sino que son importante en la transmisión del cambio conformacional necesario para la unión del ligando o el proceso catalítico.

Caracterización de la enzima modificada. A través del análisis cinético y del aislamiento de la enzima se puede identificar el paso (s) en el ciclo catalítico que está mas afectado por la modificación.

Estequiometría del marcado y protección. Experimentos importantes en esta etapa son la determinación de la estequiometría del marcado y la localización de la marca en la estructura primaria de la enzima. La estequiometría de la unión se calcula con respecto a la masa de la proteína, por lo que se supone: 1) que la enzima está totalmente pura, 2) que toda la enzima es activa, y 3) que la única causa de la inhibición se debe al pegado del agente químico. La competencia con ligandos no prueba (aunque sugiere), que el inhibidor se pegó en el sitio del ligando, pero indica modificaciones en la estructura de la enzima.

Cuando se realizan experimentos de protección por ligandos deben tomarse en cuenta las siguientes consideraciones: 1) examinar varios ligandos, 2) la protección que ejerza algún ligando se puede deber a que el residuo está en el sitio del ligando o a un cambio conformacional a larga distancia y 3) la protección debe ser lo suficientemente grande para ser empleado en la identificación del residuo modificado.

Localización. La proteólisis, el aislamiento y la purificación del péptido marcado, seguido de un análisis y secuenciación de aminoácidos, serían los pasos posteriores en la identificación del residuo modificado.

1.3 CONSIDERACIONES EN LA INTERPRETACIÓN

La modificación de la cadena lateral del aminoácido en la proteína puede producir dos diferentes cambios estructurales: 1) una alteración del grupo químico de la cadena lateral del aminoácido y 2) la introducción de un nuevo grupo que podría ocupar un mayor espacio, lo cual podría cambiar no solo las características químicas del residuo modificado, sino también las relaciones espaciales de varios residuos. Así, los resultados de inhibición podrían ocurrir debido a lo siguiente:

1) la modificación de la cadena lateral *per se*, necesaria para la actividad, 2) el cambio en la interacción de otros residuos esenciales para la actividad, como consecuencia de la modificación de un aminoácido, o 3) el nuevo espacio ocupado por el modificador químico es esencial para el funcionamiento de la enzima o impone impedimentos estéricos que evitan la entrada de un ligando al sitio activo de la enzima.

La modificación química no está libre de ambigüedades, pero con la acumulación de evidencias obtenidas por otros métodos independientes, se puede llegar a una conclusión más fuerte, con menos incertidumbre, acerca del papel de un residuo en el funcionamiento de la enzima.

1.4 ANTECEDENTES SOBRE MODIFICACIÓN DE LAS ATPasas TIPO P

Para la identificación de un buen número de residuos en el sitio de unión del ATP se ha usado una variedad de agentes químicos que modifican específicamente a ciertos grupos. Estos incluyen a la butanodiona, para residuos de arginina; reactivos sulfhidrilo para grupos SH; al 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3 diazol que reacciona con residuos de tirosinas; al isotiocianato de fluoresceína que modifica residuos de lisina. Además, con el uso del $[^3\text{H}] \text{NaBH}_4$, excelente reductor, se determinó el residuo que es el fosforilado durante el ciclo catalítico. Sin embargo, poca información se encuentra disponible sobre la naturaleza de los sitios de unión de cationes monovalentes o divalentes en la enzima. Estudios previos con la ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$, utilizando a la diciclohexilcarbodiimida (DCCD) como agente selectivo para grupos carboxilo, mostraron que la inhibición se reducía en presencia de iones Na^+ o K^+ y se concluyó que los grupos carboxilo estaban involucrados en los sitios de unión al catión (Pedemonte, 1986).

Por otra parte, con la ATPasa de protones de *Neurospora crassa* se reportó una inactivación

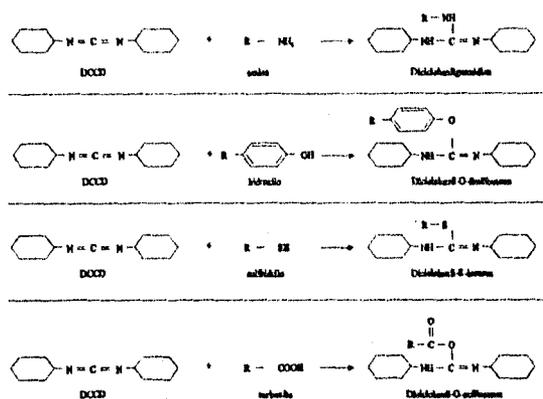
irreversible con la dicitohexilcarbodiimida (DCCD). Ya que las carbodiimidas hidrosolubles no tienen efecto alguno sobre la actividad de esta enzima, el carboxilato reactivo probablemente se encuentre en un ambiente hidrofóbico (Sussman, 1983). Posteriormente se mostró que el glutamato 129 reacciona con el ^{14}C -DCCD en el primer segmento intramembranal de la ATPasa, lo que sugiere que este residuo forma parte integrante del canal de H^+ de la enzima. Sin embargo, la mutación de este mismo aminoácido a glutamina en la ATPasa de H^+ de *Saccharomyces cerevisiae* no altera ni la actividad de la enzima ni su capacidad de bombeo de protones (Portillo, 1988), por lo que su papel durante el ciclo catalítico de la enzima todavía no es claro.

Por otro lado, la ATPasa de H^+ de *Neurospora crassa* también se inhibe con el N-(etoxicarbonil)-2-etoxi-1,2-dihidroquinilina, reactivo que modifica también a los grupos carboxilo. La inactivación es irreversible y depende fuertemente del pH del medio, aumentando la constante de velocidad de inactivación conforme el pH disminuye. En presencia de Mg-ATP más vanadato la enzima se protege, lo cual indica que el carboxilato reactivo se oculta cuando la enzima adquiere la conformación E_2 . El pKa del carboxilato reactivo es anormalmente alto, cerca de 7, posiblemente como resultado de un ambiente hidrofóbico (Addison, 1986).

1.5 MODIFICACIÓN DE GRUPOS CARBOXILO POR CARBODIIMIDAS

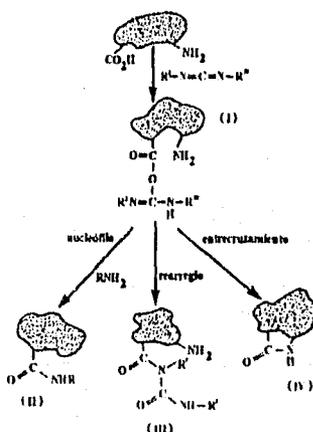
Muchos sitios de pegado de cationes en las enzimas contienen cargas negativas, debido a la presencia de residuos de glutámico y aspártico. Entre los agentes que han sido usados en la modificación de grupos carboxilo, están las carbodiimidas. Estas pueden reaccionar con grupos amino, hidroxilo, sulfhidrilo y carboxilo (esquema 1). En solución acuosa y en condiciones neutras o ácidas, los grupos que reaccionan preferentemente son los carboxilo y los sulfhidrilo. Las tirosinas

también pueden reaccionar en estas condiciones, pero con una velocidad muy baja (Carraway, 1972).



La reacción de la carbodiimida con el carboxilo da lugar a un aducto altamente inestable y reactivo, la O-acylisourea (I), esquema 2. Este puede rearrreglarse y dar lugar a un aducto estable, la N-aciurea (II), o reaccionar con un nucleófilo para producir un enlace amida (II). En presencia de

un nucleófilo (éster de etilglicina), la carbodiimida produce la modificación del grupo carboxilo con el nucleófilo, y la salida de la dicitohexilurea, un derivado de la carbodiimida. En ausencia de un nucleófilo exógeno, la O-acilisourea (I) podría reaccionar con nucleófilos vecinos, intra o intermoleculares, que resultaría en la formación de un enlace amida y el entrecruzamiento de la proteína (IV).



Esquema I. Caminos posibles en la reacción por la modificación de los carboxilos en la proteína con carbodiimidas. I. Aducto inestable y reactivo la O-acilisourea. II formación de un enlace amida por la presencia de nucleófilo. III. Aducto estable la N-acilurea. IV. Formación de entrecruzamiento intramolecular.

Objetivo General

Estudiar la inhibición de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de Kluyveromyces lactis por carbodiimidas, para conocer si existen carboxilos involucrados en la catálisis o en sitios de unión al catión.

Objetivos Particulares

Caracterizar la cinética de la inhibición de la ATPasa de membrana plasmática por dos carbodiimidas.

Estudiar el efecto de ligandos fisiológicos sobre la inactivación producida por éstos agentes.

Determinar la estequiometría de la unión, mediante el empleo de marca radiactiva.

Caracterizar el efecto de diferentes nucleófilos en las constantes de inhibición para ambas carbodiimidas.

Identificar el o los residuos modificados mediante el aislamiento y secuenciación del o los péptidos con marca radiactiva y/o fluorescente.

2. *Materiales y Métodos*

2.1 CULTIVO DE LEVADURAS

La levadura *Kluyveromyces lactis*, cepa WM27, se cultivó en un medio sólido para obtener las colonias que se utilizaron posteriormente en los cultivos en medio líquido. Las colonias de levadura en medio sólido pueden almacenarse hasta 30 días en refrigeración, sin que pierdan su capacidad de crecimiento en el medio líquido.

Medios de Cultivo.

Medio sólido:

En un volumen final de 1 litro se disuelven:

Extracto de levadura	3 g.
Peptona de gelatina	2 g.
Agar bacteriológico	1%

Cien mililitros del medio se esterilizan en autoclave, por 20 minutos, en un matraz de Erlenmeyer y se reparten alicuotas de 10 ml del medio en tubos con tapa de rosca y con una capacidad de 15 a 20 ml. Una vez que el medio se solidificó, se siembra la levadura.

Medio líquido: (YPD)

Extracto de levadura	10 g.
Peptona de gelatina	10 g.
Glucosa	20 g.
Agua	1 lt.

El medio se esteriliza durante 20 minutos y se deja enfriar a temperatura ambiente hasta su uso.

Reactivación de la cepa. Para este fin se realiza un precultivo, que consiste en tomar una asada de levaduras y vaciarlo en aproximadamente 10 ml de medio estéril de YPD. Se incuba a 30°C con agitación constante, durante aproximadamente 12 horas. De este medio se toman 2 ml (con material estéril) y se vacían en matraces de 2 lt. con 1 lt. del medio de YPD. Las levaduras se cosechan después de 22 horas de incubación a 30°C, al final de la fase exponencial de la curva de crecimiento. El crecimiento de las levaduras en el medio líquido se determinó mediante la medición de la turbidez de la suspensión en un fotocolorímetro.

Cosecha de levaduras. Se centrifugan las levaduras a 5000 g, por 5 minutos, para quitar el medio. La pastilla se resuspende con agua bidestilada, hasta el volumen inicial y nuevamente se centrifuga a 5000 g, por 5 minutos. Se pesan los paquetes.

2.2 OBTENCIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Por cada 4 g de células (peso húmedo), se añaden 20 ml de una solución que contiene: 1M sorbitol, 50 mM H_2KPO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.2 (se ajusta con tris). Se agita la suspensión y se coloca 1 μ l / ml de β mercaptoetanol. Se incuba por 10 minutos a 30°C y se adicionan 500 unidades de liticasa / g de células y se incuba por 60 minutos, a 30°C con agitación constante. Para verificar la formación de protoplastos, se toma cada 15 minutos una alícuota de 10 μ l de la suspensión y se mezcla con 3 ml de agua y se lee la absorbancia a 550 nm. Cuando se obtiene una lectura final de 0.05, partiendo de una absorbancia \approx 0.5, se detiene la incubación con la liticasa. Se añade 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), y se sonicán 40 ml de suspensión por 15 seg cuatro veces,

con descanso de 15 seg entre cada una. Se centrifuga 10 minutos a 1500 g a 4°C. El sobrenadante se centrifuga durante 30 minutos a 17 210 g. Se decanta con mucho cuidado para evitar la contaminación mitocondrial. El sobrenadante se centrifuga nuevamente durante 45 minutos a 38 720 g. El paquete se resuspende en 1 mM EGTA / tris, pH 7.2, y se centrifuga nuevamente durante 45 minutos a 38 270 g. El paquete que contiene la membrana plasmática se resuspende en un volumen mínimo con 1 mM EGTA / tris, pH 7.2.

2.3 PURIFICACIÓN DE LA ATPasa

La metodología empleada en esta purificación es una modificación de la reportada para la ATPasa de *Neurospora crassa* (Bowman, E.J. y col., 1981). La membrana plasmática se diluye con un amortiguador que contiene: 0.6 M KCl, 6 mM EDTA, 75 mM tris, (solución 3X) pH 7.5, y la solución de EGTA/tris, pH 7.2 para obtener una concentración de proteína de 2 mg / ml. Se añade lentamente desoxicolato a una concentración final de 0.09% y se incuba por 10 minutos a 0°C. Se centrifuga por 1 hr. a 175 000 g, a 4°C. Se resuspende el paquete con el siguiente amortiguador: 0.3 M de KCl, 45% de glicerol, 2 mM EDTA, 25 mM tris, pH 7.5, hasta llevar la concentración de proteína a 6.5 mg / ml. Se añade asolectina sonicada de manera que la concentración final sea de 5.0 mg / ml. Se adiciona inmediatamente el zwittergent 3-14 hasta obtener una relación detergente / proteína de 0.85. El detergente se añade gota a gota y con agitación suave. Se homogeniza evitando producir espuma. Se centrifuga a 175 000 g, por 60 min. El sobrenadante se coloca en un gradiente discontinuo de glicerol (50-65%) y se centrifuga a 225 000 g, durante 14 hr a 2°C. El paquete de la ATPasa que se obtiene, se resuspende con EGTA-tris, pH 7.0 en un volumen pequeño. Siguiendo esta metodología obtenemos una preparación de ATPasa parcialmente pura (60-70%) y con una

actividad específica entre 25-35 $\mu\text{moles Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

2.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y col, (1951) de acuerdo con la modificación descrita por Bensadoun, A., y Weinstein, D., (1976), utilizando estándares de albúmina de suero bovino (BSA). Con esta técnica se elimina la interferencia del glicerol y/o detergente en la determinación de la concentración de proteína.

2.5 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa

Para determinar la actividad de la ATPasa se utilizó la siguiente solución con un medio regenerador de ATP que contiene:

5 mM de ATP (Na_2ATP),
5 mM MgSO_4 ,
10 mM MES,
5 mM azida de sodio,
5 mM fosfoenolpiruvato y
5 μl de piruvato cinasa / ml del medio anterior.

El pH se ajusta a 6.25 con KOH. La solución se almacena en alícuotas de 100 ml a -20°C . Al momento de usarse, se añade 5 μl de piruvato cinasa/ ml de solución para completar el sistema regenerador de ATP.

2.6 PREPARACIÓN DE LAS CARBODIIMIDAS

Ya que el DCCD es una carbodiimida hidrofóbica soluble en etanol y en otros solventes orgánicos como la dimetilformamida, se preparó una solución 1 M en etanol, la cual es estable por meses cuando se almacena a -70°C (con esto, se evita su descomposición a dicitohexilurea, la cual

precipita). El DCCD se diluye en el momento requerido y esta solución es estable por 10 días a -20°C . Es importante que durante su preparación, empleo y almacenamiento, la solución del DCCD se encuentre en tubos de vidrio, ya que esta carbodiimida fácilmente se adsorbe a las superficies de plástico.

Se preparó una solución acuosa de EDC a una concentración de 1M y se almacenó a -70°C . Al momento de usarse se realizó una dilución de esta solución concentrada. El EDC en solución acuosa es muy estable a bajas temperaturas.

El NCD-4, un análogo del DCCD, se disolvió con etanol y se determinó su concentración por medio de su absorbancia a 335 nm, tomando un coeficiente de extinción de $10.25 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La solución se almacenó a -70°C en tubos de vidrio protegidos con papel aluminio, para evitar una posible degradación por la luz. El NCD-4 es estable aún después de descongelarlo varias veces.

2.7 INACTIVACIÓN DE LA ATPasa POR CARBODIIMIDAS

La ATPasa (0.2 -0.5 mg/ ml de proteína) se incubó a 30°C en un medio de reacción que contenía: 50 mM Mes-KOH, pH 6.5 (DCCD, EDC) o pH 5.5 (NCD-4), 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, por 3 minutos. Después de esto se añadió la carbodiimida a la concentración indicada y se tomaron alícuotas de 5 μl a diferentes tiempos que se diluyeron con 250 μl de la mezcla para medir la actividad de la ATPasa. La reacción de ATPasa se detuvo con ácido tricloroacético después de incubar a 30°C por 10-30 minutos y se determinó el Pi liberado de acuerdo con el método de Fiske y Subbarow (1925).

Inactivación de la ATPasa por carbodiimidas a diferentes pHs.

Se incubó a la ATPasa (0.25- 0.5 mg/ml), a 30° C en los siguientes amortiguadores: Mes-KOH, pH 5.0-6.5 y Hepes-KOH pH 7.0-8.3, manteniendo la concentración del K⁺ en 100 mM y la del Na⁺ en 50 mM. La reacción de inactivación se inició con la adición de la carbodiimida. Se realizaron curvas temporales y las muestras se procesaron como se describió en el inciso de arriba.

Inactivación de la ATPasa por carbodiimidas en presencia de nucleófilos.

Se preincubó a la ATPasa (0.25-0.5 mg/ml) a 30° C, en 50 mM Mes-KOH, pH 6.5 y diferentes concentraciones de nucleófilo (taurina, ester de metilglicina, ester de etilglicina, etilendianina, bencilamina) durante 3 minutos. Se añadió la carbodiimida (tiempo cero) y se tomaron alícuotas (5 µl) a diferentes tiempos para determinar la actividad de la ATPasa.

Inactivación de la ATPasa por carbodiimidas en presencia de ligandos.

Se preincubó a la ATPasa (0.25 - 0.5 µg/ml) a 30° C durante 3 minutos en 50 mM del amortiguador a pH 6.5 y en presencia de los diferentes ligandos que se estudiaron: (Mg-ADP, Mg²⁺, vanadato). Se añadió la carbodiimida (tiempo cero) y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos para determinar la actividad de la ATPasa.

Inhibición de la actividad de la ATPasa por el nucleófilo.

Se incubó a la ATPasa (0.2 mg/ml) en un medio que contenía 50 mM de Mes-KOH, pH 6.5, 100 mM de KCl, 50 mM NaCl, 100 mM de Mg-ATP, pH 7.25, a diferentes concentraciones de nucleófilo en un volumen final de 250 µl. La reacción se inició con la adición de la ATPasa, se incubó

durante 10 minutos a 30°C y se terminó con 50 µl de ácido tricloroacético al 30%. Se determinó el Pi liberado.

2.8 COLUMNAS DE PENEFSKY

Se equilibraron 0.5 g de sephadex G-50 fino (Pharmacia) con un amortiguador 10 mM Mes-KOH, pH 6.5 y 0.02% de azida. La resina se equilibró a temperatura ambiente y se colocó en una jeringa de insulina que contenía un filtro de politeno. Se dejó reposar por 10 minutos antes de centrifugarse a 250 g durante 2 minutos para eliminar el amortiguador. Se colocó la muestra de ATPasa (máximo 100 µl) y se centrifugó nuevamente por 2 minutos a 250 g. La ATPasa se colectó en un tubo de microfuga.

2.9 MODIFICACIÓN CON MMTS

La ATPasa (0.3 mg/ml) se preincubó por 3 minutos, a 30° C en 50 mM de Hepes-KOH, pH 7.5, 100 mM de KCl y 50 mM NaCl. Se inició la reacción añadiendo 2 mM de metilmetanotiosulfonato (MMTS) y se incubó a la ATPasa durante 60 minutos. Después de este tratamiento se pasó a la ATPasa por una columna de Penefsky para retirar el exceso del MMTS y se incubó nuevamente a 30° C con la carbodiimida (y el nucleófilo según el experimento), y se tomaron alícuotas de 5 µl para determinar la actividad de la ATPasa.

2.10 ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES

Se prepararon los geles de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes (en presencia de 0.1% de SDS), de acuerdo con la técnica descrita por Laemmli, U.K (1970). Este

método tiene un sistema de amortiguadores que genera una discontinuidad de pH y un gradiente de voltaje en el gel, que permite resolver muestras de proteína muy diluidas. Se emplearon marcadores de alto peso molecular con un intervalo de 29-205 kDa. El tiempo de corrida fue alrededor de 2 hr. Las proteínas se tiñeron con una solución de azul de Coomassie y el gel se destiñó con una mezcla de metanol, ácido acético y agua.

Se usó además el sistema reportado por Schägger y von Jagow, (1987). La concentración de poliacrilamida en el gel separador fue de 4 a 18% (intervalo del gradiente) y 13%. Se usaron marcadores de peso molecular pequeño con un intervalo de 14.2-66 kDa. La electroforesis se realizó manteniendo el voltaje constante a 20 V durante el recorrido de la muestra en el gel concentrador y de 100 V en el gel separador. El tiempo de corrida aproximado fue de 3 hr. La tinción y destinción de los geles se realizó de la misma manera que con los geles tipo Laemmli.

Asimismo, con el fin de determinar el peso molecular de las especies que se forman durante el entrecruzamiento con EDC, se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4% con amortiguador de fosfato, de acuerdo con el método reportado por Weber, K. (1969) y se usó a la fosforilasa b entrecruzada como marcador de peso molecular. La corrida fue aproximadamente de 3 hr, a corriente constante (50 mA).

2.11 ELECTROELUCIÓN

La ATPasa modificada con NCD-4, en ausencia y presencia de bencilamina, se asoció a una banda fluorescente en el gel tipo Laemmli. La banda de la ATPasa se separó del gel y se colocó en una de las cámaras del sistema de electroelución, sobre una membrana de diálisis que fue tratada de la siguiente manera: las membranas se colocan en una solución de NaHCO₃ al 1% a 60° C, durante

una hora. Se lavan varias veces con agua desionizada. Se transfieren posteriormente a una solución de SDS al 1% a 60° C por una hora. Se lavan con agua desionizada y se almacenan en una solución de azida de sodio, al 0.02% a 4° C. El amortiguador para la elución es una solución que contiene en concentración final tris base al 0.6 M, glicina 1.87 M y SDS al 0.025 %. La electroelución se realizó a 300 V por 3 hrs, a temperatura ambiente. El progreso de la proteína se puede seguir por el movimiento del material fluorescente. Cuando la elución fue completa, se redujo el voltaje a cero. La recuperación de la proteína es de alrededor del 90%. El volumen (200 µl) en donde queda la proteína se redujo a 50 µl mediante el empleo de una speed vac.

2.12 DIGESTIÓN PROTEOLÍTICA

Para limpiar a la ATPasa del SDS, se le añadió 5 veces su volumen de acetona fría, se agitó y se centrifugó a 12 000 rpm en una microfuga clínica, durante 1 minuto. Se desechó el sobrenadante (con lo cual se eliminó una buena parte del SDS del proceso de electroelución) y se secó la pastilla en vacío. La proteína se resuspendió en 2 M de urea mediante sonicación. Se puede seguir a la proteína por su fluorescencia. Se tomó una alícuota para determinar la concentración de SDS en la solución de la proteína. Se añadió la tripsina (0.6 µg, una relación de tripsina / proteína de 1:20) y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió la mezcla que contiene SDS y se realizó una segunda electroforesis en un gel de gradiente de poliacrilamida.

2.13 DETERMINACIÓN DE SDS

En un volumen de 0.5 ml que contiene entre 0-10 µg totales de SDS, se añade 1 ml de una solución de azul de metileno (24 mg/lt.), 4 ml de cloroformo y se mezclan las fases por 1 minuto. Se

elimina la fase por arriba de la capa orgánica por aspiración cuidadosa y se lee su absorbancia a 655 nm. La curva es lineal hasta 10 μ g de SDS.

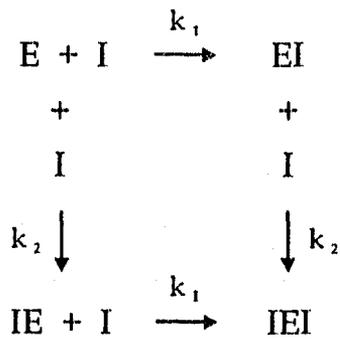
2.14 MARCAJE DE LA ATPasa CON 14 C- DCCD

El marcaje se realizó en 2 condiciones experimentales, incubando a la ATPasa (0.5 μ g de proteína) en 50 mM de Mes-KOH a pH 6.0, 100 mM de KCl y 50 mM de NaCl. En la primera condición se inhibió con 300 μ M de 14 C- DCCD, a 30°C y se tomaron alícuotas cada 30 segundos, para ensayar la actividad y determinar las cpm. En la segunda condición, la inhibición fue con 200 μ M de 14 C-DCCD en presencia de 200 mM de benzilamina, a 30°C y se tomaron alícuotas cada 15 segundos, para la determinación de la radiactividad (cpm). La reacción de modificación se paró por dilución (1/125) en una solución de acetato de sodio 1 M y de benzilamina 200 mM, a pH 7.0, a 0° C. Se centrifugaron las muestras a 275 000 g, por 90 minutos. Se resuspendió el paquete en la mezcla de electroforesis y se corrieron las muestras en un gel de poliacrilamida al 10% tipo Laemmli. Asimismo, se realizó la electroforesis de diferentes concentraciones de albúmina, con el fin de obtener una curva estándar. Al finalizar la electroforesis, el gel se tiñó con azul de Coomassie por 3 hr y se dejó toda la noche en la solución desteñidora. Una vez desteñido, se cortaron las bandas que corresponden a la ATPasa y se colocaron en una solución de propanol al 50% y de SDS al 3% para eluir el Coomassie. Se dejaron por 24 hr, lo mismo que las bandas de albúmina a una concentración conocida, y se leyó la absorbancia de la solución a 595 nm, con lo que se determinó la concentración de proteína de la ATPasa para cada banda. Esta solución se colocó en un vial con todo y la banda de la ATPasa. Se evaporó el líquido en un horno a 50°C, por 3 hr, aproximadamente. Se añadió 1 ml de peróxido de hidrógeno y se cerraron muy bien las tapas para evitar la evaporación. Se

colocaron nuevamente en el horno, pero esta vez a 70°C hasta que el gel se disolvió. Finalmente se añadieron 5-10 ml de líquido de centelleo y se determinaron las cpm asociadas a cada banda.

2.15 SIMULACIÓN DE LA REACCIÓN DE LA ENZIMA CON EL INHIBIDOR

Con el fin de conocer la relación que existe entre la pérdida de la actividad y la incorporación del inhibidor a la enzima, se construyó el siguiente modelo, en el cual el inhibidor interactúa con dos residuos de la enzima, y el pegado de uno no interfiere con el pegado del otro:



En donde EI y IEI no tienen actividad, IE tiene un 50% de actividad residual y k_1 y k_2 corresponden a las constantes de segundo orden para la reacción del sitio 1 y 2 de la enzima con el inhibidor irreversible.

A partir de este modelo se obtiene el siguiente sistema de ecuaciones diferenciales:

$$dE/dt = -(k_1+k_2) * [E]$$

$$dEI/dt = k_1 * [E] - k_2 * [EI]$$

$$dIE/dt = k_2 * [E] - k_1 * [IE]$$

$$dIEI/dt = k_1 * [IE] + k_2 * [EI]$$

que se puede resolver con el programa RUNGE_1.INC, que se basa en el método el Runge-Kutta de cuarto orden, también conocido como el método clásico de Runge-Kutta.

La figura 1 se obtuvo fijando los valores de $k_1=0.4$, $k_2=0.1$ y $ET=1$ y se resolvió el sistema de ecuaciones diferenciales con el fin de obtener las concentraciones de los diferentes complejos de la enzima en función del tiempo.

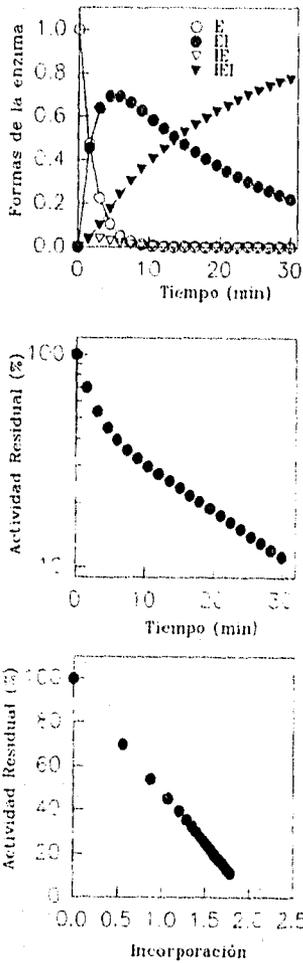


Fig. 1 Experimento de Simulación. A Formas de la enzima presentes con respecto al tiempo: (E- enzima libre, EI complejo enzima inhibidor, IE complejo enzima inhibidor (distinto al anterior), IEI complejo enzima con 2 inhibidores). B Actividad residual con respecto al tiempo. C Re gráfico de la actividad residual contra incorporación de DCCD.

3. Resultados

A continuación se presenta primero la caracterización cinética realizada con la carbodiimida hidrofílica, el EDC, y posteriormente los resultados obtenidos con las carbodiimidas hidrofóbicas, el DCCD y el NCD-4.

3.1 EFECTO DEL EDC SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE LA ATPasa

Una manera de examinar si existen carboxilos involucrados en la actividad catalítica de la ATPasa, es a través de la modificación con el EDC y estudiar los cambios ocurridos en alguna propiedad medible de la enzima. Si esta interacción da lugar a un aducto covalente con una disminución en la actividad de hidrólisis de la ATPasa, se debe observar una pérdida de la actividad con respecto al tiempo, de donde se puede calcular la constante de inactivación, cuyo valor depende de la concentración del EDC. Ya que esta es una carbodiimida pequeña y con carga positiva en nuestras condiciones experimentales, suponemos que modifica preferencialmente a los carboxilos expuestos.

En la figura 1 se graficó el logaritmo de la actividad de la ATPasa contra tiempo. La ATPasa se incubó con 6 mM de EDC. Se observa que la actividad de hidrólisis de la ATPasa disminuyó con respecto al tiempo. Sin embargo, el comportamiento lineal se pierde a tiempos largos, lo que indica que la inhibición sigue una cinética compleja. Esto puede deberse al menos a dos posibilidades: 1) la participación de varios carboxilos que se modifican con diferente reactividad y que dan lugar

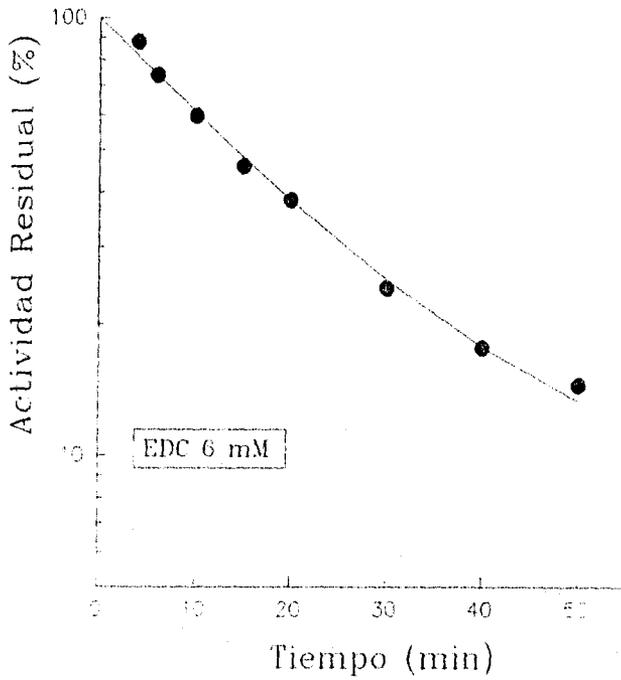


Fig. 1 Efecto del EDC sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa. La enzima (0.5 mg/ml) se incubó a 30°C, con amortiguador Mes-KOH pH 6.5, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, por 2 minutos, y se inició la reacción con la adición de 6 mM de EDC. Se tomaron alícuotas en los tiempos indicados, y se midió la actividad de hidrólisis.

a una enzima con actividad residual o 2) a la degradación de la carbodiimida a tiempos largos. Se realizaron experimentos que confirmaron este segundo punto, aunque esto no descarta la primera posibilidad. Para simplificar el análisis cinético, se trabajó en el intervalo en que la inhibición sigue una cinética de pseudoprimer orden (10 minutos). En la figura 2A se graficaron los cursos temporales de la inhibición a diferentes concentraciones de EDC (2mM-10mM). El experimento se realizó en condiciones de pseudoprimer orden, ya que la concentración del modificador fue mucho más grande que la concentración de la enzima. Por tanto, se determinó la constante de pseudoprimer orden a partir de la pendiente de la recta (entre paréntesis en la gráfica). El valor de esta constante se regraficó en función de la concentración de EDC y se obtuvo una línea recta que parte del origen y con una pendiente que corresponde a una constante de velocidad de segundo orden. El valor de ésta fue de $18.2 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. La obtención de este parámetro es importante, ya que nos indica la reactividad del grupo modificado y su valor se discutirá al compararse con el valor obtenido para el DCCD.

3.2 IRREVERSIBILIDAD DE LA INHIBICIÓN POR EDC Y ESPECIFICIDAD DEL GRUPO MODIFICADO

En esta parte del trabajo fue importante establecer que en nuestras condiciones experimentales la reacción era irreversible, como se ha reportado por Khorana. Esta parte experimental está justificada, ya que si examinamos el mecanismo de reacción de las carbodiimidas vemos que en la fase inicial de la reacción, el grupo carboxilo con la carbodiimida forma O-acilisourea, molécula altamente reactiva que puede seguir varios caminos: 1) Puede rearrreglarse para dar un aducto estable la N-acilurea; 2) puede reaccionar con un nucleófilo endógeno o exógeno y formar un enlace covalente

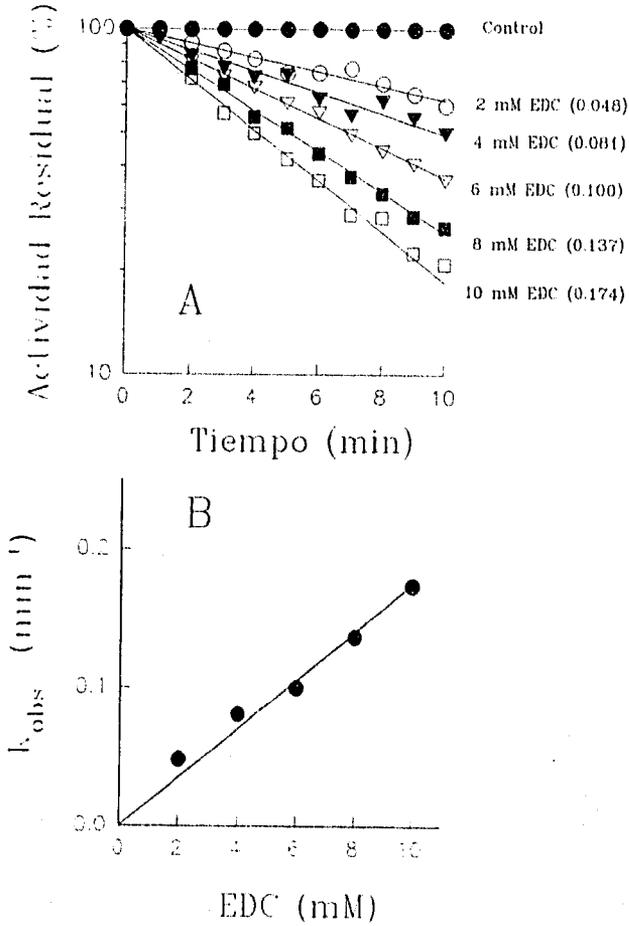


Fig. 2. Curso temporal de la actividad de la ATPasa a diferentes concentraciones de EDC. A. La enzima (0.5 mg/ml) se incubó a 30°C con 50 mM Mes-KOH, pH 6.5, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, por 2 minutos y la reacción se inició al añadir el EDC a la concentración indicada. Se tomaron alícuotas y se determinó la hidrólisis del ATP. **B** Regráfico de la constante de inactivación de pseudoprimer orden (k) contra la concentración de EDC. La constante de velocidad de segundo orden se obtiene de la pendiente de la recta.

o 3) el agua actuar como nucleófilo y regenerar el carboxilo (esquema 2).

Si la concentración de O-acilisourea es alta, al retirar el exceso de carbodiimida y dejar a la ATPasa en agua, se espera una recuperación de la actividad. En la figura 3 se muestra el logaritmo de la actividad específica de la ATPasa en función del tiempo, al ser modificada con 6 mM de EDC. Cuando la ATPasa ha perdido un 80% de su actividad original, se le eliminó el exceso de EDC mediante una columna de sephadex G-50 y se incubó por 50 minutos en un ambiente acuoso a 30° C. También se muestra la ATPasa control, sometida al mismo tratamiento, excepto que no tuvo contacto con el EDC. Los resultados indican que aunque disminuye un poco la actividad al pasar por la columna, sin embargo, no se recupera la actividad una vez que esta se perdió con el EDC, lo cual indica que la reacción de inactivación es irreversible y que la concentración de O-acilisourea es muy pequeña al final de la inhibición.

Con el fin de comprender con más detalle el mecanismo descrito en el esquema 2, se empleó un programa de simulación en donde las constantes de velocidad para cada uno de los posibles caminos a seguir de este carboxilo activado se ajustaron a diferentes valores. Un resultado de la simulación es que la concentración de la molécula de O-acilisourea debe ser muy baja en un ambiente acuoso, debido a su alta reactividad. Por tanto, la pérdida en la actividad de la ATPasa esta dada por el rearreglo, y/o la modificación con algún nucleófilo endógeno que se asociaría a la aparición de entrecruzamiento inter o intramolecular.

Otro punto importante que se investigó fue la selectividad del grupo modificado. Se conoce que las carbodiimidias reaccionan con otros grupos orgánicos funcionales además de los carboxilos. Sin embargo, se pueden encontrar las condiciones experimentales en las cuales la especificidad para carboxilos sea muy alta. En soluciones acuosas, a pH ácido o neutro y temperatura media, los

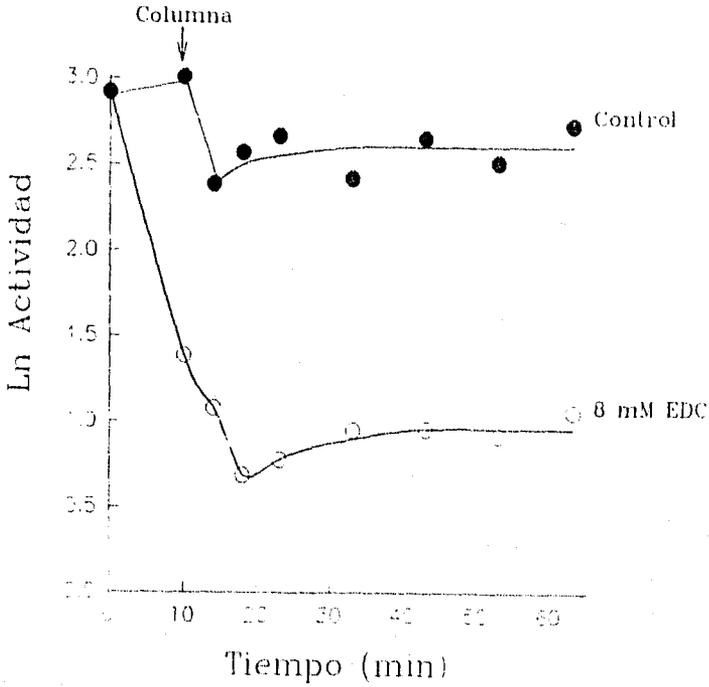


Fig. 3 Irreversibilidad de la inhibición de la ATPasa por EDC. Se incubó a la ATPasa (0.5 mg/ml) en 50 mM Mes-KOH, pH 6.5, 100 mM de KCl y 50 mM de NaCl, por 2 minutos, y se inició la reacción con 8 mM de EDC. Cuando la ATPasa perdió el 80% de su actividad, se pasó por una columna de sephadex y se colocó en el mismo amortiguador, a 30°C, por 50 minutos. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados. La ATPasa control se procesó de la misma manera, pero sin exponerla al EDC.

grupos que reaccionan predominantemente con las carbodiimidas son los carboxilos y los sulfhidrilos. En ciertas proteínas se ha encontrado que también las tirosinas reaccionan con las carbodiimidas. Sin embargo, las velocidades de reacción con carboxilos y sulfhidrilos son aproximadamente iguales, mientras que para tirosinas la reacción es mucho más lenta.

Los siguientes experimentos se encaminaron a investigar si participaban otros grupos, además de los carboxilos, en la inhibición observada por EDC.

Para descartar la participación de cisteínas, se empleó un reactivo específico de grupos sulfhidrilo, el metilmetatiosulfonato (MMTS) que modifica las cisteínas de la ATPasa pero no la inhibe. Se comprobó que la modificación con MMTS era completa ya que a la ATPasa tratada con MMTS, no se inhibe con N-etilmaleimida, mientras que la ATPasa control perdió su actividad en el primer minuto de incubación. Como se puede ver en la figura 4, la ATPasa modificada con MMTS se inactivó con el EDC en forma similar a la ATPasa control (sin ser tratada con MMTS), lo que sugiere que las cisteínas no participan en la inhibición de la ATPasa por EDC. No obstante, quedaba la posibilidad de que pudiera ser una tirosina la que reaccionara con la carbodiimida y participara en la inhibición.

Se ha reportado que las tirosinas modificadas con carbodiimidas se recuperan cuando la proteína se incuba en presencia de hidroxilamina (Perfetti, 1976). Por tanto, se realizó dicho procedimiento para conocer si ese residuo estaba participando en la inhibición. Se incubó a la ATPasa- MMTS, con 6 mM de EDC, hasta obtener una actividad residual del 20%, como se ve en la figura 5. Posteriormente se eliminó el EDC que no reaccionó y se incubó a la ATPasa durante 5 horas, a 30°C, en presencia de 200 mM de hidroxilamina. Los resultados muestran que la actividad de la ATPasa no se recuperó, lo cual indica que las tirosinas no están involucradas en la inhibición

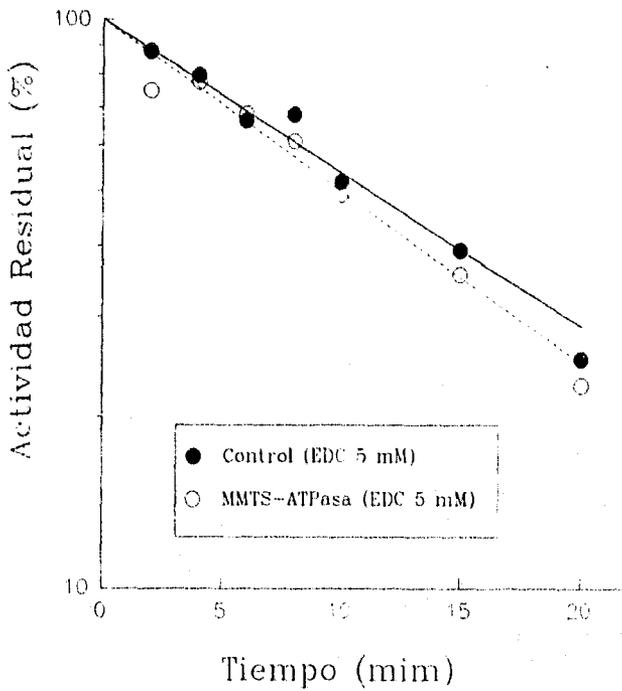


Fig. 4 Inhibición de la ATPasa nativa y modificada con MMTS con EDC. Ambas ATPasas (0.5 mg/ml) se incubaron con 50 mM de Mes-KOH, pH 6.5, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl. Se inició la reacción con 5 mM de EDC. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados, para determinar la actividad.

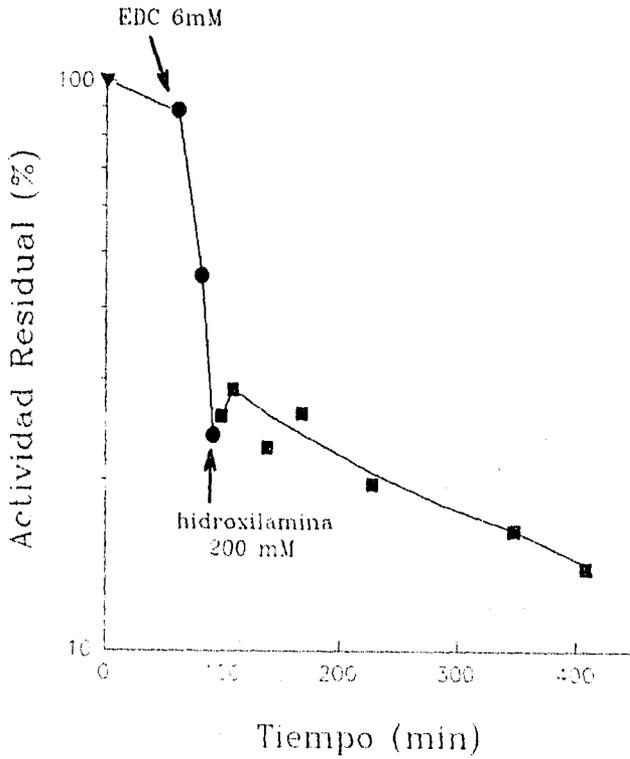


Fig. 5 Efecto de la hidroxilamina sobre la actividad de la ATPasa modificada con MMTS e inhibida con el EDC. La ATPasa tratada con MMTS se incubó en 100 mM de Mes-KOH pH 7.0, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, y se inhibió con 6 mM de EDC. Cuando la actividad residual disminuyó a un 20%, se pasó por una columna de sephadex, y se incubó en un medio que contenía 200 mM de hidroxilamina. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para determinar la actividad.

por EDC.

3.3 USO DE NUCLEÓFILOS EN LA INHIBICIÓN POR EDC

Los carboxilos activados por carbodiimidas son susceptibles a un ataque nucleofílico. Si el nucleófilo es endógeno, como sería por ejemplo el grupo amino de una lisina, se puede producir un entrecruzamiento intra o intermolecular, que podría ser la causa de la pérdida de la actividad y no la modificación *per se* del carboxilo. Si se añade al sistema un nucleófilo exógeno, como el ester de metilglicina o el ester de etilglicina, se puede formar un aducto estable con el carboxilo, que evita, en caso de que ocurra, el entrecruzamiento (reacción II, del esquema 2). Además de esta ventaja, los nucleófilos exógenos pueden adquirirse con marca radiactiva, la cual es útil en la identificación del o los carboxilos modificados. Por lo anterior, un estudio cinético de la inhibición en presencia de nucleófilos resulta de gran utilidad.

Se emplearon nucleófilos con carga negativa, como la taurina, nucleófilos sin carga, como el ester de metilglicina y el ester de etilglicina y con carga positiva, como la etilendiamina. Se preincubó a la ATPasa en presencia de diferentes concentraciones del nucleófilo y se inició la reacción de modificación con el EDC. Como se ve en la figura 6 y en la tabla 1, conforme se incrementa la concentración de nucleófilo, la constante de inhibición por EDC disminuye. La taurina tiene el menor efecto en la disminución de la constante de inhibición, protegiendo un 35%, mientras que la etilendiamina es la que tiene el mayor efecto, con una protección del 74%. El ester de metilglicina y el ester de etilglicina tienen un efecto intermedio, con una protección del 42 y 48.5 % respectivamente.

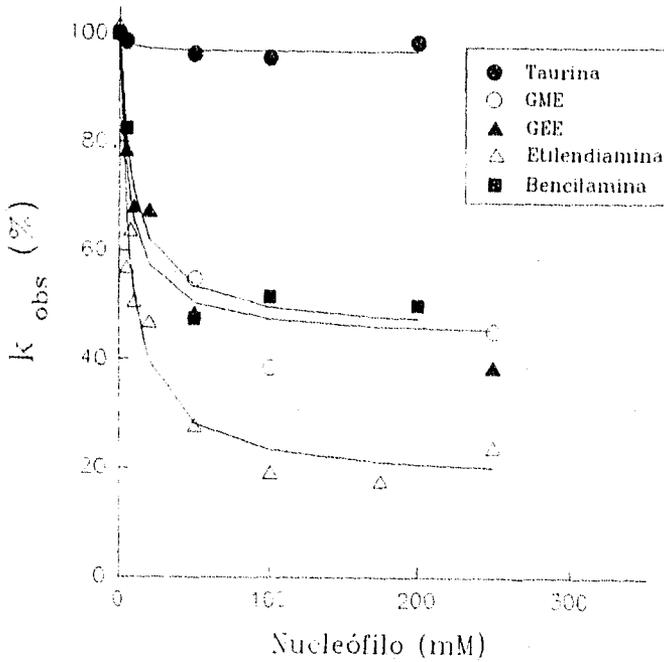


Fig. 6 Efecto los diferentes nucleófilos en la inhibición de la ATPasa por EDC. La ATPasa (0.5 mg/ml) se incubó en 50 mM de Mes-KOH, pH 6.5, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, en presencia de diferentes concentraciones de nucleófilo y se inició la reacción con 6 mM de EDC. A los diferentes tiempos se tomaron alícuotas para determinar la actividad. A partir de estos datos, se obtuvo la pendiente y se graficó en contra de la concentración de nucleófilo.

TABLA. 1 Efecto de algunos nucleófilos en la constante de inhibición del EDC

Control	+ Taurina	+ GME	+GEE	+BA	+EDA
k= 0.136	0.089	0.079	0.070	0.047	0.036
% inhibición	65.4	58	51.5	34.5	26.5
%entrecruzamiento	34.6	42	45	65.5	73.5

La concentración del EDC fue de 6 mM en todos los experimentos. La concentración de nucleófilo fue de 200 mM.

Este efecto protector de los nucleófilos se puede explicar mediante el esquema del mecanismo de reacción (esquema 2). En ausencia de un nucleófilo exógeno, los carboxilos activados por EDC, pueden producir fenómenos de entrecruzamiento al reaccionar con el grupo amino de una lisina, ya sea dentro de la misma enzima o de otra proteína. El nucleófilo exógeno compite con esta reacción y se evita el entrecruzamiento. Por tanto, en la modificación de la ATPasa con EDC se encuentra que parte de la inhibición se debe a entrecruzamiento y parte a la modificación *per se* del carboxilo, ya que aún a concentraciones grandes del nucleófilo, no desaparece la inhibición.

Lo que no está completamente claro es la diferencia en el efecto protector de cada uno de los nucleófilos, aunque una probable explicación resida en la diferencia en accesibilidad que pueden presentar cada uno de ellos.

3.4 USO DE GELES DE POLIACRILAMIDA PARA EVIDENCIAR FENÓMENOS DE ENTRECruzAMIENTO

Puesto que los experimentos con nucleófilo sugerían que parte de la inhibición se producía por fenómenos de entrecruzamiento, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida con el fin de ver si la banda de la ATPasa presentaba alguna diferencia en la movilidad electroforética. Si el entrecruzamiento era intramolecular, existía la posibilidad de que no se observara una diferencia aparente; sin embargo, si se tratara de un entrecruzamiento intermolecular, se esperaría la aparición de una o varias bandas de mayor peso molecular, junto con una disminución en la banda que corresponde a la ATPasa. Por tanto, se preincubó a la ATPasa (30 µg) por 2 minutos a 30° C, con 50 mM de Mes-KOH pH 6.5, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, en ausencia o presencia de 200 mM de los diferentes nucleófilos y se inició la reacción de inactivación con la adición de 6 mM de EDC, por 10 minutos. Se eliminó el exceso de carbodiimida que no reaccionó con columnas de sephadex y se corrieron las muestras en un gel de poliacrilamida tipo Laemmli en condiciones desnaturalizantes (0.1% de SDS). Los resultados se muestran en la figura 7. En el carril 1 se encuentran los marcadores de peso molecular (29, 45, 66, 97.4, 116 y 205 kDa). En el carril 2 está la ATPasa control, (incubada sin inhibidor y pasada por la columna); el carril 3 corresponde a la ATPasa incubada en presencia de EDC y ausencia de nucleófilo; y en los carriles del 4 al 8 está la ATPasa incubada con taurina, GME, GEE, etilendiamina y bencilamina respectivamente. Como se puede apreciar, el entrecruzamiento es intermolecular, ya que en ausencia del nucleófilo aparece una banda de alto peso molecular y desaparece la banda de la ATPasa (carril 3). Asimismo, el grado de entrecruzamiento con cada uno de los nucleófilos coincide con los resultados de la cinética: con

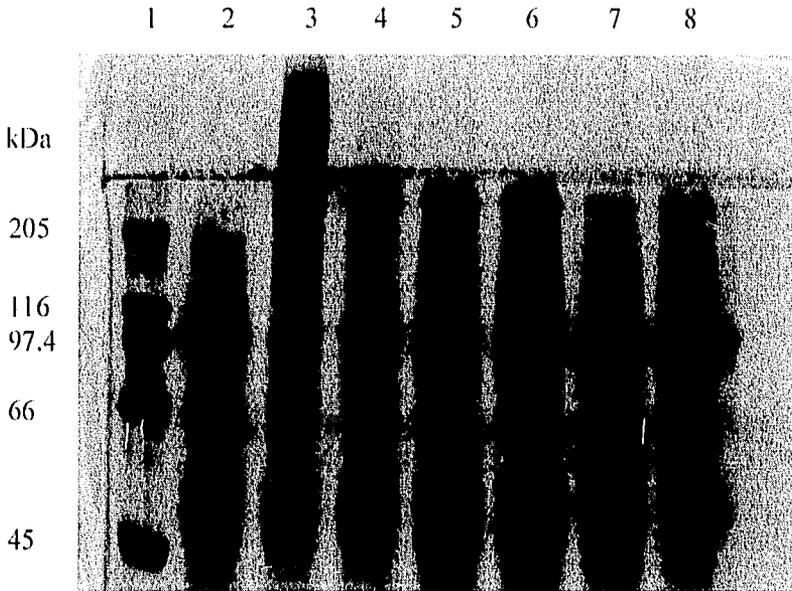


Fig. 7 Patrón electroforético de la ATPasa incubada en presencia de EDC y diferentes nucleófilos. En el carril 1 se muestran los marcadores de peso molecular (29, 45, 66, 97.4, 116 y 205 kDa); en el carril 2 la ATPasa control; en el carril 3, la ATPasa incubada con 6 mM de EDC, por 10 minutos a 30° C. Del carril 4 al carril 8 está la ATPasa incubada por 10 minutos, a 30° C, con 6 mM de EDC y 200 mM de los siguientes nucleófilos: taurina, GME, GEE, etilendiamina y bencilamina respectivamente. La cantidad de ATPasa para todas las condiciones fue de 30 µg.

taurina se presenta el mayor grado de entrecruzamiento, mientras que con la etilendiamina éste prácticamente desaparece. Con los otros nucleófilos vemos un efecto intermedio. De acuerdo con estos resultados, el nucleófilo de elección para identificar el residuo modificado es la etilendiamina (carril 7).

3.5 USO DE GELES DE POLIACRILAMIDA CON AMORTIGUADOR DE FOSFATOS TIPO WEBER, PARA DETERMINAR PESO MOLECULAR DE LA ATPasa ENTRECruzADA

Como se mostró en los dos puntos anteriores, la inhibición de la ATPasa por EDC en ausencia de nucleófilo se debe, en gran medida, al entrecruzamiento intermolecular. Con el fin de conocer el peso molecular de las especies que se forman durante el entrecruzamiento, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con amortiguador de fosfato, de acuerdo con el método reportado por Weber, K. (1969). Los resultados se muestran en la figura 8. En el carril 1 y 5 se encuentran los marcadores de alto peso molecular; en el carril 2 esta la fosforilasa b entrecruzada con bandas de peso molecular de 97.4, 194.8, 292, 389.6, 487 y 584.4 kDa, que corresponden al monómero, dímero, trímero, tetrámero, pentámero y hexámero respectivamente. En el carril 3 esta la ATPasa control, sin modificar con EDC, y en el carril 4 esta la ATPasa modificada con 6 mM de EDC por 10 minutos a 30°C. Los resultados muestran que la ATPasa se entrecruza para dar un dímero, trímero, tetrámero y probablemente pentámero, lo cual sugiere que la ATPasa funciona probablemente como monómero o en un equilibrio monómero-dímero. Este dato es importante, debido a que no se conoce la forma funcional de la ATPasa de *K. lactis* lo mismo que de otras ATPasas de este tipo.

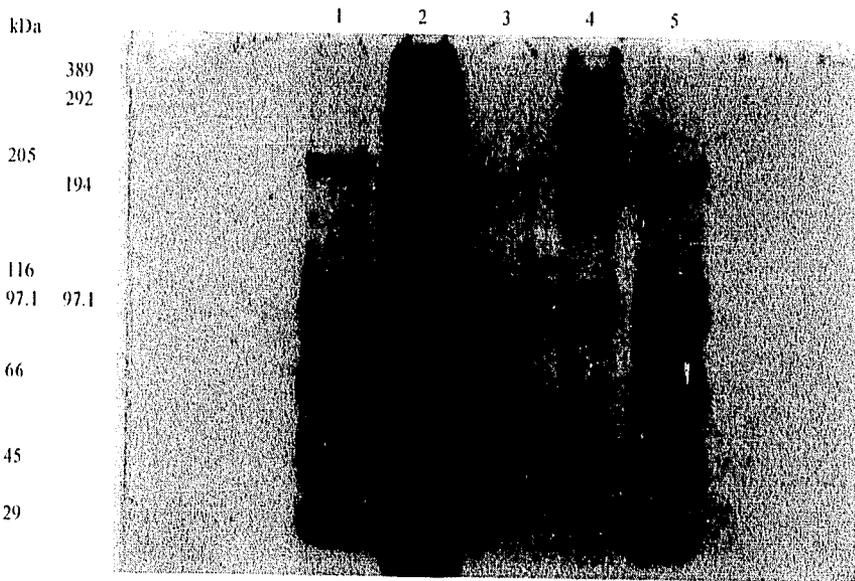


Fig. 8 Patrón electroforético de la ATPasa entrecruzada con EDC. En el carril 1 y 5 se encuentran los marcadores de peso molecular (29, 45, 66, 97.1, 116 y 205 kDa). En el carril 2 se encuentra la fosforilasa entrecruzada que da seis bandas con los siguientes pesos moleculares: (97.4, 194.8, 292, 389.6, 487 y 584.4 kDa), que corresponden al monómero, dímero, trímero, tetrámero, pentámero y hexámero, respectivamente. En el carril 3 está la ATPasa control (20 μ g). En el carril 4 está la ATPasa (20 μ g) incubada con 6 mM de EDC, por 10 minutos a 30 $^{\circ}$ C. Se determinaron los R_f y se calcularon los P.M.

3. 6 EFECTO DE LIGANDOS FISIOLÓGICOS SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA ATPasa POR EDC

Con los estudios de modificación química es difícil demostrar concluyentemente la participación de un aminoácido en la unión del sustrato o en la catálisis. Sin embargo, cierto tipo de experimentos pueden sugerir tal participación. Tal es el caso de los experimentos de protección, en los cuales se estudia el efecto del sustrato o de otros ligandos sobre la inhibición y la velocidad de modificación de una enzima. Estos estudios pueden, cuando la protección es total, sugerir la localización del residuo involucrado en la inhibición. De tal manera que la incubación de la enzima con el inhibidor en ausencia y presencia del ligando, hace posible la identificación del residuo modificado.

Se evaluó la influencia del Mg-ADP (inhibidor competitivo), del Mg²⁺ (inhibidor no competitivo) y del vanadato (inhibidor no competitivo), sobre la inactivación de la ATPasa por el EDC. Los resultados se muestran en la figura 9 y en la tabla 2. Como se puede observar, existe una protección parcial con cada uno de los ligandos empleados, lo cual indica que estos ligandos inducen un cambio conformacional de la enzima que altera la reactividad del grupo, pero seguramente el carboxilo no se encuentra en ninguno de los sitios de unión. Por lo que para fines de identificación del carboxilo, esta protección no fue suficiente.

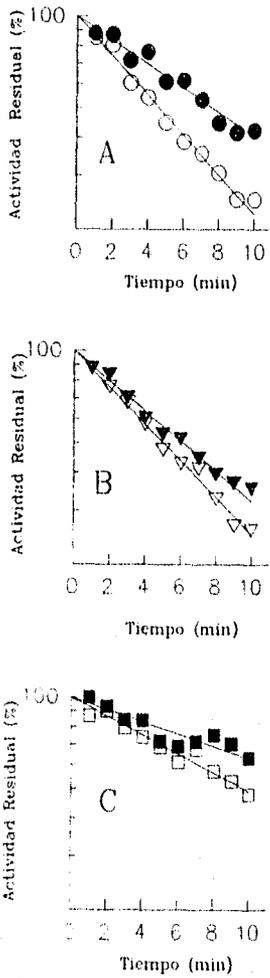


Fig. 9 Efecto de los ligandos en la inhibición de la actividad hidrolítica de la ATPasa por EDC. La ATPasa (0.5 mg/ml) se preincubó con 50 mM de Mes-KOH, pH 6.5, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, en ausencia o presencia de los siguientes ligandos: 20 mM Mg-ADP (●), ó 5 mM de Mg^{2+} (▼) ó 100 μ M de vanadato (■), por 2 minutos a 30°C. Se inició la reacción con la adición de 25 mM de EDC (○), 12 mM de EDC (▼), 15 mM de EDC (□). Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados y se determinó hidrólisis de ATP.

TABLA 2. EFECTO DE LIGANDOS.

Constantes de inhibición (min^{-1})

Condición	Control (- ligando)	+ ligando	% de protección
25 mM de EDC, 200 mM de EDA, 20 mM de Mg-ADP	0.153	0.092	39.9
12 mM de EDC, 250 mM de GEE, 5 mM de Mg^{2+}	0.139	0.117	15.8
15 mM de EDC, 200 mM de EDA, 100 μM de vanadato	0.073	0.046	37.0

3.7 INHIBICIÓN DE LA ATPasa POR EDC A DIFERENTES VALORES DE pH

Koshland reportó que la modificación de los grupos carboxilo se favorece a pH ácidos, y por tanto, la forma protonada es la que participa en la reacción. Los resultados obtenidos con el EDC en presencia de nucleófilo a diferentes valores de pH se muestran en la figura 10. En el panel A se grafica el curso temporal de la inhibición de la ATPasa por 6 mM de EDC al variar el pH. Como puede observarse, la inhibición se presentó a pH ácido, y por arriba de pH 7.0 la ATPasa prácticamente no se inhibe, lo cual indica que la forma desprotonada del carboxilo no reacciona con el EDC. En el panel B se graficó la constante de inactivación a los diferentes valores de pH, con el fin de obtener el pKa del grupo modificado. Como puede verse la curva no muestra una titulación completa, debido a que a valores de pH por debajo de 5.5 la ATPasa se inactiva. Sin embargo, el número de puntos y el intervalo de pH en el que caen es suficiente para determinar un pKa

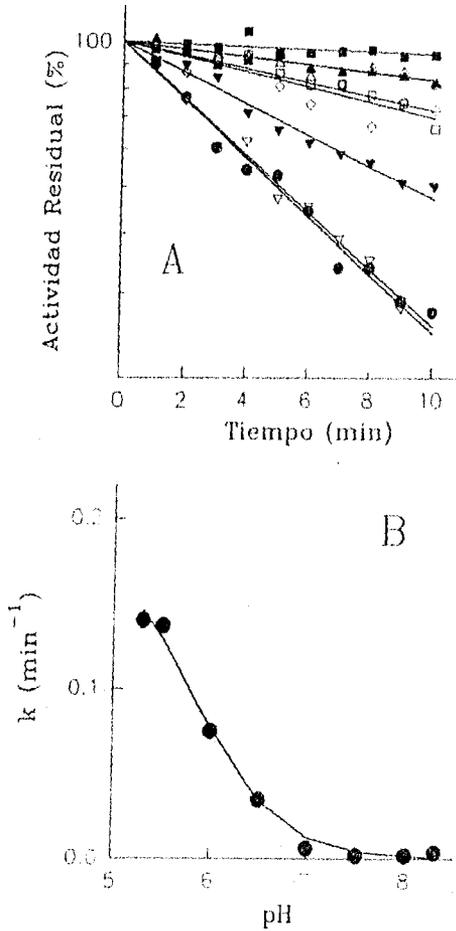


Fig. 10 Dependencia del pH en la inhibición de la actividad hidrolítica de la ATPasa por EDC. A. Curso temporal de inhibición con EDC a diferentes valores de pH. pH 5.5 (•), pH 6.0 (◐), pH 6.5 (▽), pH 7.0 (◑), pH 7.5 (◓), pH 8.0 (◒). B. Regráfico de la constante de inactivación de pseudoprimer orden (k) contra el pH. Se usó la ecuación no lineal: $(k_1 * H + k_2 * K_2 / K_1 + H)$ obteniendo un pKa aparente de 5.84.

aproximado del o los carboxilos mediante la ecuación $k_{app} = (k_1 \cdot H + k_2 \cdot K_a) / (K_a + H)$. El pKa que se obtuvo fue de 5.84, que comparado con el pKa de un residuo de glutámico o aspártico expuesto al solvente que es de 4.4 nos indica que el o los carboxilos que reaccionan con el EDC se encuentran parcialmente ocultos al solvente acuoso.

3.8 EFECTO DEL DCCD SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE LA ATPasa

La segunda carbodiimida que se ensayó fue el DCCD. Esta carbodiimida, a diferencia del EDC, reacciona con carboxilos de localización membranal, por lo que suponemos que modifica otros carboxilos.

El curso temporal de inactivación de la ATPasa por DCCD mostró también una cinética compleja a tiempos largos al igual que con el EDC. Se demostró que esta complejidad se debe en parte, a la degradación del DCCD que es significativa a tiempos largos. De manera similar al EDC, se trabajó dentro de los primeros 10 minutos de inicio de la reacción. Primero se estudió la pérdida de la actividad a diferentes concentraciones de DCCD (100-600 μ M) con respecto al tiempo. La concentración requerida para inhibir a la ATPasa está en el orden micromolar, a diferencia del EDC que fue de milimolar. Esto es consistente con lo que esperábamos, ya que la reactividad de un grupo carboxilo se incrementa cuando se encuentra en un ambiente hidrofóbico. La constante de velocidad de segundo orden fue de $420 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, y se obtuvo de la pendiente de la relación lineal entre las constantes de inhibición (k) y la concentración de DCCD. Asimismo, esta relación lineal indica que la reacción entre el carboxilo y la carbodiimida es bimolecular. Por tanto, la reactividad del o los carboxilos modificados por el DCCD es por lo menos un orden de magnitud mayor que la del o los carboxilos modificados por el EDC.

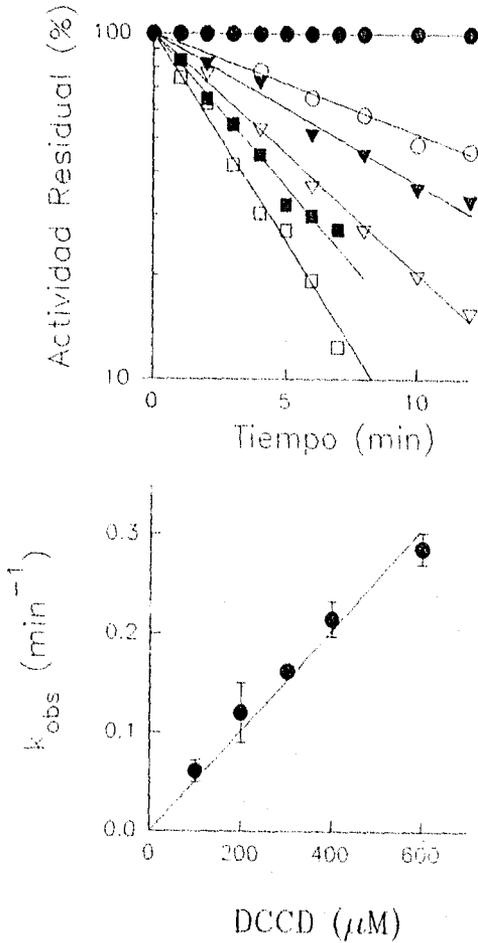


Fig. 11 Curso temporal de la actividad de la ATPasa a diferentes concentraciones de DCCD. **A.** La ATPasa (0.5 mg/ml) se incubó con 50 mM de Mes-KOH pH 6.5, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, por 2 minutos a 30°C. La reacción se inició al añadir las siguientes concentraciones de DCCD (μ M). Control (●), 100 (○), 200 (◐), 300 (◑), 400 (◒) y 600 (◓). **B.** Gráfica de la constante de inactivación de pseudoprimer orden (k) contra la concentración de DCCD. La constante de velocidad de segundo orden se obtiene de la pendiente de la recta.

3.9 IRREVERSIBILIDAD DE LA INHIBICIÓN POR DCCD Y ESPECIFICIDAD DEL GRUPO MODIFICADO

Aunque el mecanismo de reacción de las carbodimidas se obtuvo en medio acuoso y no en solventes no polares, no es sorprendente que la formación del carboxilo activado (O-acilisourea) ocurra en un ambiente hidrofóbico, por lo que se debe esperar una baja probabilidad de que el carboxilo se regenere por el ataque nucleofílico del agua. En los experimentos con EDC, se encontró que la concentración de O-acilisourea era muy baja, debido a: 1) un ataque nucleofílico del agua, 2) un ataque por un nucleófilo endógeno o exógeno y 3) el rearrreglo. Sin embargo, en un ambiente hidrofóbico la permanencia de esta molécula podría ser mayor, con lo cual la posibilidad de que ocurra la regeneración del carboxilo se incrementaba. Por tanto, se preincubó a la ATPasa (0.5 mg/ml) con un amortiguador Mes- KOH, pH 6.5, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, por 2 minutos a 30°C, y se inició la reacción con 400 μ M de DCCD, para obtener una ATPasa con una actividad residual del 20%, en seguida se eliminó el exceso de DCCD, y se ensayó la actividad de la ATPasa. Los resultados indican que la actividad no se recuperó al incubarse por 2 hr en un ambiente acuoso, a 30°C.

También se realizaron experimentos similares a los descritos en la sección del EDC para confirmar que la inhibición de la ATPasa por DCCD estaba mediada única y exclusivamente por la modificación de carboxilos, y no por la participación de grupos sulfhidrilo o de tirosinas.

3.10 USO DE NUCLEÓFILOS EN LA INHIBICIÓN POR DCCD

Como se mencionó, los nucleófilos exógenos previenen, en caso de que se presente, el entrecruzamiento, ya que disminuyen o eliminan la probabilidad de que nucleófilos endógenos de la proteína reaccionen con el carboxilo activado. Con base en los datos obtenidos con el EDC, se esperaba que los nucleófilos protegieran a la ATPasa si la inhibición observada con el DCCD incluyera el entrecruzamiento de la enzima. Sin embargo, al estudiar la inhibición con DCCD en presencia de diferentes nucleófilos, no sólo no se presentó la protección esperada, sino que los nucleófilos aceleraron la velocidad de inhibición de la ATPasa, lo cual se reflejó en un incremento en la constante de inhibición, ver figura 12 y tabla 3.

TABLA 3. Efecto de algunos nucleófilos en la constante de inhibición del DCCD

Control	+GME	+GEE	+EDA	+BA
k= 0.189	0.265	0.232	0.340	1.27
% aceleración	40	22	79	572

La concentración de DCCD fue de 600 μ M. La concentración fue de 250 mM para la GME y la GEE. La concentración fue de 200 mM para la EDA y la BA.

Este efecto ya había sido reportado anteriormente por Korner y Lacombe (1982), quienes encontraron que el nucleófilo 3-nitro-L-éster de etiltirosina, aceleraba la inhibición del subfragmento I de la miosina con carbodiimidias; sin embargo, no proponen una explicación del fenómeno encontrado. En el caso de la ATPasa, una posible explicación de este resultado podría ser que existe una interacción específica de la ATPasa con el nucleófilo, como se muestra en el siguiente esquema:

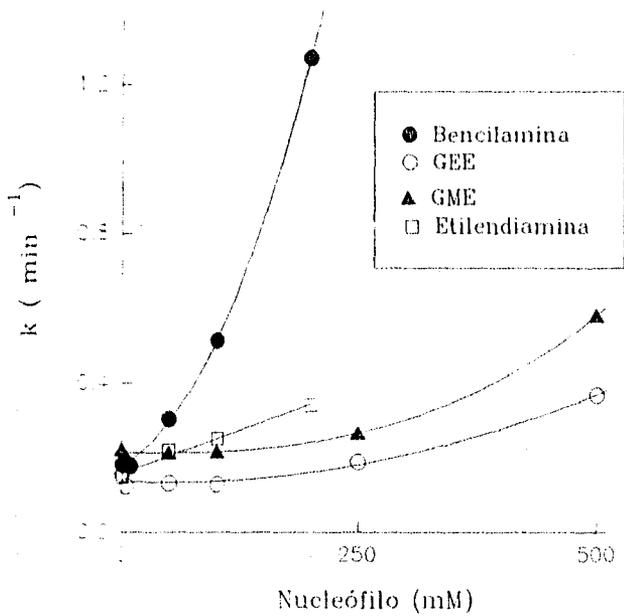
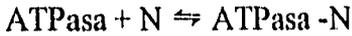


Fig. 12 Efecto de diferentes nucleófilos en la constante de inhibición de la ATPasa por DCCD. La ATPasa (0.25 mg/ml) se incubó con 50 mM de Mes-KOH, pH 6.5, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, con diferentes concentraciones de los diferentes nucleófilos, por 2 minutos, a 30°C. Se inició la reacción con 300 μM de DCCD. Cada punto en la gráfica es la pendiente de un curso temporal de inhibición por DCCD a la concentración indicada del nucleófilo.


$$\downarrow k_1$$
$$\downarrow k_2$$

$$k_1 \ll k_2$$

Dicha interacción se asociaría con un cambio conformacional de la proteína que produjera un incremento en la reactividad de los mismos carboxilos, o una exposición de otros residuos que reaccionarían con el DCCD. Por tanto, se realizaron los experimentos encaminados a ver el efecto de dichos nucleófilos sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa.

Los resultados se muestran en la figura 13, en donde al aumentar la concentración de cualquiera de los nucleófilos, disminuye la actividad hidrolítica de la ATPasa. La inhibición fue menor con la GME, en donde una concentración de 200 mM inhibió únicamente el 50% de la actividad, mientras que la bencilamina presentó la mayor inhibición, pues a 50 mM inhibió completamente la actividad de la ATPasa. Estos resultados apoyan la idea original, en donde se propone que existe una interacción directa entre la ATPasa y los nucleófilos. Dicha interacción puede inducir un cambio en el microambiente de los grupos originales, o exponer otros residuos que ahora son accesibles al DCCD. En ambos casos, se explica el incremento de la constante de inhibición. Aunado a estos resultados, se encontró que en presencia del nucleófilo disminuye la estabilidad de la ATPasa en etanol, lo cual apoya la propuesta de que la conformación de la ATPasa en presencia de nucleófilo es diferente.

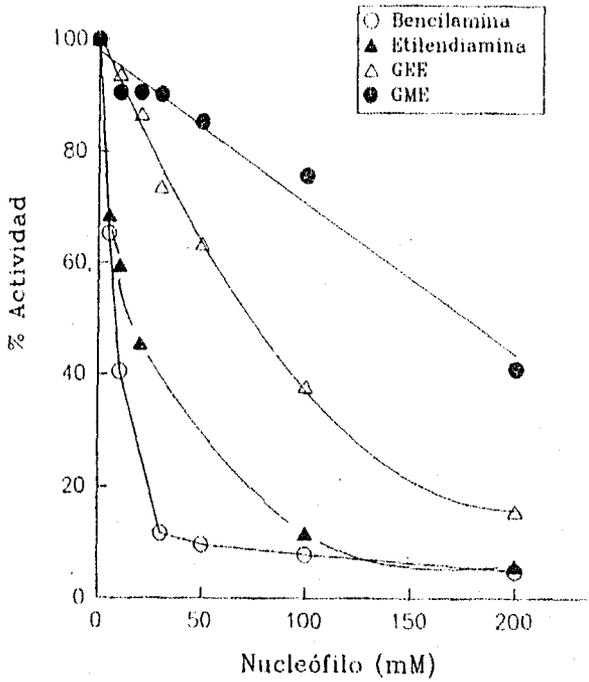


Fig. 13 Inhibición en la actividad hidrolítica de la ATPasa por diferentes nucleófilos. En un medio que contiene 50 mM de Mes-KOH, pH 6.5, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, 100 mM de ATP-Mg, pH 7.25, a diferentes concentraciones de nucleófilo, se midió la hidrólisis de ATP. La reacción se inició con la ATPasa (0.2 mg/ml), se incubó por 10 minutos a 30°C y se determinó el Pi liberado.

3.11 USO DE GELES DE POLIACRILAMIDA PARA EVIDENCIAR FENÓMENOS DE ENTRECruzAMIENTO ASOCIADOS

Nuevamente se exploró si en ausencia de nucleófilo exógeno la ATPasa presentaba fenómenos de entrecruzamiento. Además, se investigó si había una diferencia en el patrón electroforético de la ATPasa al preincubarla con diferentes nucleófilos. El nucleófilo de elección fue la bencilamina, ya que éste es el que presenta una interacción mas fuerte con la ATPasa.

Se incubaron 20 μ g de ATPasa con 200 μ M de DCCD en ausencia o presencia de 200 mM de bencilamina, a los tiempos indicados en la figura 14 y se pasaron por una columna de Penefsky para remover el DCCD libre. La electroforesis se realizó en condiciones desnaturizantes en un gel de poliacrilamida. En el carril 1 se colocaron los marcadores de peso molecular, en el carril 2 la ATPasa control (enzima incubada en el medio sin DCCD), en el carril 3 la ATPasa incubada con 200 mM de bencilamina, en el carril 4 la ATPasa con 200 μ M de DCCD y en el carril 5 la ATPasa con 200 μ M de DCCD y 200 mM de bencilamina. Como se puede observar, la banda de la ATPasa en el control, es idéntica a la de las otras condiciones, por lo que se puede descartar que el DCCD produzca fenómenos de entrecruzamiento intermolecular, los cuales se evidenciarían por la aparición de bandas de peso molecular más grandes que 100 kDa. Sin embargo, con este experimento no se descarta la presencia de entrecruzamiento intramolecular. También se descartó la posibilidad de que el nucleófilo estuviera produciendo fenómenos de agregación irreversible de la proteína, y que estos fueran los responsables del incremento en la inhibición por DCCD. Del carril 6 al 9 es el mismo experimento, a 0° C.

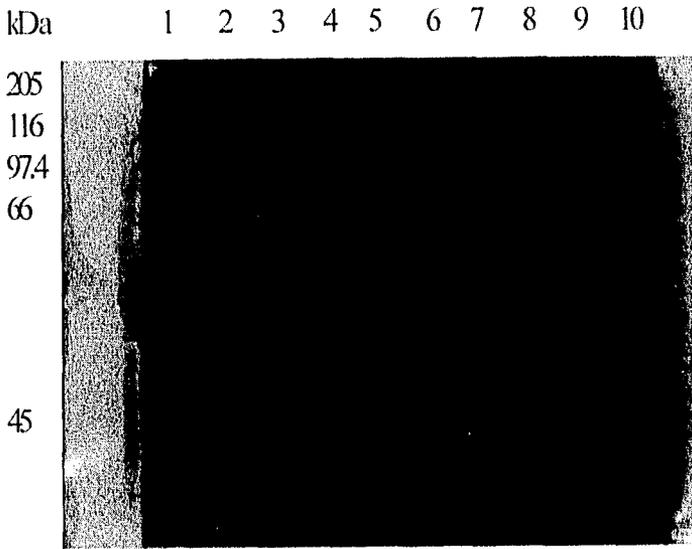


Fig. 14 Patrón electroforético de la ATPasa incubada en presencia de DCCD y bencilamina. En el carril 1 están los marcadores de peso molecular (29, 45, 66, 97.4, 116, y 205 kDa). En el carril 2 está la ATPasa control incubada por 20 min a 30^o. En el carril 3 está la ATPasa preincubada con 200mM de bencilamina, sin DCCD por 9 minutos. En el carril 4 está la ATPasa inhibida con 200 μ M, por 20 minutos. En el carril 5 está la ATPasa preincubada con 200 mM de bencilamina e inhibida con 200 μ M de DCCD, por 7 minutos a 30^oC. Después del tiempo de incubación indicado para cada condición, se pasaron las muestras por una columna de Penefsky y se realizó su electroforesis. La cantidad de ATPasa fue de 20 μ g por carril.

3.12 EFECTO DE LIGANDOS FISIOLÓGICOS EN LA INACTIVACIÓN DE LA ATPasa POR EL DCCD

Como el efecto de los nucleófilos no está completamente claro, y en vista de que no existía entrecruzamiento en la inhibición por DCCD, se decidió trabajar en ausencia de nucleófilos, para estudiar el efecto de los ligandos sobre la inhibición de la ATPasa.

En la figura 15 y en la tabla 4 se muestran los resultados de la inhibición de la ATPasa por el DCCD en ausencia o en presencia de varios ligandos. Como se puede observar, la inhibición disminuye ligeramente en presencia de Mg-ADP o Mg^{2+} , lo que sugiere que el o los carboxilos modificados por DCCD no participan en el pegado del sustrato o del catión. Por otro lado, con el vanadato se encuentra una buena protección, que depende de la concentración de vanadato y que alcanza un máximo a $100 \mu M$ (50%). Sin embargo, debido a que este resultado no es completamente reproducible, no se trabajó con vanadato en el momento de la marca. Esto se puede atribuir a las variaciones que hay de preparación a preparación.

TABLA 4. EFECTO DE LIGANDOS

Control	20 mM de Mg-ADP	5 mM de Mg^{2+}	100 μM de vanadato
k= 0,114	0.101	0.105	0.066
% de protección	11.4	8	61.5

La concentración del DCCD fue de $200 \mu M$.

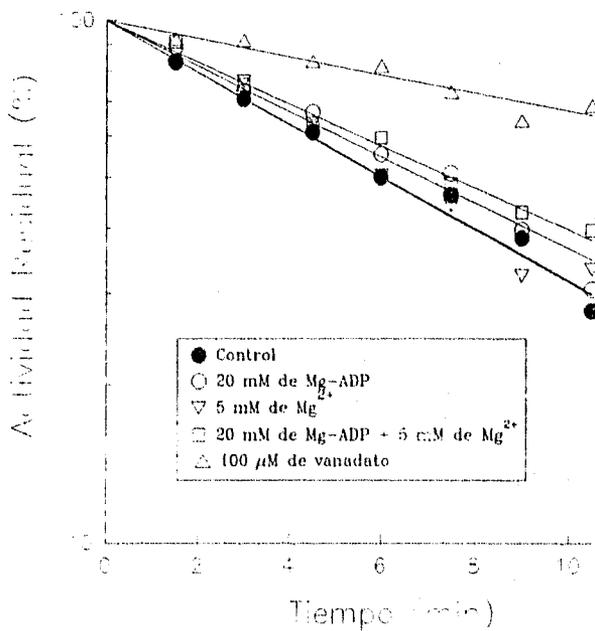


Fig. 15 Efecto de los ligandos en la inhibición de la actividad hidrolítica de la ATPasa por DCCD. La ATPasa (0.25 mg/ml) se incubó con 50 mM de Mes-KOH, pH 6.5, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, por 2 minutos, a 30°C en presencia de alguno de los siguientes ligandos: 20 mM de Mg-ADP + 5 mM de Mg²⁺, 20 mM de Mg-ADP o 100 μM de vanadato. Se inició la reacción con 200 μM de DCCD. Se tomaron alicuotas en los tiempos indicados y se determinó la hidrólisis de ATP.

3.13 INHIBICIÓN DE LA ATPasa POR DCCD A DIFERENTES VALORES DE pH

Se estudió la inhibición de la ATPasa con 300 μ M de DCCD en medios amortiguados a diferentes pHs. Debido a la gran inestabilidad de la ATPasa a pH ácido, no se estudió la inactivación por debajo de pH 5.0. Como sucedió con el EDC, la inhibición fue mucho mayor a pH ácido que a pH básico (figura 16), lo que indica que la forma protonada es la que preferentemente reacciona. Sin embargo, en el caso del DCCD, la forma desprotonada también reacciona con las carbodiimidas, aunque con una constante más pequeña. Los datos se ajustaron por medio de regresión no lineal a la ecuación: $k_{app} = (k_1 * H + k_1 * K_2 / K_2 + H)$ y se obtuvo un pK de 6.5. Este valor sugiere que el carboxilo modificado se encuentra en un ambiente hidrofóbico (oculto), puesto que es mucho mayor que el pKa de los carboxilos expuestos. Esto concuerda con lo reportado por Cantor y Schimmel (1980) en cuanto a que valores de pKa en residuos ocultos presentan un corrimiento a valores de pH básico.

3.14 DETERMINACIÓN DE LA ESTEQUIOMETRÍA EN LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE LA ATPasa CON ¹⁴C-DCCD

Ya que ninguno de los ligandos presentó una buena protección que sirviese para identificar al carboxilo modificado, se decidió realizar el experimento en presencia de bencilamina, para obtener información adicional sobre su efecto en la modificación con DCCD. Con base en las condiciones cinéticas ya establecidas, se modificó a la ATPasa (0.5 mg/ml) con 300 y 200 μ M de ¹⁴C-DCCD en ausencia y presencia de 200 mM de bencilamina, por 5 y 2.5 minutos (tiempos cortos) y 15 y 8 minutos (tiempos largos) respectivamente, a 30° C. Los resultados se presentan en

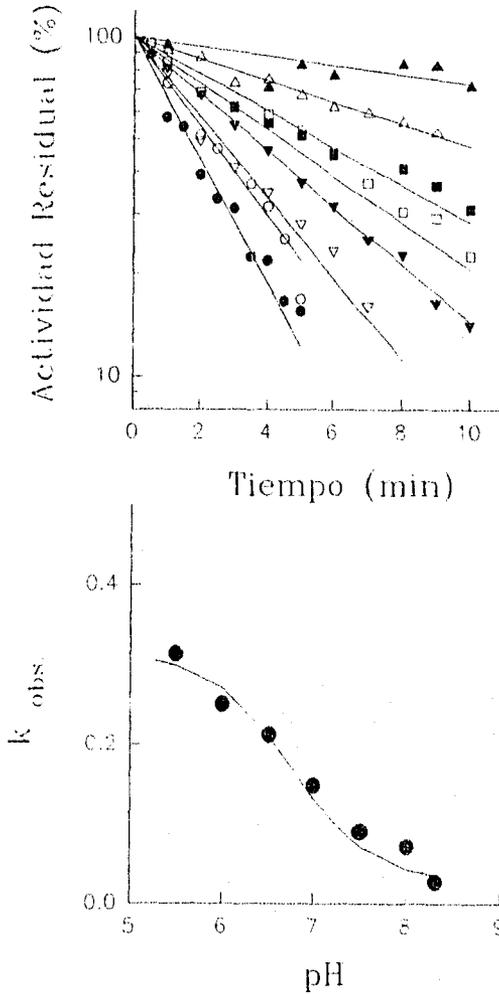


Fig. 16 Dependencia del pH en la inhibición de la actividad de hidrólisis de la ATPasa por DCCD. **A.** Curso temporal de inhibición en la actividad de ATPasa con DCCD a diferentes valores de pH. **B.** Regráfico de la constante de inactivación (k) contra el pH. Se usó la ecuación no lineal: $(k_1 \cdot H + k_2 \cdot K_1 / K_1 + H)$ para obtener el pKa aparente de 6.5.

la figura 17. En la parte superior se muestran la incorporación de ^{14}C -DCCD con respecto al tiempo en ausencia y presencia de bencilamina y en la parte inferior se muestra la relación de la actividad residual contra la incorporación de ^{14}C -DCCD. De acuerdo con estos resultados, extrapolando al 100% de la inhibición, se alcanza una incorporación de 1 mol de DCCD por mol de ATPasa, en ausencia de bencilamina, mientras que para el caso en presencia de bencilamina fue de 2 moles de DCCD por mol de ATPasa. Esto indica que el nucleófilo expone un nuevo sitio que se marca con DCCD y acelera la inhibición.

3.15 USO DE UNA CARBODIIMIDA CON PROPIEDADES FLUORESCENTES

Con la finalidad de identificar la región modificada por el DCCD se empleó un análogo fluorescente, la N-ciclohexil-N'-(4-dimetilaminonaftilcarbodiimida), (NCD-4). La ATPasa se inhibió a concentraciones de NCD-4 mucho mayores que las usadas con el DCCD, por lo que su reactividad es mucho menor. Conociendo el efecto de la bencilamina con el DCCD, se incubó a la ATPasa con bencilamina y el NCD-4. Como puede verse en la figura 18 A, la cinética de inhibición a diferentes concentraciones de NCD-4 en presencia de 200 mM de bencilamina es lineal hasta 20 minutos. Cuando las constantes de pseudoprimer orden se graficaron en contra de la concentración de NCD-4, se obtuvo una línea recta (figura 18 B). A partir de la pendiente se calculó una constante de velocidad de segundo orden de $110 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. No obstante la baja reactividad de esta carbodiimida, la ATPasa fue la única proteína que se modificó con NCD-4 y mostró fluorescencia en los geles de poliacrilamida al iluminarlos con una lámpara de UV. La ATPasa se extrajo por electroelución, se digirió con tripsina y los péptidos se separaron en una segunda electroforesis en geles con un gradiente de poliacrilamida (4-18%). Aunque la tripsina cortó a la ATPasa en varios

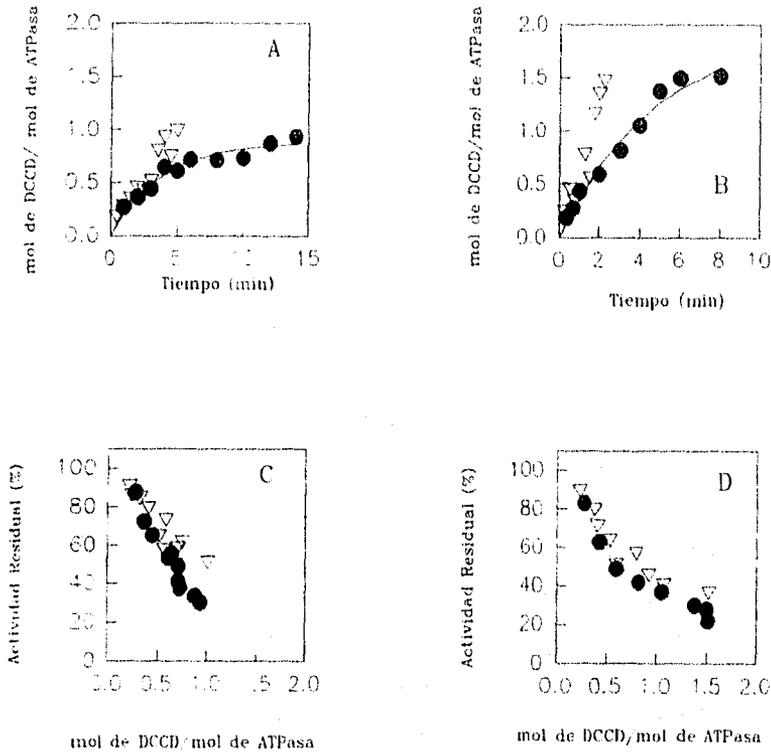


Fig. 17 Estequiometría de la inhibición por DCCD. A La ATPasa (0.5 mg/ml) se incubó en 50 mM de Mes-KOH, pH 6.0, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, en ausencia de benzilamina. Se inició la reacción con 300 μ M del 14 C-DCCD. B La ATPasa (0.5 mg/ml) se incubó en 50 mM de Mes-KOH, pH 6.0, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl y 200 mM de benzilamina. Se inició la reacción con 200 μ M del 14 C-DCCD. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para medir actividad y cuentas totales. C y D Regráficos la actividad residual de la ATPasa contra incorporación de moles de DCCD por mol de ATPasa en ausencia y presencia de benzilamina. (La línea continua se obtiene por un programa de ajuste de curvas).

péptido marcado con ^{14}C -DCCD, para de esta manera, identificar el carboxilo que reacciona con DCCD en ausencia de bencilamina y los carboxilos que reaccionan con el DCCD en presencia de bencilamina.

Por otra parte, un punto interesante que aún no se ha explorado, es que en ausencia de bencilamina la ATPasa se marca con NCD-4, con una intensidad un poco menor, pero sin pérdida de actividad. Esto abre la posibilidad de monitorear cambios conformacionales en la enzima con diferentes ligandos e inhibidores.

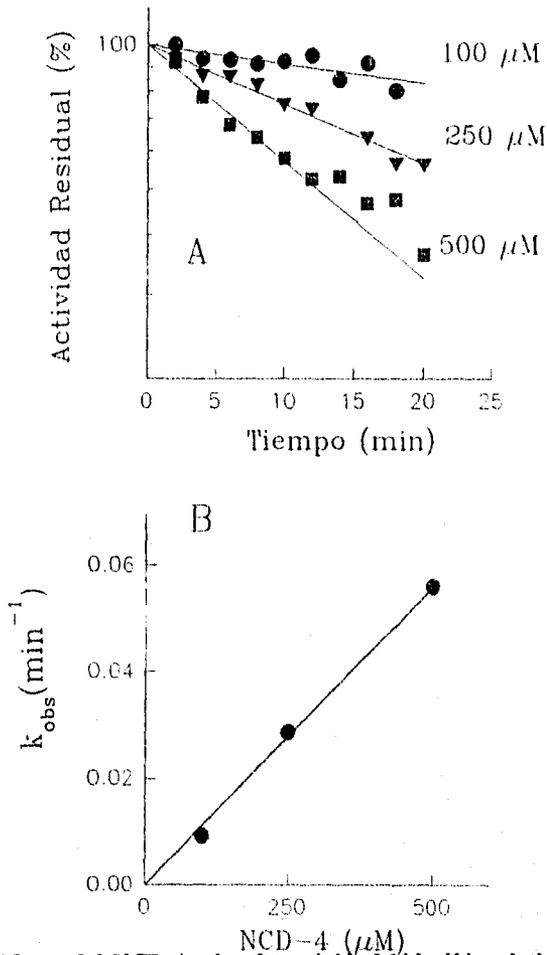


Fig. 18 Efecto del NCD-4 sobre la actividad hidrolítica de la ATPasa. A. La ATPasa (0.25 mg/ml) se incubó con 50 mM de Mes-KOH, pH 5.5, 100 mM de KCl, 50 mM de NaCl, 200 mM de bencilamina por 2 minutos, a 30°C. Se inició la reacción al añadir diferentes concentraciones de NCD-4 (100-500 μM). Se tomaron alícuotas y se determinó hidrólisis de ATP. B. Regráfico de la constante de inhibición de pseudoprimer orden dependiente (k) contra la concentración de NCD-4. La constante de velocidad de segundo orden se obtiene de la pendiente de la recta.

4. *Discusión*

La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de la levadura se modificó con dos carbodiimidas. La reactividad de la ATPasa con cada una de ellas dependió de su tipo, de su carga y de su estructura, así como de la localización del carboxilo en la proteína y de las condiciones experimentales.

4.1 LA REACTIVIDAD DE LA ATPasa CON LAS CARBODIIMIDAS. El EDC es una carbodiimida hidrofílica, pequeña y con carga positiva, mientras que el DCCD es una carbodiimida hidrofóbica, con una estructura voluminosa y sin carga. Por esta razón, es probable que estas dos carbodiimidas hayan reaccionado con diferentes carboxilos.

Ambas carbodiimidas produjeron una inhibición irreversible de la actividad de la ATPasa de H⁺. Sin embargo, la concentración de EDC que se necesitó para inhibirla está en el orden milimolar, mientras que para el DCCD fue micromolar. Estos resultados concuerdan con los datos de la literatura. En la ATPasa de Na-K se ha reportado que se inhibe a concentraciones milimolares con una carbodiimida soluble (Pedemonte, 1990), mientras que Gorga, con esta misma ATPasa, reportó que se inhibe con concentraciones micromolares de DCCD (1990).

Mediante el análisis cinético se determinó la constante de segundo orden para ambas carbodiimidas, con un valor de $9.9 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el EDC en presencia de nucleófilo y de $420 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ para el DCCD. Este parámetro indica la reactividad del residuo que participa en la reacción: la del DCCD es por lo menos 40 veces mayor que la del EDC. Este aumento en reactividad sugiere

que los carboxilos que reaccionan con el DCCD se encuentran en un ambiente mas hidrofóbico.

Al comparar el valor de la constante de velocidad de segundo orden para la inactivación de la ATPasa con el EDC con los reportados para la inhibición de la ATPasa de Na⁺-K⁺ de riñón de perro, de 11.1 M⁻¹ min⁻¹ (Pedemonte, 1986) y de una pirofosfatasa de membrana de bacteria fotosintética, 16.9 M⁻¹ min⁻¹ (Romero, 1992), se observa que las tres enzimas presentan una reactividad similar.

Con respecto al DCCD, el valor de la constante de velocidad de segundo orden de inactivación para varias enzimas, entre las cuales se encuentran la ATPasa de membrana plasmática de *Neurospora crassa*, la citocromo oxidasa, la transhidrogenasa, el complejo bc₁, la ATPasa de Ca²⁺ y la F₁ de la ATPasa de mitocondria y cloroplasto, va de 10² a 10³ M⁻¹ min⁻¹ (Kluge y Dimroth, 1993). Por otro lado, el proteolipido componente de la parte F₀ de la ATPasa F₁ F₀ es mucho más reactivo, con una constante de alrededor de 10⁵ M⁻¹ min⁻¹ en mitocondria y de 10⁴ M⁻¹ min⁻¹ en bacteria. La razón de esta diferencia en la reactividad no es aún clara. En principio se podría explicar con base en la hidrofobicidad alrededor del grupo sensible. En el caso de la subunidad β de la F₁ ATPasa, la secuencia de aminoácidos alrededor del residuo de glutámico es hidrofílica, pero en la subunidad III de la citocromo oxidasa es hidrofóbica, como en el proteolipido de la ATPasa F₁ F₀. La gran reactividad del proteolipido podría también deberse a un posible parecido del DCCD con la cadena lateral de aminoácidos cercanos al glutámico 65, residuo con el que reacciona esta carbodiimida. Kluge y Dimroth encontraron implicada a una arginina altamente conservada y con relativa movilidad, que forma un puente polar con el glutamato, el cual se pierde con la modificación. También es posible que las propiedades y características de este proteolipido le confieran tan alta reactividad.

4.2 LAS CARBODIIMIDAS REACCIONAN CON LOS GRUPOS CARBOXILOS DE LA

ATPasa. Las carbodiimidas, además de reaccionar con carboxilos, lo hacen con otros grupos químicos, y la reactividad parece depender de la accesibilidad del grupo químico y de las condiciones particulares del medio (Kaplan, 1991). En el presente trabajo, se mostró que la inhibición se debía exclusivamente a la modificación de grupos carboxilo en la proteína. Mediante el uso de un agente que modifica a las cisteínas (MMTS) se descartó la participación de éstas en la inhibición por carbodiimidas, mientras que con el uso de la hidroxilamina se descartaron a las tirosinas, ya que la ATPasa no recuperó su actividad cuando se incubó con este reactivo. Por otra parte, experimentos de simulación en los que se varían las constantes de velocidad de los caminos que sigue el aducto inestable de O-acilisourea, muestran que la concentración de este aducto es muy pequeña, debido a que se consume rápidamente por la vía del rearreglo o al reaccionar con algún nucleófilo, entre los que se incluye al agua.

4.3 EFECTO DE LOS NUCLEÓFILOS. Se ha reportado que en la ATPasa de Na⁺-K⁺ de riñón de perro, la presencia de nucleófilos evita que el EDC o el DCCD inactiven a la enzima, lo cual sugiere que la inhibición de la ATPasa no se produce por la modificación del carboxilo *per se*, sino debido a la formación de un entrecruzamiento intramolecular entre el carboxilo activado y un nucleófilo endógeno. Por tanto, se concluye que ninguno de los grupos carboxilo modificados son esenciales para la actividad y que la inhibición de la enzima podría ser consecuencia de 1) una rigidez de la proteína debido al entrecruzamiento, el cual no permite que los cambios conformacionales necesarios para su actividad se lleven a cabo, 2) la formación del

entrecruzamiento modifique a un grupo amino esencial para la actividad o 3) el entrecruzamiento bloquea la entrada del sustrato al sitio activo. Por otra parte, Amler encontró que en la ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de riñón de puerco, la inhibición por EDC no fue prevenida por el ester de etilglicina o por etilendiamina, pero sí por un nucleófilo más hidrofóbico como el ester de etiltirosina.

Los resultados con el EDC muestran que todos los nucleófilos tuvieron un efecto protector (figura 6). Asimismo, el grado de inhibición que se presenta con la ATPasa de H^+ debido al entrecruzamiento es grande, alcanzando un 75%, de acuerdo con los experimentos con etilendiamina, que es el nucleófilo que previene completamente el entrecruzamiento, en estas condiciones, el EDC todavía inhibe a la enzima, lo que indica que hay un carboxilo importante para la actividad de la ATPasa. El entrecruzamiento producido por el EDC se evidenció por medio de electroforesis en un gel de poliacrilamida al 4%, en donde las bandas de alto peso molecular que se originaron a partir de la ATPasa corresponden a un dímero, trímero, tetramero y, probablemente, pentámero.

El patrón de bandas que se originan por entrecruzamiento por el EDC es muy interesante, y sugiere que la unidad funcional de la ATPasa es probablemente el monómero, aunque no se puede descartar un equilibrio monómero-dímero debido a la presencia del trímero en el gel. Hasta el momento, aún existe controversia con respecto a la unidad funcional de las ATPasas tipo P de membrana; por ejemplo, se demostró, por medio de experimentos de inactivación por radiación y cinéticos, que la ATPasa de *Neurospora crassa* se encuentra en forma de dímero; sin embargo, por experimentos de reconstitución, se encontró que también trabaja como monómero (Bowman, 1986).

Al usar los mismos nucleófilos con el DCCD, se encontró un incremento en la constante de inhibición (figura 12). Este resultado fue muy sorprendente. Sin embargo, ya se conocía que

algunas aminos hidrofóbicas aceleraban la inhibición por carbodiimida (Pedemonte, 1990). Además, Körner y Lacombe reportaron que la inhibición del subfragmento 1 de la miosina, con una carbodiimida soluble, se incrementa en presencia del nucleófilo 3-nitro-L-éster de etiltirosina. La interacción específica del nucleófilo con la enzima es una posible explicación de éste fenómeno. Al respecto, mediante experimentos cinéticos, se encontró que los nucleófilos interactúan de manera directa con la ATPasa y probablemente ocasionan un cambio conformacional que a su vez podría:

- 1) aumentar la reactividad del carboxilo modificado,
- 2) exponer otro carboxilo esencial, o
- 3) disparar la reacción de un carboxilo activado, no esencial, con algún otro residuo esencial, por ejemplo una lisina.

Por otro lado, se obtuvo una explicación alterna por medio de la simulación en computadora, sin que se incluyera la interacción específica entre el nucleófilo y la ATPasa. El incremento en la inhibición se puede explicar, desde un punto de vista mecanístico, si se supone que la regeneración del carboxilo debido al ataque nucleofílico del agua sobre el aducto de O-acilisourea contribuye de manera significativa a disminuir la velocidad de inhibición, por lo que la adición de un nucleófilo exógeno desplaza la reacción de este aducto inestable hacia la forma estable e inhibida de la enzima (esquema 2).

4. 4 EFECTO DE LIGANDOS. El uso de ligandos fue un punto importante de estudio durante la caracterización de la modificación química, ya que, en teoría, si los ligandos ejercen una protección total, el marcado diferencial de la enzima sería la base para identificar el o los residuos que reaccionan con las carbodiimidias, y por tanto, conocer la localización del residuo. Para la ATPasa de Na⁺-K⁺ se ha reportado que la inhibición por EDC se reduce con Mg²⁺, Na⁺, K⁺, colina o tris (Pedemonte, 1990), en ese orden de protección, mientras que el ATP no tuvo efecto. Esta

protección no se debe a un incremento en la fuerza iónica, sino al pegado de los cationes en un sitio específico. También se encontró que cuando la enzima estaba fosforilada, disminuía la inhibición. Con ADP, la ATPasa sólo se protegía un 30%. Con esta misma ATPasa, Gorga y col, encontraron que la inhibición por DCCD se reducía por cationes monovalentes, con diferente eficiencia, dependiendo del pH. También se protegió con el Mg^{2+} y el ATP.

En este trabajo se utilizó un inhibidor competitivo del sustrato, el Mg-ADP y dos inhibidores no competitivos, el Mg^{2+} y el vanadato. La protección fue parcial con ambas carbodiimidias. No obstante, la protección por vanadato en la inactivación del DCCD fue buena (40 %), aunque este efecto no fue muy reproducible, probablemente debido a las diferencias que existan entre las distintas preparaciones de la ATPasa.

4.5 DEPENDENCIA DE LA INACTIVACIÓN CON RESPECTO AL pH. El pK_a para ambas carbodiimidias se obtuvo al estudiar la inactivación a diferentes valores de pH. Se sabe que la modificación de los grupos carboxilo se favorece a pH ácidos, por lo que la forma protonada es la que participa en la reacción (Koshland, 1967). Los resultados obtenidos con el EDC, en presencia de un nucleófilo, muestran que la forma que reacciona con el EDC es la protonada, ya que a valores de pH por arriba de 7.0 la enzima no se inhibe. El pK_a aparente del grupo fue de 5.8. Al comparar este valor con el pK_a de la cadena lateral de los residuos individuales del ácido aspártico $pK_a=3.9$ y de ácido glutámico de $pK_a=4.3$, en donde no existen interacciones electrostáticas con cargas vecinas, y con los valores de pK_a reportados para estos residuos en una proteína típica $pK_a=4.4-4.6$, (Cantor, 1980), se encuentra que está corrido hacia pH básico, por lo que se puede suponer que el carboxilo que reacciona con el EDC se encuentre parcialmente oculto.

En el caso del DCCD también se determinó el pK_a aparente. Sin embargo, aunque la forma protonada del carboxilo fue la más reactiva, la forma desprotonada también reaccionó con el DCCD. El pK_a del grupo fue de 6.5, lo que indica que probablemente se encuentre en un lugar oculto, hidrofóbico, ya que en éstos casos, los carboxilos tienden a presentar un corrimiento de su pK_a hacia el lado alcalino.

4.6 ESTEQUIOMETRÍA. Con base en las condiciones cinéticas establecidas, se determinó la estequiometría de la reacción de la ATPasa con el ^{14}C -DCCD en ausencia o presencia de la bencilamina. Gorga y col. reportaron en la ATPasa de $Na^+ - K^+$ que el H^3 -DCCD se unía a la subunidad α de la enzima y que la incorporación del inhibidor era independiente de la pérdida de la actividad enzimática. Por tanto, concluyeron que la inactivación de la enzima se producía por la formación de entrecruzamiento interno. Al usar también ^{14}C -DCCD se encontró, tanto en la ATPasa de $Na^+ - K^+$ como en la ATPasa de Ca^{2+} , que la marca era inestable y se perdía, por lo que no era posible realizar estudios de estequiometría (Pedemonte, 1990).

En contraste con estos reportes, la incorporación de la marca a la ATPasa, tanto en ausencia como en presencia de nucleófilo, fue muy estable, por lo que se pudo someter a electroforesis sin pérdida aparente de la marca.

Al graficar la incorporación contra la actividad residual (figura 17) se determinó, por medio de extrapolación, que en ausencia de bencilamina, la incorporación de 1 mol de DCCD por mol de ATPasa inhiben completamente a la enzima. Para el caso de la inhibición en presencia de bencilamina, se encontró que la incorporación fue de 2 moles por mol de ATPasa. Esto sugiere que la bencilamina expone otro carboxilo que está reaccionando con el DCCD.

4.7 USO DE UN ANÁLOGO FLUORESCENTE. El NCD-4 es un análogo fluorescente del DCCD. Este no presenta fluorescencia en solución acuosa, sin embargo, al reaccionar con la ATPasa fluoresce. A pesar de que se ha reportado una baja reactividad comparada con el DCCD (Pringle, 1985), ha sido muy empleado en la identificación de carboxilos modificados por DCCD en mitocondria de bovino (Pringle, 1985), en la ATPasa de Ca^{2+} (Thomas, 1984; Inesi, 1991; Merino, 1995), en el citocromo b en mitocondria de levadura (Wang, 1995). En todos ellos se ha encontrado que el carboxilo que se marca es el mismo que reacciona con el DCCD.

Se utilizó el NCD-4 con el fin de obtener las condiciones para el aislamiento y la secuenciación del péptido con la marca radiactiva. Por otro lado, es importante conocer si el NDC-4 reacciona con el mismo carboxilo que el DCCD, por lo que se realizará también la secuenciación del péptido con la marca fluorescente.

4.8 PERSPECTIVAS. Para identificar los residuos modificados con EDC, el enfoque más apropiado sería utilizar un nucleófilo radiactivo, ya que gran parte de la inhibición se debe a entrecruzamiento. El mejor nucleófilo fue la etilendiamina; sin embargo, ésta no se encuentra disponible en forma radiactiva. El empleo de otro nucleófilo radiactivo tiene los inconvenientes de que sólo eliminamos parte del entrecruzamiento, y de que la concentración de nucleófilo en el experimento es muy grande. Una posibilidad sería tratar de identificar estos residuos mediante uso de mutantes.

Finalmente, para el caso del DCCD, se empleó un análogo fluorescente, el NCD-4, para estandarizar las condiciones del aislamiento y secuenciación del péptido marcado con el ^{14}C -DCCD.

También se pretende secuenciar el péptido de 20 kDa marcado con el NCD-4, para averiguar si reacciona con el mismo carboxilo que el DCCD.

El uso de agentes químicos para elucidar las relaciones estructura-función en la bomba de protones ha contribuido, en los últimos años, con importantes y numerosos datos. Sin embargo, las ATPasas activadas por iones son sistemas extremadamente complejos, tanto desde un punto de vista funcional como estructural, por lo que las conclusiones deben ser tomadas con precaución, dadas las limitaciones que la técnica presenta.

5. Conclusiones

□ La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de *Kluyveromyces lactis* es sensible a inhibidores que reaccionan con grupos carboxilos.

□ El EDC, carbodiimida soluble, inhibe a la ATPasa a concentraciones milimolares, de manera irreversible y con una constante de velocidad de segundo orden de $9.9 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

□ El DCCD, carbodiimida hidrofóbica, inhibe a la ATPasa a concentraciones micromolares, de manera irreversible y con una constante de velocidad de segundo orden de $420 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

□ Los nucleófilos disminuyen la constante de inhibición por EDC, debido a que parte de ésta es resultado del entrecruzamiento intermolecular.

□ Los nucleófilos aceleran la inhibición por DCCD y experimentos cinéticos confirman que existe una interacción directa de los nucleófilos con la ATPasa, lo cual

se asocia a un cambio conformacional de la proteína.

□ El Mg-ADP, Mg^{2+} o el vanadato protegieron parcialmente a la ATPasa, por lo que ninguno de los carboxilos reactivos se encuentran en los sitios de reconocimiento de estos ligandos.

□ El valor del pK_a del grupo modificado es aproximado, debido a los problemas de desnaturalización de la enzima. En ambos casos hubo un corrimiento del pK_a hacia valores de pH básicos, lo cual sugiere que estos grupos se encuentran en un ambiente poco expuesto al solvente.

□ La estequiometría con ^{14}C -DCCD fue, en ausencia de bencilamina, de 1 mol de DCCD por mol de ATPasa, y en presencia de bencilamina de 2 moles de DCCD por mol de ATPasa.

□ El análogo fluorescente del DCCD, el NCD-4, permitió el establecimiento de la metodología para el aislamiento del péptido con marca fluorescente o radiactiva y su posterior secuenciación.

Referencias

Addison, R. y Serrano, R. 1986. Interactions of *Neurospora crassa* plasma membrane H⁺-ATPase with N-(ethoxycarbonyl)-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline. *Biochemistry*. **25**: 4071-4076.

Anler, E. y col. 1988. The role of carboxyl groups of Na⁺/K⁺-ATPase in the interaction with divalent cations. *Biochim. Biophys. Acta*. **945**: 367-370.

Amory, A. y col. 1982. Exchange of Oxygen between Phosphate and Water Catalyzed by the Plasma Membrane ATPase from the Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **257**: 12509-12516.

Argüello, J. M. y Kaplan, J. H. 1994. Glutamate 779, an Intramembrane Carboxyl, Is Essential for Monovalent Cation Binding by the Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **269**: 6892-6899.

Ball, E. H. 1986. Quantitation of Proteins by Elution of Coomassie Brilliant Blue R from Stained Bands after Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **155**: 23-27.

Bensadoun, A. y Weinstein, D. 1976. Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. *Anal. Biochem.* **70**: 241-250.

Bowman, B. J. y Bowman, E. J. 1986. H⁺-ATPases from Mitochondria, Plasma Membranes, and Vacuoles of Fungal Cells. *J. Membrane. Biol.* **94**: 83-97.

Carraway, K. L. y Korhland, D. E. 1972. Carbodiimide Modification of Proteins. *Methods Enzymol.* **25**: 616-623.

Cid, A., Vara, F. y Serrano, R. 1987. Inhibition of the Proton Pumping ATPases of Yeast and Oat Root Plasma Membranes by Dicyclohexylcarbodiimide. *Arch. Biochem. Biophys.* **252**: 496-500.

Chadwick, C. C. y Thomas, E. W. 1984. Ligand Binding Properties of the Sarcoplasmic Reticulum (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase Labelled with N-Cyclohexyl-N'-(4-Dimethylamino- α -Naphthyl) Carbodiimide. *Biochim. Biophys. Acta.* **762**: 291-296.

De Pinto, V. y col. 1993. Location of the Dicyclohexylcarbodiimide-reactive Glutamate Residue in the Bovine Heart Mitochondrial Pore. *J. Biol. Chem.* **268**: 12977-12982.

Fagan, M. J. y Saier, M. H. 1994. P-type ATPases of Eukaryotes and Bacteria: Sequence Analyses and Construction of Phylogenetic Trees. *J. Mol. Evol.* **38**: 57-99.

Fiske, C. H. y Subbarow, Y. 1925. The Colorimetric Determination of Phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**: 375-400.

Georgoussi, Z. y Sotiroidis, T. G. 1985. Inhibición of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase by 2-mercaptoethanol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**: 1196-1200.

Goffeau, A. y col. 1992. An Alignment of 17 Deduced Protein Sequences from Plant, Fungi, and Ciliate H⁺-ATPase Genes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**: 309-317.

Goldshleger, R. y col. 1992. Chemical modification of Glu-953 of the α chain of Na⁺, K⁺-ATPase associated with inactivation of cation occlusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 6911-6915.

Green, N. M. 1992. Evolutionary Relationships within the Family of P-Type Cation Pumps. *Annals of the New York Academy of Sciences.* **671**: 104-112.

Hassinen, I. E. y Vuokila, P. T. 1993. Reaction of dicyclohexylcarbodiimide with mitochondrial proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **1144**: 107-124.

Hoare, D. G. y Koshland, D. E. 1967. A Method for the Quantitative Modification and Estimation of Carboxylic Acid Groups in Proteins. *J. Biol. Chem.* **242**: 2447-2453.

Imoto, T. y Yamada, H. 1989. Chemical modification. *Protein function a practical approach.* T.E. Creighton IRL Press, Oxford, England. 247-277.

Karlish, S. J. y col. 1992. Identification of the Cation binding Domain of Na/K-ATPase. *Acta Physiol. Scand.* **146**: 69-76.

Kereszteesy, Z. y col. 1994. Investigation of the Active Site of the Cyanogenic β -D-Glucosidase (Linamarase) from *Manihot esculenta* Crantz (Cassava). I. Evidence for an Essential Carboxylate and a Reactive Histidine Residue in a Single Catalytic Center. *Arch. Biochim. Biophys.* **314**: 142-152.

Kluge, C. y Dimroth, P. 1993. Specific Protection by Na⁺ or Li⁺ of the F₁F₀-ATPase of *Propionigenium modestum* from the Reaction with Dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* **268**: 14557-14560.

Kluge, C. y Dimroth, P. 1993. Kinetics of Inactivation of the F₁F₀ ATPase of *Propionigenium modestum* by Dicyclohexylcarbodiimide in Relationship to H⁺ and Na⁺ Concentration: Probing the Binding Site for the Coupling Ions. *Biochemistry.* **32**: 10378-10386.

Körner, M. y col. 1982. Cardiac Myosin Subfragment I Modification by carbodiimide in the presence of a nucleophile. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **105**: 1197-1207.

- Lacombe, G. y col. 1981. Modification of Myosin Subfragment 1 by Carbodiimide in the Presence of a Nucleophile. Effect on Adenosinetriphosphatase Activities. *Biochemistry*. 20: 3648-3653.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mandala, S. M. y Slayman, C. W. 1988. Identification of Tryptic Cleavage Sites for Two Conformational States of the *Neurospora* Plasma Membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 263: 15122-15128.
- Maxime, A. y col. 1990. Stability of Water-Soluble Carbodiimides in Aqueous Solution. *Anal. Biochem.* 184: 244-248.
- Merino, J. y Gutiérrez-Meño, C. 1995. Mg²⁺-ADP Protects Against Inactivation of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase by N-cyclohexyl-N'-(4-dimethylamino- α -naphthyl)carbodiimide. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 207: 293-299.
- Miranda, M y col. 1995. Molecular Cloning of the Plasma Membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: a Single Nucleotide Substitution in the Gene Confers Ethidium Bromide Resistance and Deficiency in K⁺ Uptake. *J. Bacteriol.* 177: 2360-2367.
- Na, S. y col. 1993. Characterization of Yeast Plasma Membrane H⁺-ATPase Mutant pma1-A135V and Its Revertants. *J. Biol. Chem.* 268: 11792-11797.
- Nakamoto, R. K. y Slayman, C. W. 1989. Molecular Properties of the Fungal Plasma-Membrane [H⁺]-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 21: 621-632.
- Nalecz, M. J., Casey, R. P. y Azzi, A. 1986. Use of N, N',-Dicyclohexylcarbodiimide to Study Membrane-Bound Enzymes. *Methods. Enzimol.* 125: 86-108.
- Pedemonte, C. H. y Kaplan, J. H. 1990. Chemical modification as an approach to elucidation of sodium pump structure-function relations. *Am. J. Physiol.* 258: C1-C23.
- Perlin, D.S. 1992. Genetic probing of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. *Acta Physiol.Scand.* 146: 183-192.
- Perlin, D. S. y col. 1994. Modeling Conformationally Sensitive Region of Membrane Sector of the Fungal Plasma Membrane Proton Pump. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26: 101-115.
- Perfetti, R. B., Anderson, C. D. y Hall, P. L. 1976. The Chemical Modification of Papain with 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. *Biochemistry*. 15: 1735-1743.

- Peterson, G. L. 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 100: 201-220.
- Pho, D. B. y col. 1977. Evidence for an Essential Glutamyl Residue in Yeast Hexokinase. *Biochemistry.* 16: 4533-4537.
- Portillo, F. y Serrano, R. 1988. Dissection of functional domains of the yeast proton-pumping ATPase by directed mutagenesis. *EMBO. J.* 7: 1793-1798.
- Pringle, M. J. y Taber, M. 1985. Fluorescent Analogues of N-N'-Dicyclohexylcarbodiimide as Structural Probes of the Bovine Mitochondrial Proton Channel. *Biochemistry.* 24: 7366-7371.
- Rao, R. y col. 1992. Structure and Function of the Yeast Plasma-Membrane H⁺-ATPase. *Annals New York Academy of Sciences.* 671: 195-203.
- Rest, M. E. y col. 1995. The Plasma Membranes of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, Function, and Biogenesis. *Microbiol. Rev.* 59: 304-322.
- Romero, I. y Celis, H. 1992. Evidence of an Essential Carboxyl Residue in Membrane-Bound Pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24: 617-624.
- Rosen, B. P. y col. 1992. Evolution of an Ion-Translocating ATPase. *Annals New York Academy of Sciences.* 671: 258-272.
- Saier, Jr. H. y Fagan, M. J. 1994. P-type ATPases of Eukaryotes and Bacteria: Sequence Analyses and Construction of Phylogenetic Trees. *J. Mol. Evol.* 38: 57-99.
- Schägger, H., y Von Jagaw, G. 1987. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
- Serrano, R. 1988. Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta.* 947: 1-28.
- Serrano, R. 1989. Structure and Function of Plasma Membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 61-94.
- Shani-Sekler, M. y col. 1988. Inactivation of Rb⁺ and Na⁺ Occlusion on (Na⁺,K⁺)-ATPase by Modification of Carboxyl Groups. *J. Biol. Chem.* 263: 19331-19341.
- Solioz, M. 1984. Dicyclohexylcarbodiimide as a probe for proton translocating enzymes. *TIBS.* 309-312.
- Stekhoven, F. M. A. H. y col. 1989. Ethylenediamine as active site probe for Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 987: 103-114.

Sumbilla, C. y col. 1991. Structural Perturbation of the Transmembrane Region Interferes with Calcium Binding by the Ca²⁺ Transport ATPase. *J. Biol. Chem.* 266: 12682-12689.

Sussman, M. R. y Slayman, S. W. 1983. Modification of the *Neurospora crassa* plasma membrane [H⁺]-ATPase with N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* 258: 1839-1843.

Suzuki, H. y col. 1994. Effects of Divalent Cations Bound to the Catalytic Site on ATP-Induced Conformational Changes in the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase: Stopped Flow Analysis of the Fluorescence of N-Acetyl-N'-(5-sulfo-1-naphthyl)ethylendiamine Attached to Cysteine-674. *Biochemistry*. 33: 8240-8246.

Van Der Rest, M. y col. 1995. The Plasma Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: Structure, Function, and Biogenesis. *Microbiol. Rev.* 59: 304-322.

Wang, Y y col. 1995. Topographical Organization of Cytochrome b in the Yeast Mitochondrial Membrane Determined by Fluorescence Studies with N-Cyclohexyl-N'-[4-(dimethylamino)-naphthyl]carbodiimide. *Biochemistry*. 34: 7476-7482.

Weber, K. y Osborn, M. 1969. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Doceyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244: 4406-4412.

Yoshida, T y col. 1994. Chemical modification of *Penicillium* 1,2- α -D-manosidase by water-soluble carbodi-imide: identification of a catalytically important aspartic acid residue. *Biochem. J.* 303: 97-103.