



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Inhibición de la ATPasa de H^+ de la membrana
plasmática de *Kluyveromyces lactis* por una carbodiimida
fluorescente (NCD-4)”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MACARIO GENARO MATUS ORTEGA



ASESOR: DR. JUAN PABLO PARDO VAZQUEZ



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.

ESTÁ TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Matus Ortega

Macario Genaro

FECHA: 4 de agosto de 2004

FIRMA: [Firma]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Inhibición de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de Kluyveromyces lactis por una carbodiimida fluorescente (NCD-4)"

realizado por Macario Genaro Matus Ortega

con número de cuenta 09610153-1 , quien cubrió los créditos de la carrera de:
BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez

Juan Pablo Pardo V

Propietario Dr. Federico Martínez Montes

[Firma]

Propietario Dr. José Edgardo Escamilla Marvan

[Firma]

Suplente Dr. Juan Luis Rendón Gómez

[Firma]

Suplente Dr. Oscar Flores Herrera

[Firma]

FACULTAD DE CIENCIAS



Consejo Departamental de BIOLOGIA

[Firma]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios.

Gracias infinitas a mi familia:

Gracias, a mi madre: Maura Ortega Gómez.

Gracias por la vida, por el amor, por la ternura, por la comprensión y por la fuerza que me has dado. Gracias por inculcarme buenos valores, por darme el ejemplo a seguir, por enseñarme a amar la vida y a creer en Dios... mil gracias por el tiempo y la paciencia que has tenido conmigo.

Gracias a mi padre: Macario Matus Gutierrez.

Gracias por la vida, por las palabras, por los consejos, y por la paciencia que has tenido conmigo. Gracias por el amor y disciplina que me has inculcado por el arte, por la ciencia y por el trabajo. Gracias también por respetar mis decisiones y por permitirme empezar a trazar mi destino.

Gracias a mi hermana: Maura Epifanía Matus Ortega.

Gracias por compartir conmigo tu alegría, tus sueños y tu gusto por la ciencia.

Gracias por su apoyo, por su confianza, por su paciencia y por su amor.

Soy ustedes. Siempre han estado y seguirán estando conmigo, en mi mente, en mi corazón y en mi alma.

Gracias a Dios, gracias a la vida, gracias al amor, gracias a la fortuna y también a la infortuna, que me han moldeado y que me han permitido construir mi destino y transformar mi entorno.

Gracias a la **U. N. A. M.**, a la Facultad de Ciencias y al Colegio de Ciencias y Humanidades Naucalpan, por abrirme las puertas del conocimiento.

Gracias a todos los maestros que me han formado a lo largo de mi vida:

Gracias a los Doctores:

Juan Pablo Pardo Vázquez, Juan Luis Rendón Gómez, Federico Martínez Montes y Patricia del Arenal Mena, por abrir el taller “el metabolismo intermedio, un enfoque comparativo”, por permitirme estar en sus laboratorios y por compartir su conocimiento conmigo.

Gracias en especial a Juan Pablo Pardo Vázquez, por aceptarme en su laboratorio para realizar el Servicio Social y la Tesis de licenciatura.

Gracias también a:

Alfonso Apodaca Conde,

Alfonso Paulín Zamora,

Alfonso Vilchis Peluyera,

Carmen Vivas Gómez,

Enrique Ortiz Bermúdez,

Enrique Ortiz Moreno,

José Arturo Álvarez Paredes,

José Luis Busto Sánchez,

Maria Teresa Mendoza,

Marisela Álvarez Pérez,

Norma Eugenia García Calderón,

Oscar Juárez Mendoza,

Oscar Flores Herrera.

Gracias también a todos aquellos, que por desgracia se me escapan a la memoria en estos momentos.

DEDICATORIA

A mi madre Maura Ortega Gómez, a mi padre Macario Matus Gutierrez, y a mi hermana Maura Epifanía Matus Ortega.

A mis tíos: Catalina, Hermila (†) y Sebastián Ortega Gómez.

A mis primos: Héctor, Heliodoro, Maria Elena, Martín, Sebastián y Tomasa Aquino Ortega.

A todos mis amigos de la infancia. En especial a Desiré, Hector Eduardo e Irving Barragán Centeno.

A todos los compañeros del Cubículo 21 de la Facultad de Ciencias. En especial a Guianeya Domínguez, a Lina De la Cruz, a Irma Marín, a Luis Eduardo Granados, a Oscar Pérez, a Héctor Cuevas, a Héctor Cruz, a Ernesto Caballero y a Víctor García.

A todas mis amigas y compañeras de la vida. En especial a Sheila, a Silvia, a Ana Maria, a Teresa, a Claudia, a Azucena, a Adriana, a Isabel, a Lizet, a Carol, a Guadalupe, a Olga Nohemí, a Cinthya, a Yazmín y a Nadia.

A todo el Pueblo de Juchitán, Oaxaca.

Al hermoso istmo de Tehuantepec, que me cobijó en la infancia y que me alimentó con su lucha, con sus costumbres y con sus riquezas culturales.

Al pueblo de México, que mantiene en pie a esta gran universidad, y que nos brinda a miles de jóvenes la oportunidad de formar parte de ésta, que es nuestra máxima casa de estudios.

**“Inhibición de la
ATPasa de H⁺ de la
membrana plasmática
de *Kluyveromyces
lactis* por una
carbodiimida
fluorescente (NCD-4)”**

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ABREVIATURAS.....	6
RESUMEN.....	7
I INTRODUCCIÓN.....	9
1 La membrana plasmática: El medio de la H⁺-ATPasa.....	9
1.1 La estructura y composición de las membranas.....	10
1.2 El transporte a través de la bicapa.....	13
1.3 El transporte mediado por proteínas.....	14
2 Las ATPasas.....	17
2.1 Las ATPasas tipo P.....	18
2.2 La H ⁺ -ATPasa.....	20
2.3 La estructura primaria de la H ⁺ -ATPasa.....	22
2.4 La topología de la H ⁺ -ATPasa.....	23
2.5 Los dominios funcionales de la H ⁺ -ATPasa.....	25
2.6 El mecanismo enzimático de la H ⁺ -ATPasa.....	28
2.7 La regulación de la H ⁺ -ATPasa.....	29
3 Las carbodiimidias.....	30
3.1 Los inhibidores tipo carbodiimida.....	30
3.2 La carbodiimida fluorescente NCD-4.....	32
4 <i>Kluyveromyces lactis</i>, el organismo de estudio.....	33
4.1 La ubicación taxonómica del género <i>Kluyveromyces</i>	33
4.2 El ciclo de vida de <i>K. lactis</i>	35
4.3 La importancia de las levaduras en la investigación biológica.....	36
II OBJETIVOS.....	37
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
1 La estrategia metodológica.....	38

2	La reactivación de las levaduras de <i>K. lactis</i>	39
2.1	La preparación de los medios líquidos de inoculación y cultivo.....	39
2.2	La reactivación de la cepa e inoculación del medio YPD.....	39
2.3	El cultivo de células.....	39
2.4	La cosecha de las levaduras.....	40
3	La obtención de la membrana plasmática con perlas de vidrio	40
4	La purificación de la H⁺-ATPasa	41
4.1	La purificación de la membrana plasmática con un gradiente zonal de sacarosa.....	41
4.2	La purificación de la ATPasa con un gradiente zonal de glicerol.....	42
4.3	La determinación de proteína.....	44
5	La determinación de actividad de la H⁺-ATPasa	45
5.1	El ensayo de actividad de la ATPasa.....	45
5.2	El método colorimétrico para la determinación de Pi.....	46
6	La estabilidad de la ATPasa a diferentes temperaturas	47
7	La estabilidad de la ATPasa a diferentes pHs	47
8	La inhibición de la ATPasa con NCD-4	47
8.1	La preparación del NCD-4.....	47
8.2	La inactivación de la ATPasa por el NCD-4.....	48
8.3	La inactivación de la ATPasa por el NCD-4 vs el DCCD.....	48
9	La determinación del efecto de cationes mono y divalentes sobre la inactivación de la ATPasa por el NCD-4	48
9.1	La inactivación de la ATPasa en presencia de ligandos fisiológicos.....	48
9.2	El cálculo de las concentraciones de los cationes en las soluciones.....	49
10	La electroforesis en condiciones desnaturizantes	49
10.1	El marcaje específico de la ATPasa por el NCD-4.....	49
10.2	El marcaje de la ATPasa por el NCD-4 vs el DCCD.....	50
IV	RESULTADOS	51
1	La purificación de la membrana plasmática de <i>K. lactis</i>	51
1.1	La purificación de la membrana plasmática en un gradiente de sacarosa.....	51
2	La purificación de la H⁺-ATPasa	52
2.1	La purificación de la H ⁺ -ATPasa con gradientes de sacaros y glicerol.....	52

3	La electroforesis de las preparaciones.....	54
4	La estabilidad de la H⁺-ATPasa.....	56
4.1	El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima.....	57
4.2	El efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima.....	58
4.3	El efecto del etanol y el DMSO en la estabilidad de la H ⁺ -ATPasa.....	60
5	El efecto del NCD-4 sobre la actividad de la H⁺-ATPasa.....	61
6	La determinación del carácter irreversible de la modificación química.....	65
7	El efecto de los ligandos fisiológicos sobre la inhibición de la H⁺-ATPasa.....	67
8	El efecto de los cationes monovalentes sobre la inhibición de la H⁺-ATPasa por NCD-4.....	68
9	El efecto del DCCD sobre la ATPasa modificada previamente con NCD-4.....	69
V	DISCUSIÓN.....	72
1	La membrana plasmática de <i>K. lactis</i>.....	72
2	La purificación de la H⁺-ATPasa.....	73
3	La estabilidad de la H⁺-ATPasa en las condiciones experimentales.....	75
4	El efecto de los solventes (etanol y DMSO) sobre la estabilidad de la H⁺-ATPasa.....	75
5	El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la H⁺-ATPasa.....	75
6	El efecto del pH sobre la estabilidad de la H⁺-ATPasa.....	76
7	El efecto del NCD-4 sobre la actividad de la H⁺-ATPasa.....	76
8	El NCD-4 produce una inhibición parcial que involucra la formación de un enlace covalente.....	77
9	El NCD-4 produce una inhibición de la H⁺-ATPasa distinta al DCCD.....	78
10	Efecto de los cationes sobre la inhibición de la H⁺-ATPasa por el NCD-4.....	80
10.1	El efecto del Mg ²⁺ y el MgADP sobre la inhibición de la H ⁺ ATPasa por NCD-4...80	
10.2	El efecto del Na ⁺ y el K ⁺ sobre la inhibición de la H ⁺ -ATPasa por el NCD-4.....81	
11	Los probables sitios de unión del NCD-4.....	81
12	El NCD-4 y la ATPasa de Calcio.....	82
13	Perspectivas.....	83
VI	CONCLUSIONES.....	84
	BIBLIOGRAFÍA.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Número y título de la figura	Página
1 El modelo de mosaico fluido de G. Nicholson y J. Singer.....	11
2 Los principales lípidos de la membrana plasmática eucariota.....	12
3 La termodinámica del transporte a través de las membranas y tipos de transporte..	13
4 Los modelos de los tipos de ATPasas.....	17
5 Los dominios comunes a las ATPasas tipo P.....	18
6 El sistema de transporte en la membrana de <i>K. lactis</i>	21
7 La secuencia de aminoácidos de la H ⁺ -ATPasa de <i>N. crassa</i>	22
8 El modelo topológico de la H ⁺ -ATPasa de <i>N. crassa</i>	24
9 Los dominios funcionales y las hélices transmembranales de la H ⁺ -ATPasa de <i>N. crassa</i>	25
10 El modelo sobrepuesto de la H ⁺ -ATPasa de <i>N. crassa</i> y la ATPasa de Ca ²⁺	27
11 El mecanismo catalítico de la H ⁺ -ATPasa de <i>N. crassa</i>	30
12 El esquema general de la reacción de las carbodiimidias con proteínas.....	31
13 El mecanismo de reacción del NCD-4 con un grupo carboxilo.....	33
14 La clasificación del reino Fungi propuesto por Herrera y Ulloa.....	34
15 El ciclo de vida de <i>S. cerevisiae</i>	34
16 El diagrama de flujo para el desarrollo de la sección de los métodos.....	38
17 El diagrama de flujo para la purificación de la H ⁺ -ATPasa con un gradiente de glicerol.....	43
18 El ensayo general para determinar la estabilidad y la actividad de la H ⁺ -ATPasa....	46
19 El perfil de la actividad de la H ⁺ -ATPasa en el gradiente de glicerol.....	52
20 El patrón electroforético de la H ⁺ -ATPasa en condiciones desnaturalizantes.....	55
21 El ensayo de actividad y modificación química de la H ⁺ -ATPasa con el NCD-4....	56
22 El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la H ⁺ -ATPasa.....	57
23 El efecto del pH sobre la estabilidad de la H ⁺ -ATPasa.....	58
24 Los efectos del DMSO y del etanol sobre la estabilidad de la H ⁺ -ATPasa.....	60
25 El efecto de diferentes concentraciones del NCD-4 sobre la H ⁺ -ATPasa.....	62

26	La comprobación del carácter parcial de la inhibición producida por el NCD-4.....	63
27	El curso temporal para la inactivación de la H ⁺ -ATPasa a diferentes concentraciones de NCD-4 y gráfica de la constante de inactivación de pseudoprimer orden (k) vs la concentración de NCD-4.....	64
28	La cinética de estado estacionario de la H ⁺ -ATPasa.....	65
29	La modificación química irreversible entre el NCD-4 y la H ⁺ -ATPasa.....	66
30	La electroforésis desnaturizante de la H ⁺ -ATPasa modificada por el NCD-4.....	67
31	El efecto de diferentes concentraciones de Mg ²⁺ sobre la inhibición de la H ⁺ -ATPasa por NCD-4.....	68
32	El efecto del K ⁺ sobre la inhibición de la H ⁺ -ATPasa por NCD-4.....	69
33	La modificación de la H ⁺ -ATPasa por el NCD-4 y el DCCD.....	70
34	La electroforesis desnaturizante de la membrana plasmática purificada con sacarosa modificada con NCD-4 vs DCCD.....	71
35	La localización de los grupos carboxilo inmersos en los segmentos transmembranales de la H ⁺ -ATPasa de <i>K. lactis</i>	82

ABREVIATURAS

ADP	difosfato de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
ATPasa	Adenosin Trifosfatasa
BSA	albúmina de suero bovino
DCCD	N, N'-diciclohexilcarbodiimida
DMSO	dimetil sulfoxido
DNA	ácido desoxiribonucleico
DOC	desoxicolato de sodio
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	etilenglicolbis-β-aminoetileter
H ⁺ -ATPasa	Adenosin trifosfatasa de protones
HEPES	ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanolsulfónico
Kda	kilo daltones
MES	ácido 2(n-morfolino) enalsufónico
NAD ⁺	nicotinamida adenindinucleótido (oxidado)
NADH	nicotinamida adenindinucleótido (reducido)
NCD-4	4-ciclohexil-N'-(4-dimetilamino)naftilcarbodiimida
NEM	N-etilmaleimida
PK	piruvato cinasa
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
SDS	dodecil sulfato de sodio
TCA	ácido tricloroacético
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano

RESUMEN

En la membrana plasmática de hongos y plantas existen ATPasas tipo P que bombean protones (H^+) hacia el exterior celular (Goffeau, 1981; Serrano, 1981; Pedersen y Carafoli, 1987). Estas proteínas pueden representar hasta el 15% de las proteínas membranales, y llegan a encontrarse hasta 10^6 H^+ -ATPasas por célula. Estas bombas electrogénicas consumen cerca del 20% o más del total del ATP celular y transducen en un gradiente de potencial electroquímico la energía química proveniente este nucleótido (Goffeau, 1981; Serrano, 1988; Portillo, 1989 y 2000; Mason, 1998). Este gradiente electroquímico de protones se utiliza en el transporte de iones, metabolitos y nutrientes al interior de las células, así como en la regulación del pH intracelular; también ha sido correlacionado con las tasas de crecimiento celular, la tolerancia a los metales pesados, así como en la respuesta al estrés térmico y salino (Goffeau, 1981; Serrano, 1988; Piper, 1993; Weissman, 1999; Moskvina, 1999). Aunque se conoce mucho sobre el funcionamiento y la estructura de las ATPasas de la membrana plasmática de hongos y de plantas, aún quedan varias interrogantes por contestarse, la mayoría de ellas relacionada con la falta de información sobre la estructura tridimensional de las ATPasas: se desconoce el mecanismo del transporte de los iones a través de las membranas, de la hidrólisis del ATP y de la transducción de energía para la generación del gradiente electroquímico de protones (Portillo y Serrano, 1989; Miranda y Peña, 1993; Møller, 1996; Pardo, 1999; Morsome, 2000). Por estas razones, con el fin de obtener mayor información acerca de los residuos involucrados en la unión de los ligandos fisiológicos y de los residuos esenciales para la actividad de la enzima, se realizaron modificaciones químicas de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática del hongo hemiascomiceto *Kluyveromyces lactis* con el inhibidor fluorescente NCD-4.

Los resultados de este trabajo indican que la modificación química de la H^+ -ATPasa por esta carbodiimida está mediada por interacciones covalentes, es irreversible, depende del tiempo y de la concentración del NCD-4, se potencia con los ligandos fisiológicos Mg^{2+} y MgADP y se disminuye con los cationes monovalentes Na^+ y K^+ . Una vez modificada la ATPasa con el NCD-4, ésta se inhibe parcialmente y la proteína retiene entre un 60-70% de

su actividad, lo cual contrasta con la inactivación total que produce el DCCD. Así mismo, también se encontró que ambas carbodiimidas reaccionan con grupos carboxilo distintos, por lo que el efecto de los dos inhibidores es aditivo, y la interacción de cualquiera de estos inhibidores con la enzima no afecta la unión del otro. La cinética de estado estacionario para la proteína modificada y sin modificar por el NCD-4 muestra cambios en las constantes cinéticas de la enzima, viéndose afectada la V_{max} principalmente. En conjunto estos datos sugieren la participación de por lo menos un grupo carboxilo (distinto al glutámico 129) inmerso en la membrana plasmática en la hidrólisis del ATP.

I. INTRODUCCIÓN

La membrana plasmática de los hongos y las plantas posee una ATPasa que acopla la hidrólisis del ATP con la translocación de protones (H^+) a través de la bicapa lipídica. Como resultado de su actividad se genera un gradiente electroquímico de protones que se utiliza en el transporte de iones, metabolitos y nutrientes al interior de las células y en la regulación del pH citosólico. El mecanismo de la bomba de protones se ha estudiado con técnicas electrofisiológicas, bioquímicas y de DNA recombinante, pero las estructuras y los mecanismos catalíticos de estas proteínas transportadoras de protones están lejos de ser bien conocidas.

En este trabajo se analiza la inhibición de la H^+ -ATPasa con una carbodiimida llamada NCD-4 (abreviatura de N-ciclohexil-N-(4 dimetil amino-1-naftil) carbodiimida), que se une de manera covalente a los grupos carboxilo de la proteína en condiciones de pH cercanas a la neutralidad, y que permite identificar a la enzima inhibida con técnicas de fluorescencia. Se ha dividido la Introducción en 4 partes. En la primera se describe a las membranas biológicas -que son el medio natural donde se localiza la H^+ -ATPasa-, debido a su importancia estructural y funcional para la vida celular. En la segunda se revisa la información acerca de la ATPasa de protones (H^+) en diferentes hongos, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa*. En la tercera se describe el mecanismo de reacción propuesto para el inhibidor NCD-4. En la cuarta se hace referencia al organismo utilizado, *Kluyveromyces lactis*. Finalmente se enumeran los objetivos del trabajo.

1 La membrana plasmática: el medio de la H^+ -ATPasa

La célula es una estructura dinámica con características muy interesantes. Es un sistema bioquímico autónomo que se auto propaga, crece, sintetiza macromoléculas complejas y transporta sustancias de manera selectiva hacia dentro y fuera de los compartimientos celulares. Todas estas actividades requieren energía, por lo que cada célula debe obtenerla a partir de sus alrededores y utilizarla para el mantenimiento de sus vías metabólicas (Mathews, 2002).

El conjunto de las reacciones químicas que posibilitan la vida tiene lugar en el interior de las células, las cuales están separadas de sus alrededores por la membrana plasmática. Al actuar como barrera física, la membrana proporciona integridad estructural a la célula, dándole su aspecto y forma, y envolviendo los componentes celulares. Asimismo, la estructura de la membrana es responsable de la organización y la separación en compartimentos de las actividades bioquímicas que ocurren en las células eucariontes, pues forman los límites de los organelos (Boyer, 1999).

Por otra parte, la membrana plasmática constituye una barrera de permeabilidad altamente selectiva, que contiene sistemas de transporte, como son los canales iónicos, las bombas y los acarreadores altamente específicos. Estos sistemas son de gran relevancia, pues regulan la composición del medio interno. Las membranas controlan también el flujo de la información entre las células y su medio, ya que contienen receptores específicos para los estímulos externos que están asociados a las cascadas de la transducción de las señales. Además, la membrana puede participar en la generación de señales químicas y eléctricas (Stryer, 1988).

Cualquier alteración en la membrana celular tiene repercusiones en la actividad de las enzimas que la integran. Asimismo, diversos procesos biológicos, como el desarrollo y el envejecimiento, están acompañados por cambios en la estructura de la membrana y en su composición (Ahlers, 1981).

1.1 La estructura y composición de las membranas

Las membranas biológicas son estructuras laminares asimétricas cuyo grosor puede variar entre 60 y 100 Å, que forman espacios cerrados entre compartimentos de distinta composición. Están constituidas principalmente de fosfolípidos y proteínas. Los fosfolípidos se encuentran alineados en una doble capa y proveen el soporte estructural de las membranas. Una característica importante de los fosfolípidos es que sus propiedades anfipáticas favorecen su ensamblaje en el medio acuoso, lo que resulta en la formación de una bicapa estable que se mantiene unida mediante interacciones hidrofóbicas.

Las proteínas que integran la membrana también se mantienen juntas por interacciones no covalentes, de carácter cooperativo (Stein, 1986). La relación de pesos proteína : lípido depende de la fuente, tipo celular y organelo del cual provenga la membrana, y va de 1: 4 hasta 4:1.

El modelo más aceptado de la estructura y la función de las membranas es el modelo del mosaico fluido, planteado por Jonathan Singer y Garth Nicholson en 1972. Este modelo se muestra en la figura 1, y consiste de una bicapa lipídica con proteínas incrustadas, algunas en la superficie (proteínas periféricas) y otras atravesando la bicapa (proteínas integrales). Singer y Nicholson propusieron que las proteínas se mueven con cierta libertad dentro y sobre la bicapa, creando un patrón de mosaico fluido bidimensional, donde los componentes tienen libertad de rotar y difundir lateralmente, pero no transversalmente.

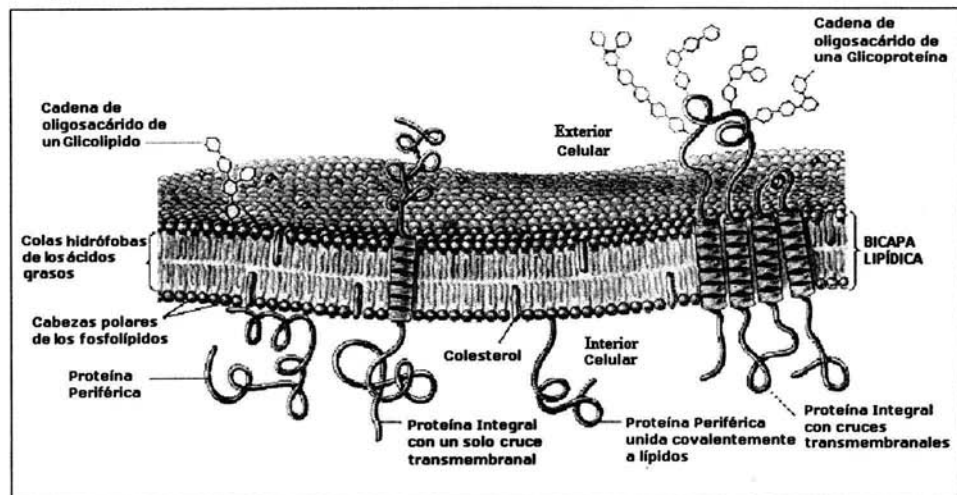


Figura 1. El modelo de mosaico fluido planteado por Garth Nicholson y Jonathan Singer. Modificado de Nelson & Cox (2000).

Los tres tipos principales de lípidos membranales son los fosfolípidos, los glicolípidos y el colesterol. Los fosfolípidos son los más abundantes en las membranas; al ser derivados del glicerol se les incluye dentro de los fosfoglicéridos y la molécula fundamental es el ácido fosfatídico (figura 2). Se caracterizan por tener regiones sumamente polares, zwitteriónicas o con carga neta, además de regiones no polares.

Los glicolípidos contienen azúcares y son también moléculas anfipáticas comunes en las bicapas, estos lípidos tienen a la esfingosina como la molécula primordial en lugar del glicerol. El contenido de carbohidratos en la membrana plasmática es normalmente del 5% o menos y está representado por glicolípidos y glicoproteínas. Los residuos de carbohidratos desempeñan funciones importantes como sitios de reconocimiento celular.

El colesterol es un derivado esteroide que modula la rigidez a las bicapas. Es abundante en la membrana plasmática de los eucariontes y común en los complejos membranales que originan a los organelos, pero es escaso en los procariontes (Stryer, 1995).

Las membranas poseen igualmente una variedad extensa de lípidos que se encuentran en pequeñas cantidades y que aún falta por determinar su importancia estructural y su función específica. Todos ellos tienen en común con los lípidos membranales que son entidades anfipáticas, es decir, contienen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica.

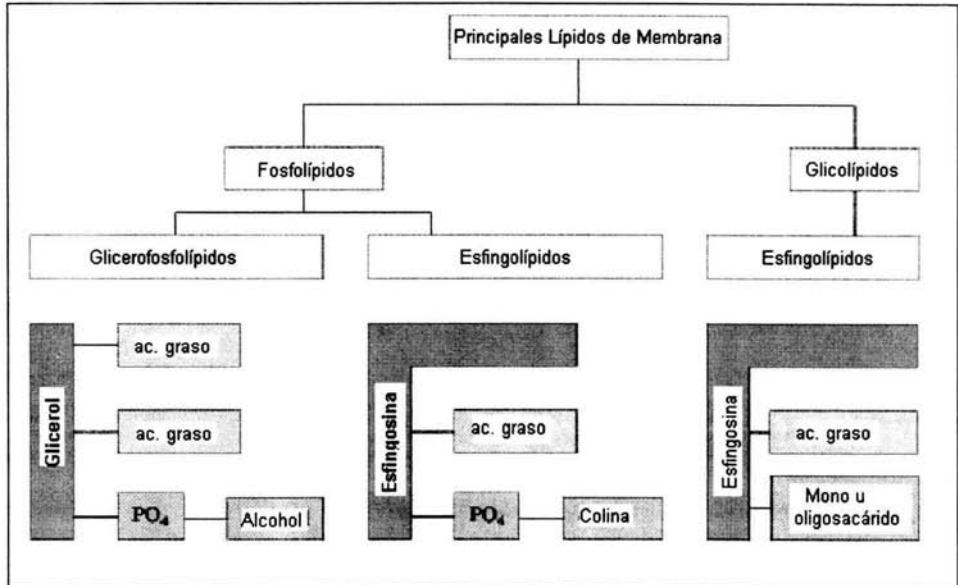


Figura 2. Los principales lípidos de la membrana plasmática eucariota. Modificado de Nelson & Cox (2000).

Las propiedades dinámicas de la membrana recaen en las proteínas, las cuales son de distintos tipos funcionales, como las enzimas, los receptores y las proteínas de transporte. Todas se clasifican dentro de dos grupos generales, dependiendo de su facilidad para extraerlas experimentalmente. Si se extraen fácilmente al tratar la membrana con una solución salina acuosa diluida, se propone que se localizan en la superficie, que son relativamente polares y solubles en agua, por lo que se denominan periféricas. Las proteínas que requieren tratamientos más drásticos para su extracción, como el uso de detergentes, se denominan proteínas integrales y se conoce que están inmersas dentro de la membrana o que la atraviesan (figura 1).

1.2 El transporte a través de la bicapa

El transporte de sustancias a través de las membranas biológicas constituye uno de los procesos fisiológicos centrales en el metabolismo celular. Esta actividad desempeña un papel primordial en los procesos de conservación, transferencia y abastecimiento de energía, y también en una amplia gama de fenómenos que van desde la regulación de la presión osmótica hasta la transferencia de los mensajes intercelulares.

En las membranas celulares ocurren dos tipos de transporte de solutos: el transporte no mediado, que se da por difusión simple, y el transporte mediado, que es posible mediante la acción de proteínas que reciben diversas denominaciones como: permeasas, portadores, translocasas o transportadores (Voet, 1995).

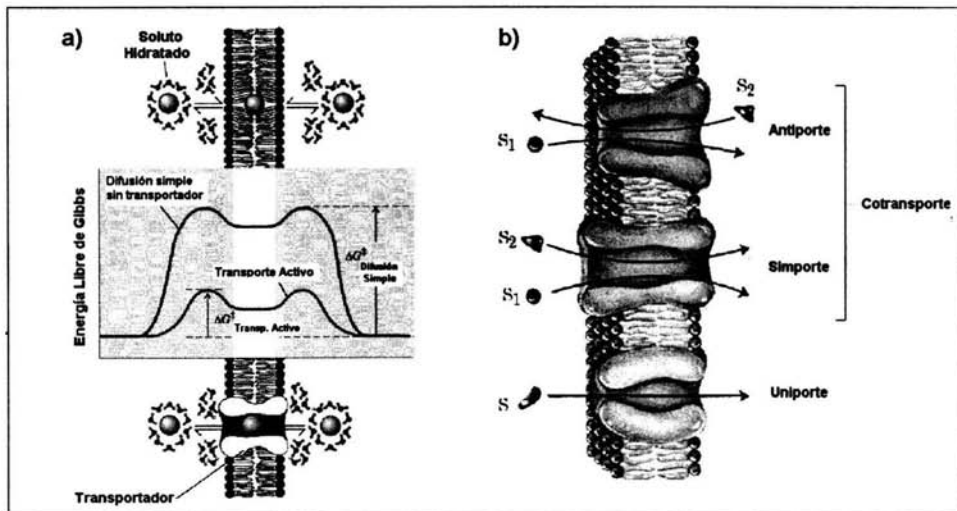


Figura 3 Termodinámica del transporte a través de las membranas y tipos de transporte. a) El gasto energético que ocurre en el transporte a través de las membranas depende de la naturaleza del soluto, de su concentración en ambos lados de la membrana, y de la fluidez y espesor de la membrana. La presencia de acarreadores que disminuyen el cambio de energía libre de activación en la translocación de la partícula. b) Los transportadores se pueden clasificar en cotransportadores y uniportadores, dependiendo de la estequiometría del transporte. Modificado de Nelson & Cox (2000).

La movilización del agua o de pequeños solutos no polares ocurre libremente por difusión simple, sin gasto de energía durante el proceso. Estos solutos utilizan vías difusionales que responden a los gradientes de concentración, a la naturaleza química (ausencia de cargas),

peso molecular, tamaño y coeficiente de reparto lípido-agua del soluto, además de la permeabilidad y espesor de la membrana (Fanjul, 1998). El cambio de la energía libre que sucede cuando difunde una molécula sin carga está dado por:

$$\Delta G = RT \ln C_2/C_1$$

donde R es la constante de los gases (0.082 atm l / K mol g), T es la temperatura en grados Kelvin, y C_2 / C_1 son las concentraciones molares del soluto en ambos lados de la membrana. De esta manera, cuanto mayor es la diferencia de concentraciones, mayor es la diferencia de energía libre.

Cuando el soluto presenta cargas se debe considerar tanto la diferencia del potencial eléctrico entre los dos compartimentos dado por el potencial de membrana ($\Delta\psi$), así como la valencia del soluto z. La ecuación que resulta es:

$$\Delta G = RT \ln C_2/C_1 + zF\Delta\psi$$

donde la capacidad de un electrolito para difundir depende de un gradiente combinado que involucra dos componentes, uno químico u osmótico, $RT \ln C_2/C_1$, y otro eléctrico $zF\Delta\psi$, que sumados conforman la diferencia de potencial electroquímico del ión. F representa la constante de Faraday, 9000 c / mol,

1.3 El transporte mediado por proteínas

Cinco características diferencian al transporte mediado del no mediado: la velocidad, la especificidad, la cinética de saturación, la susceptibilidad a la inhibición competitiva y la susceptibilidad a la inactivación química (Voet, 1995).

La translocación de las moléculas polares mediante el transporte activo constituye un proceso a menudo ligado a la hidrólisis del ATP o al consumo del gradiente electroquímico de un ión, y es posible gracias a la presencia de las proteínas de membrana acarreadoras.

El transporte mediado se clasifica en dos categorías, dependiendo de la termodinámica del sistema:

- a) La difusión facilitada, en la que se transporta un soluto a favor de un gradiente de concentración.
- b) El transporte activo, si las moléculas se transportan en contra de un gradiente de concentración, utilizando una fuente de energía en el proceso.

Una subclasificación del transporte activo reconoce dos grupos principales:

- 1) El transporte activo primario: si la translocación del sustrato está directamente acoplada a una reacción química que proporciona la energía suficiente para mediar el transporte.
- 2) El transporte activo secundario: en donde el transporte del sustrato está directamente acoplado al gradiente electroquímico de un ión, pero no a una reacción química.

Dependiendo de la estequiometría del transporte se reconocen tres sistemas, de los cuales el más simple es el *uniportador*, que cataliza la translocación de un solo sustrato a favor del gradiente de potencial electroquímico; este es el caso de la difusión facilitada. En el *simportador* se transporta simultáneamente dos moléculas diferentes en la misma dirección, de tal forma que la translocación de un soluto está acoplado con la translocación de otro en la misma dirección; durante este proceso el gradiente de potencial electroquímico de un ión, dirige el movimiento de un sustrato o ión en contra de su gradiente de concentración. Por último, en el *antiportador* se transportan dos especies distintas en direcciones opuestas, de tal manera que la translocación de una de ellas está acoplada con la translocación de la otra en la dirección opuesta.

El carácter eléctrico del transporte se especifica como electrogénico o electroneuro, dependiendo de si ocurre o no la separación de cargas a través de la membrana.

2 Las ATPasas

Dentro de los sistemas de transporte activo más estudiados se encuentran las ATPasas, que constituyen complejos enzimáticos altamente electrogénicos. Las ATPasas pertenecen al grupo de los transportadores primarios, los cuales tienen la capacidad de transducir en una diferencia de potencial electroquímico la energía proveniente de distintas fuentes, como la lumínica, la oxidación de nutrientes, la hidrólisis de ATP o de alguna otra molécula orgánica de alta energía.

La diferencia de potencial electroquímico del ión se utiliza en diversas funciones celulares, que incluyen la absorción de nutrientes, la secreción, la señalización celular, la transmisión de impulsos nerviosos, la excitación/contracción, la homeostasis en los organelos, la regulación del pH citosólico y de la composición iónica de la célula y del espacio extracelular. Además, este gradiente participa en el control del volumen, el crecimiento y la diferenciación celular (Fillingame, 1980; Goffeau, 1981; Malpartida, 1981; Scarborough, 2000; Shilpa, 2002; Okorokova, 2002).

Las ATPasas se distinguen por su composición de subunidades, la presencia o ausencia de un intermediario fosforilado, por la sensibilidad a inhibidores específicos, por la estequiometría ión/ATP y por la función fisiológica de sintetizar o hidrolizar ATP. Este tipo de transportadores se pueden clasificar en tres categorías principales: P, V y F (ver figura 4), dependiendo de su estructura, función y mecanismo de reacción (Pedersen y Carafoli, 1987).

Las ATPasas tipo P pueden transportar iones como H^+ , Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y se caracterizan porque durante su ciclo catalítico forman un intermediario covalente fosforilado, un aspartil-fosfato altamente inestable. Son una extensa familia de proteínas de membrana que mantienen la diferencia de potencial electroquímico del ión acoplado a la hidrólisis del ATP con el transporte de cationes a través de la membrana. Estas enzimas están formadas por una subunidad principal de aproximadamente 100, 000 daltones que contiene el sitio de unión del ATP y el sitio de fosforilación. La subunidad catalítica en los mamíferos suele estar acompañada por proteolípidos de masas moleculares variables, implicadas en la regulación de la enzima, pero que están ausentes en las ATPasas tipo P de los hongos y las plantas (Chow and Forte 1995; Morsomme, 2000). Este tipo de ATPasas tiene un pH óptimo ácido (5-6.7) y se inhiben con concentraciones micromolares de vanadato, lo que permite distinguirlas de los otros dos grupos de ATPasas.

Las ATPasas tipo P se subclasifican a su vez con base en el análisis filogenético de las secuencias de aminoácidos, y se reconocen varios subtipos dependiendo de su distribución en los filarios biológicos (Okamura, 2003).

Las ATPasas de la clase F generalmente translocan protones (aunque algunas bacterias halófitas translocan también Na^+) y se localizan en la membrana plasmática de bacterias, la membrana mitocondrial interna y las membranas tilacoidales de los cloroplastos. Son las ATPasas más estudiadas y consisten de dos regiones bien definidas, una soluble en agua que está implicada en la actividad catalítica de la síntesis e hidrólisis del ATP denominada F_1 , y otra liposoluble, relacionada con la translocación de los protones a uno y otro lado de la membrana llamada F_0 . Estas enzimas también se conocen como ATP-sintasas, por su capacidad de sintetizar ATP durante la respiración o la fotosíntesis. No forman un intermediario fosforilado, tienen un pH óptimo alcalino (entre 5 y 6.7) y se inhiben con concentraciones nanomolares de venturicidina y oligomicina (Hacinen, 1993).

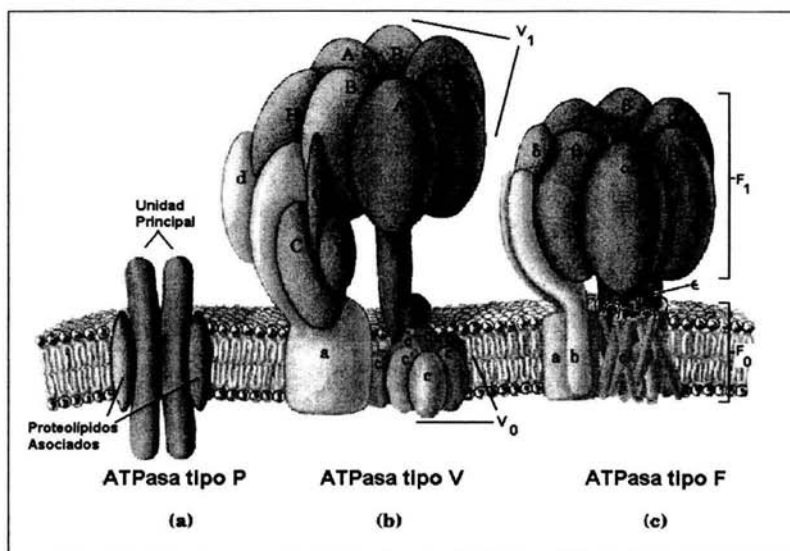


Figura 4. Los modelos de los tipos de las ATPasas. a) Las tipo P consisten de un péptido de aproximadamente 100 kDa que contiene el sitio de fosforilación bien caracterizado; en ocasiones interactúa con polipéptidos más pequeños que tienen un papel regulatorio y/o estructural. b) Las V-ATPasas son las más voluminosas, llegan a tener pesos moleculares mayores a 400 kDa, y están compuestas por un número variable de subunidades. c) Las F son también multiméricas y están compuestas por dos segmentos principales conectados por dos tallos (b y ϵ). La unidad F_0 se ha definido como el conducto por donde fluyen los protones hacia uno y otro lado de la membrana, mientras la subestructura F_1 contiene el sitio catalítico dentro de la subunidad β . Modificado de Nelson y Cox, 2000.

Finalmente, las ATPasas tipo V son las más voluminosas, solo translocan protones y al igual que las ATPasas tipo F están integradas por dos segmentos bien definidos (V_0 y V_1). Estas enzimas se asocian a organelos diferentes de los cloroplastos, las mitocondrias y el retículo endoplásmico, como serían las vacuolas (de aquí la denominación "V"), los lisosomas, los endosomas, las vesículas de clatrina, los tonoplastos, los gránulos de secreción y las vesículas del aparato de Golgi. En este grupo se incluye una gran variedad de enzimas sujetas a una subclasificación más detallada, que se definen por su capacidad de traslocar protones, no formar intermediarios covalentes fosforilados, estar integradas por múltiples subunidades, ser más activas a pHs neutros (7-7.5), y no ser inhibidas por vanadato o por oligomicina, pero sí por agentes como nitratos (por ejemplo KNO_3 y $KSCN$) y bafilomicina.

2.1 Las ATPasas tipo P

Las ATPasas Tipo P conforman una familia importante de proteínas membranales, presentes en los tres dominios de la vida, Eucariontes, Eubacterias y Archeobacterias (Koonin, 1997). Son una parte esencial en el transporte activo de una gran cantidad de cationes a través de las membranas.

Entre los integrantes de las ATPasas tipo P existen diferencias considerables que incluyen la especificidad a iones, la masa molecular y la estructura oligomérica (Goffeau, 1981; Asano, 1992). Las masas moleculares varían ampliamente, desde 72 kDa en transportadores de cadmio, presentes en bacterias, hasta 200 kDa para la ATP1-ATPasa de *Plasmodium* (Krishna, 1993). En general, las P-ATPasas de las bacterias tienen masas moleculares pequeñas (≈ 70 kDa), mientras que las de eucariontes poseen masas que oscilan entre 100-140 kDa. No existe homogeneidad en la estructura cuaternaria de las P-ATPasas, pues mientras que algunas pueden funcionar como oligómeros, otras parecen trabajar como unidades individuales (Bowman, 1981 y 1985; Dame, 1981; Lutsenko, 1995; Goormaghtigh, 1986). A pesar de que es difícil describir una organización estructural común para las ATPasa tipo P, todas comparten regiones similares que les permite distinguirlas de los otros dos tipos de ATPasas. Estos segmentos, que se esquematizan en la figura 5, incluyen el sitio de fosforilación Asp-Lys-Thr-Gly-Ser/Thr, la secuencia Thr-Gly-Glu-Ser/Ala localizado en un punto conformacional flexible, la secuencia Thr-Gly-Asp-Asn que se ha relacionado con el dominio de unión para el ATP, y la secuencia de aminoácidos Met-X-Gly-Asp-Gly-X-Asn-Asp-X-Pro, que conecta los sitios de pegado del ATP con el segmento transmembranal involucrado en la translocación de los cationes (Lutsenko, 1995; Portillo, 2000).

Asimismo, todas las P-ATPasas comparten un perfil que está orientado predominantemente hacia el citoplasma (ver figuras 5, 8, 9 y 10), compuesto por un pequeño extremo amino terminal, un asa hidrofílica que contiene el sitio de unión al ATP, y un extremo carboxilo típicamente pequeño. La cantidad de segmentos transmembranales que ligan la enzima a la membrana y que están implicados en la formación del canal iónico es variable.

Otra característica común a todas las P-ATPasas es que alternan entre dos conformaciones estructurales, llamadas E1 y E2, que poseen parámetros cinéticos distintos (Jorgensen and Andersen, 1988; Møller, 1996).

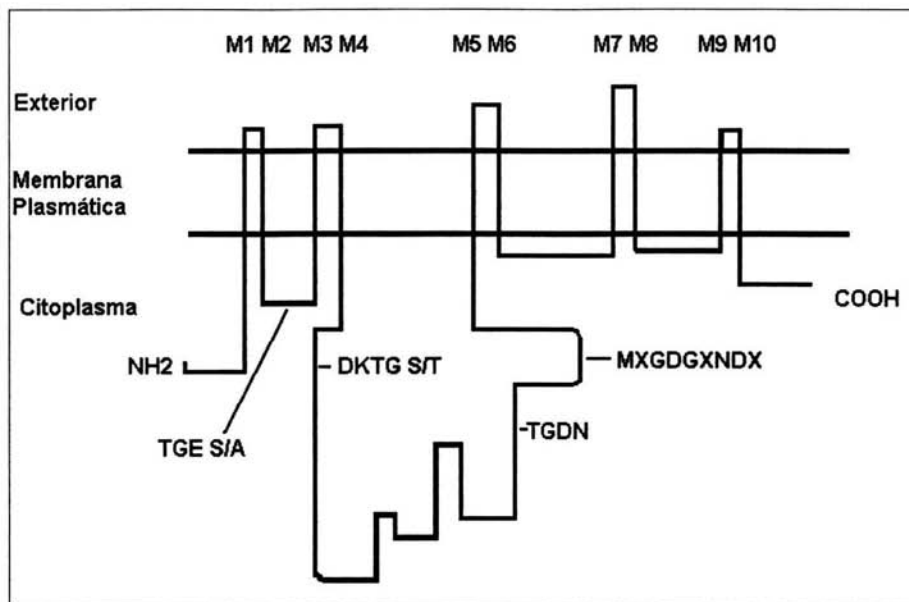


Figura 5. Los dominios comunes a las ATPasas tipo P. El esquema corresponde a la ATPasa de protones de *S. cerevisiae*. La secuencia TGE S/A se encuentran en un punto conformacional flexible, la región DKTG S/T corresponde al sitio de fosforilación, la secuencia TGDN se ha relacionado con el sitio de pegado del ATP, y la región MXGDGXNDX marca el punto de unión entre el sitio catalítico de la enzima y el inicio del canal iónico. Los cruces transmembranales se enumeran como M1 a M10.

Las ATPasas tipo P suelen subdividirse en dos grupos principales, dependiendo de la especificidad a los cationes y el perfil de hidropatía (Lutsenko, 1995). El grupo P_1 transporta metales pesados, como el Cu, el Cd y el Hg. El grupo P_2 acarrea una amplia gama de cationes mono y divalentes, como el H^+ , el Na^+ , el K^+ , el Mg^{2+} y el Ca^{2+} . Y en un tercer grupo P_3 se agrupan a los transportadores que comparten regiones homólogas con los otros dos grupos, pero que no funcionan como entidades individuales, sino que son parte de complejos multiproteicos, como las bombas de potasio de las bacterias (Altendorf, 1992).

Recientemente se ha incluido a las P-ATPasas en una superfamilia de hidrolasas llamada deshalogenasas haloácidas (HAD), en donde se agrupan a las fosfatasa, las isomerasas y las fosfotransferasas que comparten sustratos estructuralmente similares, además de mecanismos catalíticos y secuencias de aminoácidos homólogas (Aravind, 1998; Collet, 1997). Algunos aspectos que aún permanecen por resolver en el campo de las ATPasas tipo P involucran la descripción del mecanismo mediante el cual los cationes se translocan a

través de las membranas y las interacciones entre los sitios de unión a los cationes y el sitio catalítico en el cual ocurre la fosforilación de la enzima y la unión del ATP.

2.2 La H^+ -ATPasa

Las ATPasas de protones que se encuentran en la membrana plasmática de los protistas, las algas, los hongos y las plantas vasculares, son proteínas politópicas que pertenecen a las ATPasas tipo P. Son proteínas integrales de la membrana plasmática que se han correlacionado con las tasas de crecimiento celular y que desempeñan un papel central en la fisiología de estos organismos (Mason, 1998; Portillo, 1989 y 2000).

Este translocador de protones altamente electrogénico es el principal componente de la membrana plasmática de las células con tasas altas de transporte activo, como las levaduras y los tejidos radiculares de las plantas vasculares. En este tipo de tejidos la H^+ -ATPasa constituye la proteína celular más abundante, ya que representa cerca del 15% del total de las proteínas presentes en la membrana plasmática y el 0.3% del total de las proteínas de las levaduras. Se encuentran alrededor de 10^6 enzimas por cada célula (cerca de 10^4 ATPasas por micrómetro cuadrado de membrana plasmática), con un número de recambio entre 20 y 100 protones por segundo, por lo que el flujo electroquímico que se genera oscila entre 10^5 a 10^6 protones por segundo en cada micrómetro cuadrado de membrana plasmática. Este flujo de H^+ es comparable al proceso análogo que ocurre en los cloroplastos y las mitocondrias de eucariontes o en las membranas de bacterias fotosintéticas (Serrano, 1988).

El funcionamiento normal de la enzima consume cerca del 20% o más del total de la concentración del ATP celular. En *Neurospora crassa* el potencial de membrana generado por la ATPasa de protones puede tomar valores de hasta -270 mV. El gradiente electroquímico que genera la H^+ -ATPasa lo utilizan los acarreadores secundarios para transportar nutrientes como los aminoácidos y los azúcares, por mecanismos de cotransporte con el protón, y se realizan movimientos de cationes como el sodio y el calcio por antitransporte con el protón (Goffeau, 1981).

Asimismo, este gradiente de potencial electroquímico se utiliza en la regulación del pH citosólico, el balance osmótico, la tolerancia a los metales pesados como el cobre (Weissman, 1999) y la respuesta al estrés térmico (Piper, 1993) y salino (Moskvina, 1999).

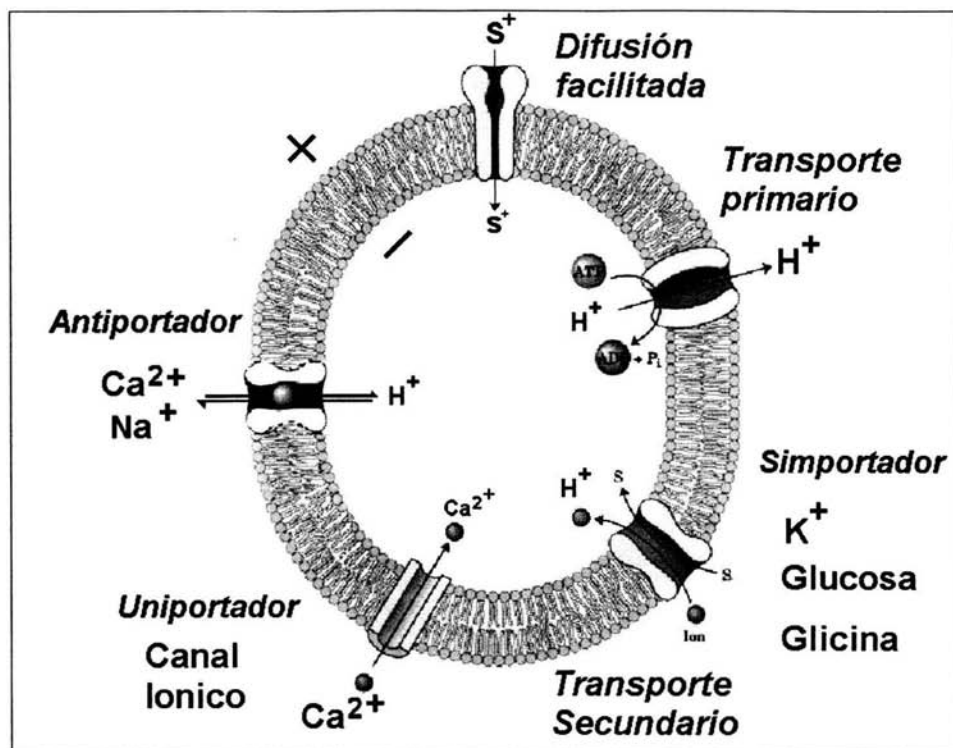


Figura 6. Los sistemas de transporte en la membrana de *K. lactis*. La actividad de cada transportador depende en gran medida del potencial electroquímico de protones generado por la ATPasa de protones, que es un transportador primario. Modificado de Nelson y Cox 2000.

El mecanismo de acción y el papel fisiológico de la H^+ -ATPasa se ha estudiado por medio de dos enfoques experimentales: 1) la modificación química específica de los aminoácidos, con el cual se ha sugerido la participación de algunos residuos en el ciclo catalítico y 2) el análisis por mutaciones dirigidas del gen, con el que se ha propuesto el papel de algunos aminoácidos en el bombeo de protones y en la hidrólisis del ATP (Portillo y Serrano 1989). Ambas técnicas tienen sus limitaciones propias; es decir, no existe ningún agente químico específico para un solo aminoácido, y los grupos funcionales que reaccionan con el inhibidor puede estar enmascarados por el entorno, por lo que es arriesgado realizar aseveraciones precisas, y en ocasiones resulta imposible determinar el número de grupos funcionales modificados que participan en la pérdida de la actividad enzimática (William and Koshland Jr., 1961).

En la misma forma, los análisis por mutagénesis dirigida arrojan resultados un tanto paradójicos con respecto al alto número de mutaciones artificiales que pueden ser toleradas con pocos o ningún efecto aparente en las propiedades funcionales de la enzima, lo cual contrasta con las altas tasas de conservación de la secuencia de aminoácidos que existe en este grupo de proteínas (Møller, 1996).

2.3 La estructura primaria de la H⁺-ATPasa

Las H⁺-ATPasas más estudiadas se localizan en la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa*. Ambas enzimas pertenecen a la clase de las P-ATPasas de metales ligeros (P₂), están incorporadas a la bicapa lipídica a través de 10 segmentos transmembranales, presentan una sola unidad proteica de ~100 kDa y carecen de proteolípidos de bajo peso molecular (Hager, 1986; Serrano, 198,; Nakamoto, 1989).

```

1 madhsasgap alstniesgk fdekaiaaaa yqpkpkvedd ededidalie dleshdghda
61 eeeeeeatpg ggrvvpedal qtdtrvgltt eevvqrrrky glnqmkeeke nhflkflgff
121 vgpqifvmeg aavlaagled wvdfgvicql lllnavvgfv qefqagsivd elkktlalka
181 vvlrdqtlke ieapevvpqd ilqveegtii padgrivtdd aflqvdsal tgeslavdkh
241 kgdqvfassa vkrgeafvvi tatgdntfvg raaalvnaas gsgghftevl ngigtillil
301 viftllivwv ssfyrsnpi v qileftlait ggvpvqlpa vvtttmavga aylakkaiv
361 qklsaiesla gveilcskt gtltnknlsl hdpvtvagvd pedlmltacl aasrkkkgid
421 aidkafllsl kyypraksvl skykvlqfhp fdpvskkvva vvespgeri tcvkgaplff
481 lktveedhpi peevdqaykn kvaefatrgf rslgvarkrg egswelgim pcmpprhdt
541 yktvceaktl glsikmltgd avgiaretsr qlglgtniyn aerlglgggg dmpgsevdyf
601 veaadgfaev fpqhkyvve ilqrgylva mtgdgvndap slkkadtgia vegssdaars
661 aadivflapg lgaaidalkt srqifhrmya yvvrialli hleiflglwi ailnrslnie
721 lvvfiaifal vatlaiaydn apysqtpvkv nlpklwmsv llgvvlavgt witvttmyaq
781 genggivqnf gnmdevlflq lsltenwlif itrangpfws sipswqlsga iflvdilatc
841 ftiwgwfehs dtsivavvri wifsfgifci mggvyyilqd svgfdnlmhg kspkgnqkqr
901 sledfvvslq vvgqheksq

```

Figura 7. La secuencia de los aminoácidos de la ATPasas de la membrana plasmática de *N. crassa*, codificada por el gen PMA1. En rojo se muestra el aspártico (d) 378 correspondiente al sitio de fosforilación. En amarillo la lisina (k) 615 y los residuos de aspártico (d) 534, 560, 634 y 638 involucrados con el mecanismo de hidrólisis del ATP. En verde el sitio de unión del protón, aspártico 730. En Violeta se colorean los aminoácidos isoleucina (i) 331 y 332, valina (v) 334, tirosina (y) 694 y serina (s) 699, implicados en la translocación del protón. En azul se denota la serina (s) 913 y la treonina (t) 914 correspondientes a los sitios de inhibición de la enzima por mecanismos de fosforilación. Secuencia reportada por Hager en 1986. La clave de acceso a la secuencia de la proteína en la Med Line es P07038.

En la figura 7 se muestra la secuencia de los aminoácidos de la H⁺-ATPasa de *N. crassa*. La estructura primaria se dedujo a partir de la secuencia de nucleótidos del gen PMA1, presente en los genomas de *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *Z. rouxii* y *N. crassa*. Las enzimas de *S. cerevisiae* y de *N. crassa* tienen 918 y 920 aminoácidos, respectivamente, con masas moleculares de 99.7 y 99.9 kDa. Estos valores corresponden con el peso molecular

estimado mediante la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Serrano, 1988; Hager, 1986).

Esta proteína también se encuentra en *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Kluyveromyces marxianus* y otros hongos. Al alinear las secuencias de los aminoácidos de las ATPasas de H^+ de los hongos se observa que están muy conservadas. Entre las secuencias de *S. cerevisiae* y *N. crassa* el porcentaje de identidad es de 74%, con solo 238 residuos diferentes, de los cuales 105 son cambios conservativos.

La porción central de la proteína tiene una similitud de 83%, mientras la mayor parte de las diferencias se localiza en los extremos amino y carboxilo, con 74 y 42 divergencias respectivamente (Serrano, 1988). Pese a ello, cabe mencionar que ambas regiones están involucradas en la regulación de la enzima. Los primeros 37 aminoácidos, que contienen la secuencia ampliamente conservada DEDEIDALIE (residuos 40 a 50) en las ATPasas fúngicas, son indispensables para la actividad de la enzima y su inserción dentro de la membrana plasmática. Paralelamente, los últimos 11 ó 18 aminoácidos regulan la actividad de la enzima por mecanismos de fosforilación mediados por las proteínas cinasas (Portillo, 1989 y 1991).

2.4 La topología de la H^+ -ATPasa

El modelo topológico de la ATPasa de protones se muestra en la figura 8. Este modelo está basado en el análisis de hidropatía y en las predicciones de la estructura secundaria del polipéptido de 100 kDa de *N. crassa*. Como se puede observar en las figuras 5 y 8, la mayor parte de la enzima se localiza en la cara citoplásmica de la membrana, y solo una pequeña porción de la enzima (más o menos 50 aminoácidos) está expuesta al medio externo. La localización citoplásmica de los extremos amino y carboxilo, así como la de las dos primeras asas hidrofílicas mayores, se comprobó mediante técnicas de unión de anticuerpos y experimentos de tripsinólisis (Nakamoto, 1989; Mandala, 1989; Hennessey, 1990; Scarborough, 1990). La descripción detallada de la estructura y el funcionamiento de la bomba de protones se basa en los datos experimentales de modificación química y mutagénesis dirigida (Rao, 1992).

La región amino terminal es la que menos conserva la estructura primaria y también la que más varía en el número de residuos de aminoácidos que la integran, con 34 en los

transportadores de potasio de las bacterias, y hasta 115 en las ATPasas de protones de los hongos (Serrano, 1988).

Los segmentos transmembranales M1 y M2 que siguen al extremo amino varían en longitud, de 20 a 27 y 20 a 21 residuos de aminoácidos respectivamente, y están separados entre sí por 5 o 13 aminoácidos. Las siguientes dos secciones que cruzan la membrana (M3 y M4) están separadas por 7 a 12 aminoácidos y conforman la región más conservada de los elementos transmembranales. El segmento M3, que varía de 25 a 28 aminoácidos, contiene la secuencia TILLI que se conserva en las ATPasas fúngicas y de bacterias como *E. coli* (ver figura 7, residuos 295 a 299). El M4 (que es la hélice transmembranal más conservada) está formada de 26 a 30 aminoácidos, y contiene dos prolinas altamente conservadas en la escala biológica. En particular para los hongos, ambas prolinas se incluyen en la secuencia PVGLP (residuos 335 a 339 de la figura 7).

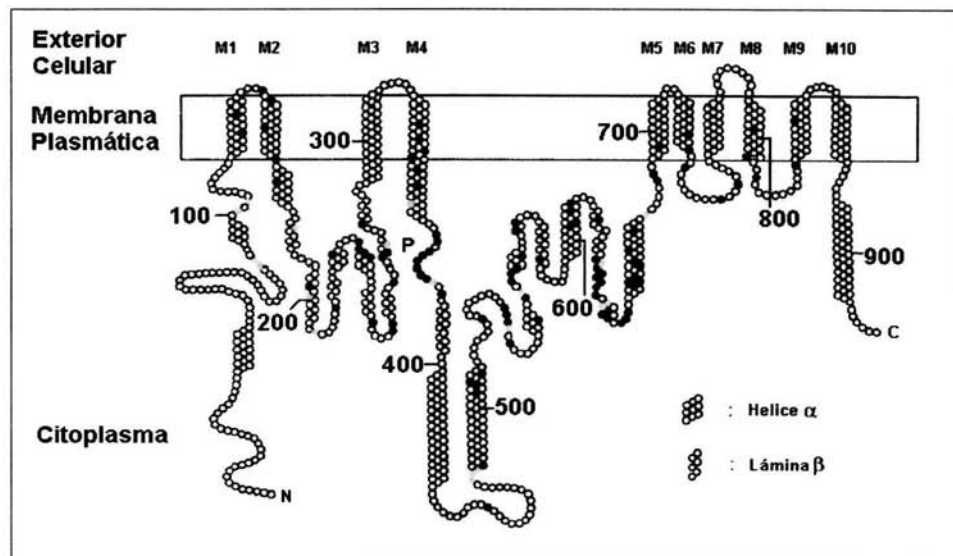


Figura 8. El modelo topológico de la ATPasa de protones de *N. crassa*. Los residuos de los aminoácidos conservados en las ATPasas se muestran en diferentes colores. En rojo los 18 aminoácidos conservados en 158 de 159 P-ATPasas conocidas. En amarillo se denotan los 19 residuos presentes en 97 P₂-ATPasas. Finalmente, en azul se ilustran los 77 aminoácidos comunes a las 32 H⁺-ATPasas caracterizadas. Los cruces transmembranales se han señalado como M1 a M10. Esquema modificado de Morsome, Slayman and Goffeau, 2000.

El asa citoplásmica principal consiste de 350-450 aminoácidos que alternan en hélices α y hojas β , y contiene el sitio de fosforilación de la enzima, así como las regiones involucradas

en la hidrólisis del ATP. El segmento M5 puede estar formado por 20 a 26 aminoácidos. El M6 tiene 20 ó 33 residuos, mientras que M7 y M8 cambian su longitud de 23 a 27 y de 19 a 30 aminoácidos, respectivamente (Nakamoto, 1989).

El extremo carboxilo contiene dos secciones hidrofóbicas (M9 y M10), que varían en longitud, y que se ha relacionado con la regulación de la enzima.

2.5 Los dominios funcionales de la H⁺-ATPasa

Mediante técnicas de microscopía se obtuvo la imagen tridimensional de la H⁺-ATPasa de *N. crassa* con una resolución de 0.8 nm en la conformación abierta (ver figuras 9b, 9c y 10). Este modelo se ha utilizado para la gran mayoría de las P-ATPasas que comparten 10 segmentos transmembranales y que exhiben actividad como monómeros (Auer, 1998; Scarborough, 2000; Kühlbrandt, 2002).

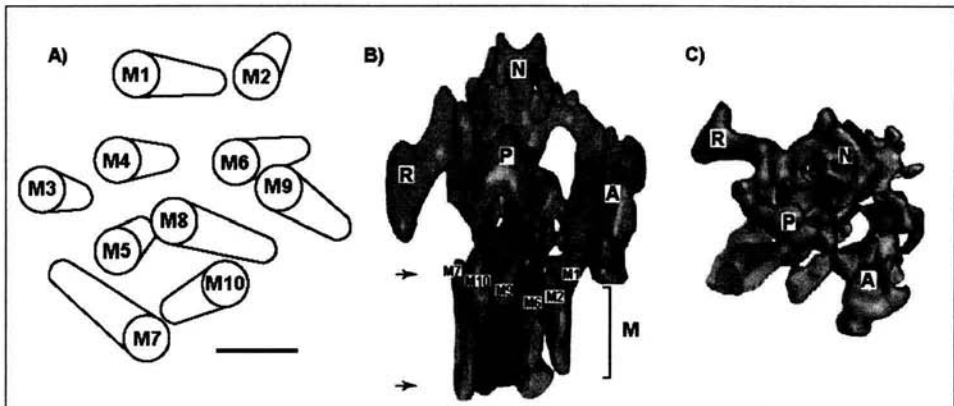


Figura 9. LOS dominios funcionales y las hélices transmembranales de la H⁺-ATPasa de *N. crassa*. A) Se dibujan las 10 hélices transmembranales vistas desde el lado citoplásmico; cada cilindro representa un cruce a través de la membrana y se ha numerado de M1 a M10. La barra corresponde a 1 nm. B) Vista lateral de la enzima en estado abierto (E₂), donde se observan los 4 dominios citoplásmicos N (de unión del nucleótido), R (regulatoria), P (de fosforilación) y A (asociada al anclaje de la proteína a la membrana), además del dominio membranar (M). Las flechas indican los límites de la proteína en la membrana plasmática. C) Vista superior de la enzima, donde se ilustra el posible arreglo espacial de los dominios citoplásmicos y sus contactos. Imagen modificada de Sarborough, 2000.

Con base en la estructura cristalográfica de la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico de conejo, se definieron cinco dominios funcionales en la ATPasa de protones, que presentan independencia estructural. Estos dominios son:

(1) el dominio M, formado por los diez segmentos transmembranales, (2) el dominio R o de regulación, que corresponde al extremo carboxilo de la proteína, (3) el dominio P o de

fosforilación, que corresponde a la mayor extensión citoplásmica localizada entre los segmentos transmembranales 4 y 5, (4) el dominio N o de pegado del nucleótido y (5) el dominio A, que se asocia con una función reguladora y de anclaje a la membrana plasmática (Morsomme, 2000; Külbrandt, 2002).

En la figura 9A se muestra un esquema del dominio M, que representa una cuarta parte de la masa de la proteína y que está ampliamente conservado en todas las P-ATPasas. Este dominio está integrado por 10 segmentos transmembranales arreglados en estructuras de α -hélice. Estas hélices están fuertemente aglutinadas en un paquete cerrado donde las espirales quedan distanciadas entre 0.8 y 1.3 nm, y cubren un área de aproximadamente 3 nm x 4 nm si se observan en posición vertical, perpendicular al plano de la membrana. Aún cuando las hélices son relativamente rectas, ninguna corre exactamente perpendicular al plano de la membrana; los ángulos de inclinación varían de 5 a 15° en los segmentos M1 a M5 y M9 y M10, mientras que M6, M7 y M8 tienen un mayor grado de inclinación (16-22°). El sitio de unión al protón en el dominio membranal está definido por los residuos de Asp⁷³⁰ y el Glu⁸⁰⁵. Cerca se localizan los grupos polares de los enlaces peptídicos de las Ile³³¹, Ile³³² y la Val³³⁴ pertenecientes al segmento M4, así como los grupos polares de las cadenas laterales de la Tyr⁶⁹⁴ y la Ser⁶⁹⁹ en la hélice M5. Se ha demostrado por experimentos de mutagénesis dirigida que todos estos aminoácidos son esenciales para el bombeo de los protones (Morsomme, 2000; Külbrandt, 2002). Otros residuos ampliamente conservados en el dominio membranal de la H⁺-ATPasa fúngica son la Arg⁶⁹⁵, la His⁷⁰¹ y el Glu¹²⁹, que también resultan fundamentales para el bombeo de protones. Con el Glu¹²⁹ se han obtenido resultados contradictorios, pues se ha visto que al modificarse con carbodiimidias la actividad de la ATPasa se inhibe, lo que sugiere que este residuo participa en el transporte de protones; sin embargo, al realizarse las mutaciones específicas de este aminoácido no cambió la actividad de la ATPasa (Sussman, 1987). El acceso más probable al sitio de unión del protón en el dominio M de la ATPasa es a través de un canal formado por residuos con cadenas laterales iónicas y polares que se forma entre los segmentos M1 y M2, en donde se localizan varias glutaminas (Gln) que pueden facilitar el transporte del protón. Estos aminoácidos son la Gln¹⁰⁸ de M1 y las Gln¹⁶¹ y Gln¹⁶² localizadas en M2. El dominio P también está muy conservado en las P-ATPasas. Aquí se localiza el Asp³⁷⁸, que realiza el ataque nucleofílico sobre el fosfato y del ATP y que representa el sitio de

fosforilación de la enzima. Este residuo está flanqueado por los grupos carboxilo de los Asp⁶³⁴ y Asp⁶³⁸, que aportan cargas negativas e interactúan con moléculas de agua para permitir la ruptura del intermediario acil fosfato. Se piensa que el exceso de cargas negativas puede ser estabilizado por la Lis⁶¹⁵ (Morsomme, 2000). Dentro de este dominio se localizan además los residuos de Asp⁵³⁴ y Asp⁵⁶⁰ que también participan en la unión del ATP, pero que no son esenciales, pues al mutarse sólo cambian la afinidad por el sustrato. Este dominio está formado principalmente por hélices α y está conectado con el dominio N por dos segmentos adyacentes estrechos (ver figura 8) que permiten una rotación de 73° del dominio N sobre el P.

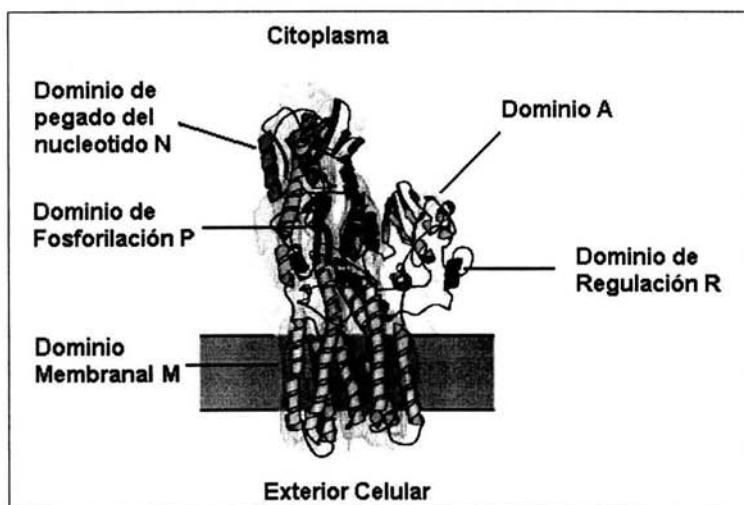


Figura 10. El modelo sobrepuesto de la estructura de la H⁺-ATPasa de *N. crassa* y la ATPasa de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico, donde se señalan los 5 dominios conservados de las ATPasas. Imagen modificada de Kühlbrandt, 2002.

El dominio R contiene los residuos de la Ser⁹¹³ y la Thr⁹¹⁴, que son los sitios potenciales de fosforilación por una proteína cinasa. La eliminación de los últimos 11 residuos de aminoácidos genera una enzima con características cinéticas similares a una ATPasa activada por glucosa (Palmgren, 1990; Portillo, 1991; Mason, 1998). Por tanto, se ha propuesto que el efecto inhibitorio se debe a que esta región impide el movimiento rotatorio del dominio N, restringiendo su movilidad y su interacción con el dominio P.

La estructura cuaternaria de la ATPasa de protones es un tema no resuelto. Por ejemplo, cuando se solubiliza la proteína con detergentes se generan complejos enzimáticos

organizados en octámeros y decámeros para la enzima de *S. pombe* y hexámeros para la de *N. crassa* (Auer, 1998). El tratamiento de la membrana plasmática de *N. crassa* con radiación indica que la unidad funcional de la enzima tiene una masa molecular de 230 kDa, lo que sugiere un arreglo dimérico de la ATPasa (Bowman, 1985); sin embargo, una sola cadena polipeptídica de la ATPasa de *N. crassa* incorporada en proteoliposomas es completamente funcional para la hidrólisis de ATP (Goormaghtigh, 1986).

2.6 El mecanismo enzimático de la H⁺-ATPasa

Las ATPasas de protones son capaces de realizar la hidrólisis del ATP y la translocación de los cationes como entidades individuales, sin presentar estados oligoméricos o con alguna otra proteína de la membrana plasmática (Scarborough y Addison, 1984). Para el caso de las H⁺-ATPasas fúngicas, la estequiometría del transporte es de un protón por cada ATP hidrolizado (Malpartida, 1981)

Estudios cinéticos detallados de la ATPasa han confirmado que el complejo Mg-ATP es el verdadero sustrato de la enzima, pero un exceso del Mg²⁺ o del ATP provoca inhibición (Koland, 1986). La afinidad de la proteína por el magnesio (K_d) depende de la concentración de KCl o NaCl, siendo de 10 μM en presencia de 25 mM de la sal y de 200 μM en ausencia de la sal. Estas variaciones de la afinidad se asocian con cambios conformacionales de la enzima, como lo muestra la disminución en la sensibilidad de la enzima hacia el inhibidor N-etilmaleimida (Brooker and Slayman, 1983) y el incremento en la fuerza de unión del complejo terbio-formicina trifosfato, análogo del Mg-ATP (Ronjat, 1987).

El mecanismo básico de reacción de la H⁺-ATPasa consta de 5 pasos principales:

- 1) El ciclo comienza con la activación de la bomba mediante una fosforilación reversible del dominio R por una proteína cinasa.
- 2) Una vez que está activada la enzima (E₁), interactúa con el ATP a nivel del asa citoplásmica principal, al mismo tiempo que el catión interactúa con el sitio de alta afinidad localizado en el dominio M. Ambos contactos con la enzima provocan un cambio conformacional en los dominios P y A, que facilitan la formación del enlace aspartil fosfato (estado E₁P), así como el movimiento del dominio A, que conduce a un cambio en el arreglo de los segmentos transmembranales (posiblemente de M2).

- 3) Con la fosforilación del aspártico 378 en el dominio P y la liberación del ADP, hay un cambio conformacional que lleva a la enzima a un estado E_2P . Al mismo tiempo se reduce la afinidad por el protón en el sitio de pegado (aspártico730), lo cual permite la liberación del protón en el lado extracelular.
- 4) El enlace aspartil-fosfato se hidroliza y se libera el fosfato inorgánico (E_2).
- 5) Finalmente, la enzima regresa al estado E_1 , en donde por medio de una proteína fosfatasa puede inactivarse o iniciar un nuevo ciclo de hidrólisis del ATP y transporte de los protones a través de la membrana.

Los detalles de estos pasos principales, así como la naturaleza exacta de los intermediarios, es aún materia de debate, pero el esquema general que se muestra aquí (figura 11) es el que se acepta entre los diversos autores, los cuales coinciden en los siguientes puntos: A) que hay dos conformaciones de la enzima que tienen diferencias en la afinidad por los cationes, en la estabilidad térmica y en la sensibilidad a proteasas, B) la posibilidad de fosforilar a la enzima y C) la enzima es capaz de ser inhibida con el vanadato (Cantley,1978; Macara, 1980; Serrano, 1988; Møller, 1996).

2.7 Regulación de la H^+ -ATPasa

Las H^+ -ATPasas de hongos y plantas se regulan tanto a nivel transcripcional como a nivel postraduccional (Portillo, 1991 y 2000). Por ejemplo, en *S. cerevisiae* y *S. pombe*, la actividad de la enzima depende de las condiciones de crecimiento (Serrano, 1988). Algunos factores que incrementan la actividad de la enzima son las fuentes de carbono fermentables como la glucosa, la maltosa y la galactosa (Sychrova and Kotyk, 1985). Asimismo, distintos agentes estresantes como las temperaturas supraóptimas, los choques térmicos, la disminución de las fuentes de carbono o de nitrógeno, las altas concentraciones de etanol, de metales, de sales o la acidificación del medio de cultivo, se han reportado como activadores de la enzima (Eraso, 1987; Benito, 1992; Hernández, 2002).

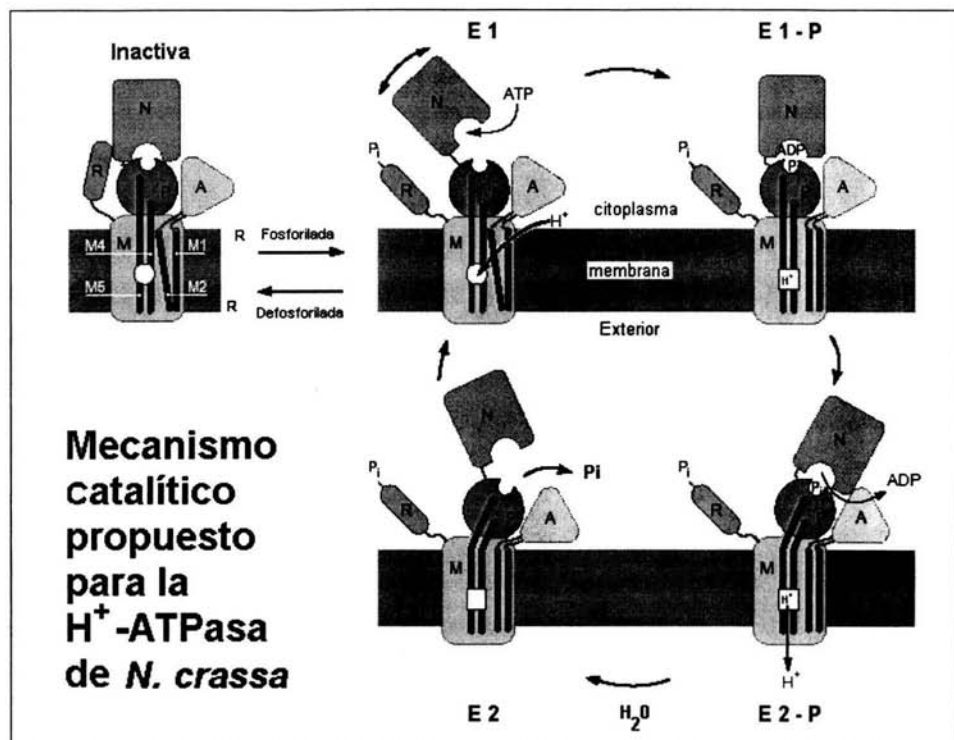


Figura 11. El mecanismo catalítico de la ATPasa de protones de *N. crassa*. Esquema modificado de Kühlbrandt, 2002.

3 Las carbodiimidias

Entre los inhibidores que han permitido describir la importancia funcional y estructural de algunos de los residuos de aminoácidos de las ATPasas se encuentran las carbodiimidias.

3.1 Los inhibidores tipo carbodiimida

Las carbodiimidias son inhibidores relativamente específicos que se han utilizado ampliamente como moléculas “reporteras” para describir la localización e importancia funcional de ciertos residuos de aminoácidos en la estructura de las proteínas (Chadwick, 1985). Este tipo de compuestos tiene la capacidad de reaccionar con los grupos amino, los hidroxilo, los sulfhidrilo y los carboxilo; pero en solución acuosa y condiciones de pH ácidas, las carbodiimidias reaccionan preferentemente con los grupos funcionales carboxilo y sulfhidrilo. Los grupos hidroxilo de las tirosinas también pueden reaccionar con las carbodiimidias bajo estas condiciones, pero con una velocidad mucho menor que la de los carboxilos y sulfhidrilos (Carraway, 1972).

El mecanismo de reacción general para las carbodiimidas se ilustra en la figura 12. Comienza con la interacción de los grupos carboxilo presentes en la proteína (I) con la carbodiimida, lo cual conduce a la formación de un intermediario altamente inestable llamado O-acilurea (II). Este grupo carboxilo activado, que forma parte del aducto transitorio, puede seguir diferentes caminos: si existe un agente nucleófilo, como una molécula de agua, el grupo carboxilo se regenera y se produce la urea derivada de la carbodiimida (III); sin embargo, si el agente nucleofílico es un grupo amina, se forma una amida y la urea derivada de la carbodiimida (IV). La O-acilurea también puede reorganizarse y derivar en una N-acilurea (aducto estable) mediante una transferencia intramolecular del grupo acilo (V), o en ausencia de algún nucleófilo externo, puede reaccionar con grupos funcionales vecinos, lo cual puede provocar un entrecruzamiento dentro de la proteína (VI), y se libera la urea derivada de la carbodiimida.

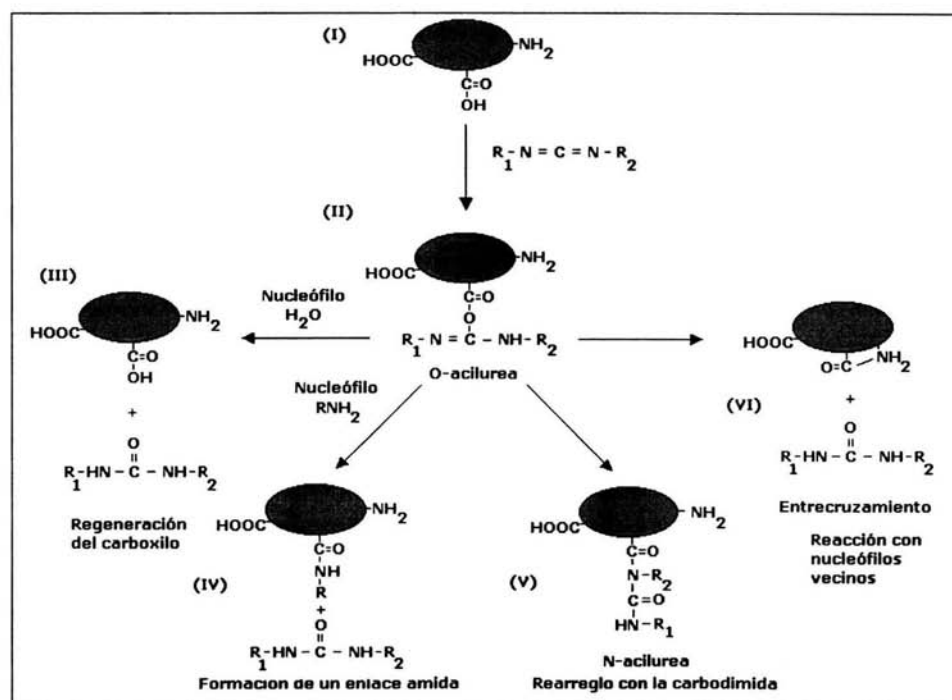


Figura 12. Esquema general de la reacción química de las carbodiimidas con una proteína. La formación del intermediario O-acilurea (altamente inestable) origina variantes como productos de la interacción química.

Un ejemplo de un inhibidor de esta naturaleza es la N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCCD), que se ha utilizado para estudiar la traslocación de protones en varias ATPasas, citocromos y transhidrogenasas. Este compuesto reacciona covalentemente con los grupos carboxilos de los residuos de ácido glutámico (en mitocondrias y cloroplastos) o ácido aspártico (en el caso de las bacterias) presentes en el proteolípido de bajo peso molecular (subunidad c) que forma parte de la porción membranal (F_0) de las ATPasas tipo F. Como resultado de la interacción del DCCD con la proteína, el movimiento de los protones a través de la porción F_0 se bloquea y la actividad de la enzima se inhibe (Fillingame, 1980). Se ha propuesto que el DCCD y otras carbodiimidias hidrofóbicas reaccionan con los grupos carboxilo inmersos en un ambiente hidrofóbico, ya que las carbodiimidias hidrofílicas no inhiben a las ATPasas tipo P localizadas en las membranas plasmáticas (Sussman, 1982). En el caso particular de la H^+ -ATPasa de *N. crassa* se identificó al residuo de glutámico 129, presente en el primer segmento transmembranal, como el sitio de reacción al cual se incorpora de manera covalente el DCCD (Sussman, 1987).

3.2 El inhibidor fluorescente NCD-4

Con el fin de aprovechar la modificación de las proteínas con las carbodiimidias fluorescentes, se ha sintetizado una carbodiimida similar al DCCD, llamada NCD-4 (abreviatura de N-ciclohexil-N'-(4-dimethylamino- α -naftil)carbodiimida), cuya fórmula molecular es $C_{19}H_{22}N_3$ y que tiene un peso molecular de 292.4 umas; que por sí misma no es fluorescente, pero cuando reacciona con los grupos funcionales carboxilo de las proteínas, produce un compuesto N-acilurea altamente fluorescente (Chadwick, 1983).

La forma como reacciona el NCD-4 con la proteína se basa en el mecanismo de las carbodiimidias asimétricas con el ácido acético. Este proceso involucra tres pasos, que se ilustran en la figura 13. En el primero ocurre la transferencia de un protón del grupo carboxilo hacia el nitrógeno más nucleofílico de la carbodiimida. En el segundo ocurre la formación de un intermediario O-acilurea altamente inestable. Finalmente en el tercer paso se da la producción de la N-acilurea (aducto estable), que involucra al átomo de nitrógeno que inicialmente fue el menos nucleofílico y que se ve implicado en la generación del producto fluorescente (Chadwick, 1985).

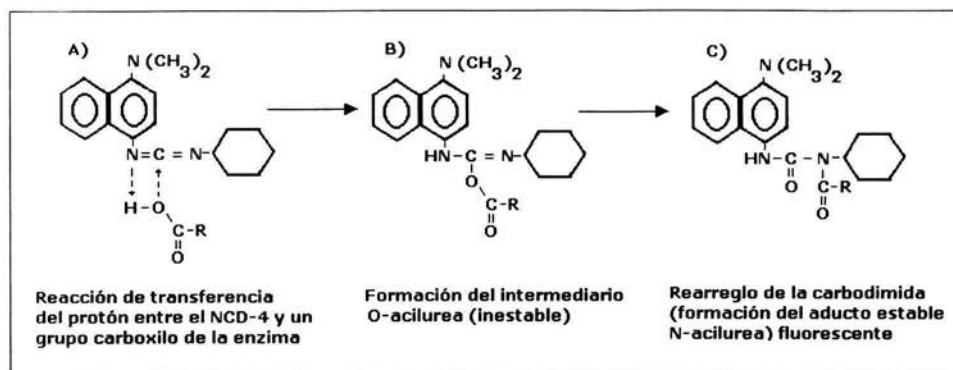


Figura 13. El mecanismo de la reacción propuesto entre el inhibidor NCD-4 y los grupos carboxilo. En A se forma el complejo inicial de la reacción, en B se ilustra la formación del intermediario O-acilurea, y finalmente en C se marca la aparición del reactivo fluorescente N-acilurea que tiene su espectro de máxima absorción a $336 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ y su máxima emisión a $418 \text{ nm} \pm 4 \text{ nm}$. Modificado de Chadwick & Thomas 1985.

Las constantes de inhibición de segundo orden para la ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico de músculo de conejo, indican que el NCD-4 es ligeramente menos reactivo que el DCCD. Para el primero la constante de segundo orden es de $130 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, mientras que para el segundo es de $430 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Esto puede deberse a que el NCD 4 es un compuesto más hidrofóbico y voluminoso que el DCCD, y por lo tanto, tiene un acceso más limitado a los grupos carboxilo localizados en los segmentos transmembranales (Chadwick, 1983).

4 *Kluyveromyces lactis*, el organismo de estudio

El organismo que se utilizó en este trabajo es el hongo levaduriforme *Kluyveromyces lactis*, emparentado filogenéticamente con *S. cerevisiae* y *Schizosaccaromyces Pombe*, con los cuales comparte las características de ser un organismo eucarionte heterótrofo, capaz de formar esporas como medio de propagación y reproducción sexual o asexual. Los tres son típicamente amastigotes (carecen de movimiento) en todas las fases de su desarrollo y tienen una pared celular compuesta principalmente de celulosa y/o quitina.

4.1 La ubicación taxonómica del género *Kluyveromyces*

Existen por lo menos 6 clasificaciones diferentes para los hongos que se utilizan en actividades tan diversas como la industria y el desarrollo de la ciencia, entre las cuales resaltan las de Ross (1979), Ainsworth, Deacon y Webster (1980), Alexopoulos y Mims

(1985), Herrera y Hanlim (1987), y Herrera y Ulloa (1990). En este trabajo se utiliza la clasificación de Teófilo Herrera y Miguel Ulloa que se muestra en la figura 14. En esta clasificación, las levaduras *K. lactis* se localiza en la división Eumycota, clase Ascomycetes, subclase Hemiascomycetidae, orden Endomycetales, familia Saccharomycetaceae.

Dentro de la Subdivisión Ascomycotina se localizan los hongos que forman esporangios especiales llamados ascas o ascos, en cuyo interior se desarrollan las ascosporas. Este grupo se subdivide a su vez en 4 clases diferentes, donde resaltan los Hemiascomycetes, también llamados Protoascomycetes, que se caracterizan por su morfología y estructura relativamente sencilla, donde es común que el micelio (conjunto de hifas que constituyen el talo del hongo) falte por completo, esté muy poco desarrollado o sea más bien una estructura pseudomiceliar. Los Hemiascomycetes incluyen a las levaduras típicas, ciertas formas con escaso micelio parecidas a levaduras y algunos hongos parásitos de las hojas de varias plantas fanerógamas (Herrera y Ulloa, 1998).

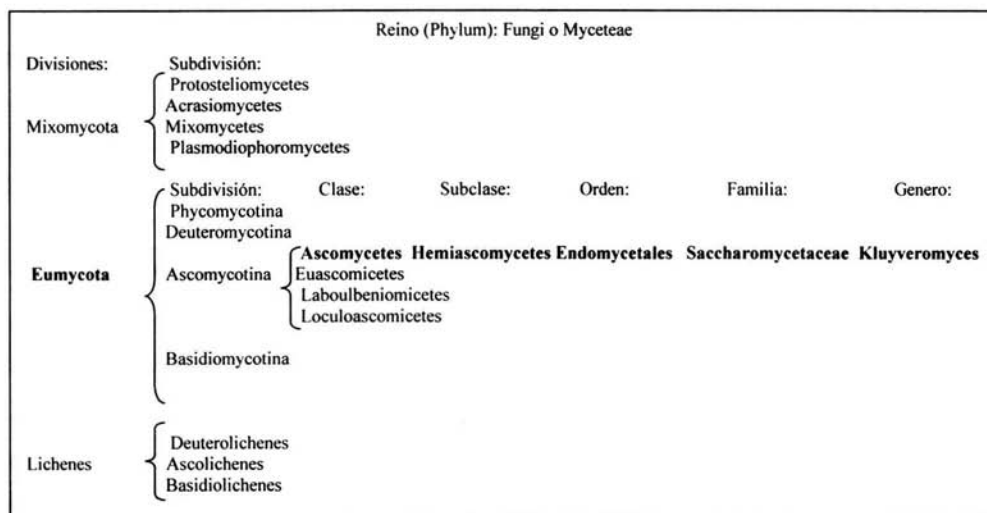


Figura 14. La clasificación para el Reino Fungi, propuesta por Herrera y Ulloa en 1990. Las levaduras *K. lactis*, al igual que *S. cerevisiae* y *Sch. pombe*, se localizan dentro de la misma familia: Saccharomycetaceae. Esquema modificado de Herrera y Ulloa 1998.

4.2 El ciclo de vida de *K. lactis*

Los hongos Endomycetales se reconocen porque la formación de las ascas se inicia en los cigotos, que a su vez provienen de la fecundación de dos células o por partenogénesis de

una sola. Los talos (soma o cuerpo fúngico) de las levaduras son unicelulares. La fecundación se realiza entre dos gametangios (estructura sexual que contiene las gametas), dos ascosporas o dos células vegetativas. Después de la plasmogamia (fusión de citoplasmas) sigue la cariogamia (fusión nuclear) sin que haya formación de una célula dicarionte. El cigoto puede seguir dos caminos, o se convierte directamente en un asca con ascosporas, o por gemación origina células diploides y éstas a su vez generan a las ascas. En particular, las levaduras del género *Kluyveromyces* (donde se incluyen las especies *K. lactis*, *K. africanus*, *K. fragilis* y *K. polysporus*) forman ascas reniformes o crescentiformes (en forma de luna creciente), pudiendo ser esféricas u ovales en algunos casos.

Las levaduras *S. cerevisiae* y *K. lactis* pueden crecer como células haploides, dividiéndose por gemación, o como células diploides, que se originan a partir de dos células haploides con factores sexuales opuestos, que se conjugan formando un cigoto, el cual da lugar a una clona diploide. Esta clona se puede dividir mitóticamente y posteriormente llevar a cabo un proceso de meiosis para originar una tétrada de ascosporas diploides. El ciclo de vida para *S. cerevisiae*, que pertenece a la misma familia donde se localiza *K. lactis*, se ilustra en la figura 15.

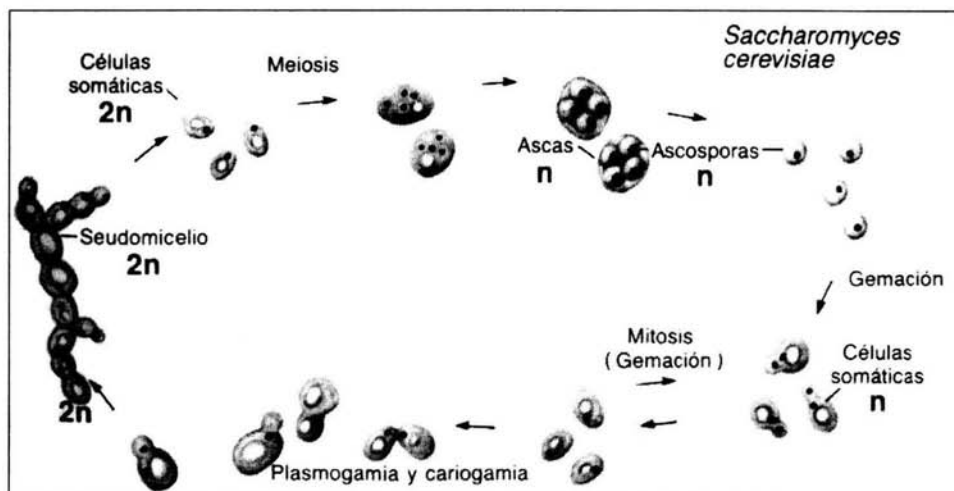


Figura 15. El ciclo de vida de *S. cerevisiae*, que es una levadura muy emparentada con *K. lactis*. En ambos ciclos de vida se alternan fase haploides y diploides. La ploidía de cada uno de los estadios se indica con n o $2n$. Esquema modificado de Herrera y Ulloa, 1998.

4.3 La importancia de las levaduras en la investigación biológica

Se reconoce que las levaduras son microorganismos eucariontes ideales para estudios biológicos. Aunque tienen una complejidad genética mayor que las bacterias, muestran muchas más ventajas técnicas, lo que permite un progreso rápido. Algunas de las ventajas que las hacen de gran interés, son su tasa de crecimiento rápida, un ciclo de vida que incluye gemación (lo cual resulta en células dispersas), la facilidad con la que se aíslan las células por filtración o centrifugación a bajas velocidades, el bajo costo de los cultivos, la resistencia a las contaminaciones, la facilidad para aislar mutantes y su sistema genético bien conocido y un sistema de transformación versátil.

El desarrollo de técnicas microbiológicas de recombinación genética ha hecho de las levaduras entidades muy accesibles para la clonación de genes. Se han podido identificar genes estructurales por complementación, a partir de bancos de genes en plásmidos. Estos plásmidos se han introducido en la levadura como moléculas capaces de replicarse con autonomía o por integración dentro del genoma. En las levaduras se ha podido introducir también secuencias específicas, dirigidas a localizaciones puntuales en el genoma, y dadas las altas tasas de recombinación homóloga dentro del genoma fúngico, se han reemplazado secuencias particulares del ADN genómico. También se han reemplazado o interrumpido los genes silvestres normales originando fenotipos que pueden ser estudiados *in vivo*, permitiendo conocer más sobre la función de las proteínas. En la misma forma, el DNA mitocondrial se ha alterado con técnicas bien establecidas en las levaduras como la biobalística, lo cual ha permitido un análisis detallado de este organelo celular (Miranda, 1993).

II. OBJETIVOS

Con base en los antecedentes de la H^+ -ATPasa localizada de la membrana plasmática de *Kluyveromyces lactis* y los experimentos de Susman y Slayman con el inhibidor DCCD en la ATPasa de *N. crassa*, se plantean los siguientes objetivos:

Objetivo general

- Caracterizar el efecto de la carbodiimida fluorescente NCD-4 sobre la bomba de protones (H^+ -ATPasa) de la membrana plasmática del hongo levaduriforme *Kluyveromyces lactis*, de la cepa WM27.

Objetivos particulares

- Determinar las condiciones óptimas de pH, temperatura y cationes monovalentes (sales) para caracterizar la inactivación de la H^+ -ATPasa por el NCD-4.
- Caracterizar el efecto de los ligandos fisiológicos como el Mg^{2+} , el ADP y el complejo MgADP sobre la inactivación de la H^+ -ATPasa por el NCD-4.
- Identificar el o los aminoácidos de la H^+ -ATPasa que reaccionan con el inhibidor NCD-4.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1 La estrategia metodológica

La estrategia que se siguió para realizar este trabajo se ilustra en el diagrama de flujo de la figura 16, en donde se señalan los pasos seguidos en el método.

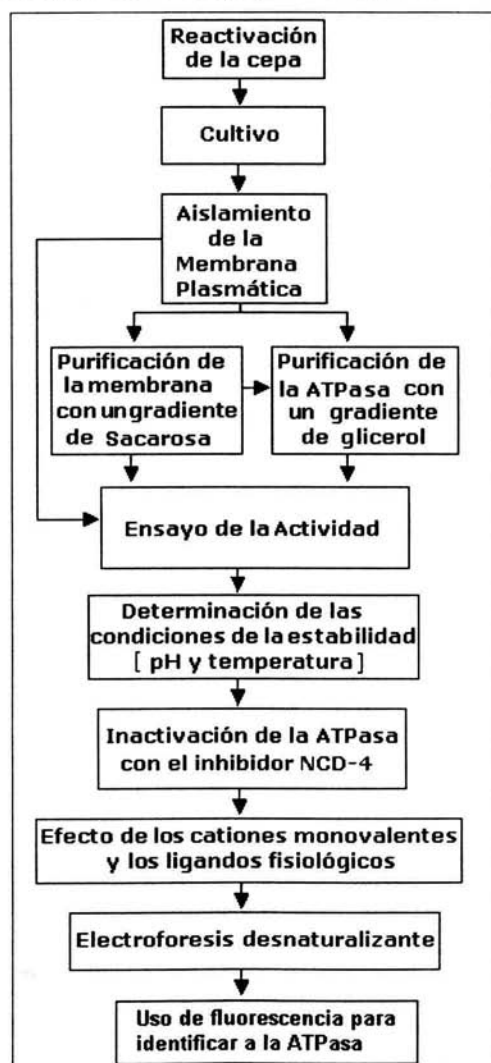


Figura 16. El diagrama de flujo seguido para el desarrollo de la sección de los métodos. Las características de cada paso se detallan más adelante.

2 La reactivación de las cepas de *K. lactis*

2.1 La preparación de los medios líquidos de inoculación y de cultivo

Las levaduras *Kluyveromyces lactis* de la cepa WM27, se cultivaron en un medio rico, en fase líquida, que es útil para la inoculación primaria de las levaduras y para su cultivo posterior. A este medio se le llama YPD por sus siglas en inglés (yeast extract, peptone, dextrose). En la preparación de los medios de inoculación (100 ml) y de cultivo (1000 ml) se añadieron los siguientes nutrientes a las concentraciones indicadas (p/v):

Glucosa	2 %.
Extracto de levadura	1 % .
Bactopeptona	1 %.

Se disolvieron los nutrientes en el volumen correspondiente de agua bidestilada y se agitaron vigorosamente, para después esterilizarlos durante 20 minutos a 120° C en una autoclave. Posteriormente se enfriaron a temperatura ambiente hasta la inoculación de las levaduras.

2.2 La reactivación de la cepa e inoculación del medio YPD

Para conseguir la reactivación de *K. lactis*, se tomaron 500 µl de un stock de células almacenadas en glicerol a - 70° C, y se sembraron en 100 ml del medio de inoculación YPD, el cual se incubó durante 24 horas a 30° C en un agitador orbital con agitación constante a 200 revoluciones por minuto (rpm).

2.3 El cultivo de las células

Al término de las 24 horas de incubación se determinó la absorbencia a 660 nm de una dilución 1:10 del medio de inoculación. Posteriormente se sembraron 20 unidades de absorbencia en cada litro del medio de cultivo, y se colocó cada matraz en el agitador orbital a 30° C durante 22-24 horas, con agitación constante a 200 rpm. En este tiempo las células alcanzaron la fase estacionaria de la curva de crecimiento, por lo que los cultivos se retiraron del agitador orbital y se dio comienzo a la cosecha de las levaduras.

2.4 La cosecha de las levaduras

Para sedimentar a las levaduras y separarlas del medio líquido, se centrifugaron los cultivos a 5,000 rpm durante 6 minutos (aproximadamente 4,620 g), manteniendo la temperatura de la centrifugación a 4° C. Cada pastilla se lavó con agua bidestilada y se volvió a centrifugar otros 6 minutos a 5,000 g. Todas las pastillas se reunieron en un solo paquete y se determinó el peso húmedo de las levaduras. El rendimiento promedio de los cultivos fue de 11 gramos de levadura por litro.

3 La obtención de la membrana plasmática con perlas de vidrio

Para romper la pared celular de las levaduras, se resuspendieron las células en el amortiguador Tris-HCl 50mM, pH 7.2 (20 ml de amortiguador / 4 gramos de células y 7 μ l de β -mercaptoetanol). La suspensión se incubó durante 10 minutos a 30° C en el baño térmico y se centrifugó a 5,000 g durante 5 minutos.

Por cada 4 gramos de células se añadieron 20 ml de una solución de sacarosa 0.33 M, EGTA 1 mM pH 7.2 y se resuspendió el paquete. La suspensión de células se transfirió a una cámara de homogenización a 4° C y se añadió un volumen de perlas de vidrio (de 0.45 – 0.5 mm de diámetro). Segundos antes de comenzar el fraccionamiento mecánico de las células en una licuadora especializada (Bead-Beater), se agregó 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO). Las células se fragmentaron con pulsos de 1 minuto, alternando con descansos de 60 segundos, hasta completar 10 minutos de tratamiento. La suspensión celular resultante se separó por decantación de las perlas de vidrio y una pequeña muestra se llevó al microscopio invertido (Nikon, DIaphot 300) para verificar la ruptura de las células. La suspensión de células rotas se centrifugó a 5,000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Al término de esta centrifugación se rescató el sobrenadante y se centrifugó por 30 minutos a 17,200 g a 4 °C para separar la fracción mitocondrial. El sobrenadante obtenido se centrifugó de nueva cuenta, ahora por 45 minutos a 38,720 g a 4 °C, para obtener un paquete de membranas plasmáticas que se resuspendió en un volumen mínimo del amortiguador Tris-EGTA 1mM pH 7.2.

Se determinó la concentración de proteína y se cuantificó la actividad de hidrólisis del ATP producido por la H⁺-ATPasa (ambos métodos se describen adelante).

4 La purificación de la H⁺-ATPasa de *K. lactis*

4.1 La purificación de la ATPasa con un gradiente zonal de sacarosa

Con el fin de obtener una preparación más pura de la membrana plasmática, la preparación anterior se sometió a una centrifugación zonal en un gradiente discontinuo de densidad de sacarosa. Este tipo de metodología se basa en el comportamiento de las partículas en un campo gravitacional que se genera al aplicar una fuerza centrífuga y permite separar los componentes de una muestra (Alberts, et al, 1994; Darnell et al, 1990).

Para realizar la purificación de la membrana plasmática con el gradiente de sacarosa se prepararon 100 ml de las siguientes soluciones:

Solución A: sacarosa 52% (p/v), pH 7.2:

Sacarosa	52 %.
Trizma base	10 mM
EDTA	1 mM
EGTA	1mM

Solución B: sacarosa 74% (p/v), pH 7.2:

Sacarosa	74 %.
Trizma base	10 mM.
EDTA	1 mM.
EGTA	1 mM.

De esta forma, la membrana plasmática cruda obtenida luego de la ruptura de las células con las perlas de vidrio, se diluyó y se llevó a una concentración final de 5 µg/µl de proteína con la solución A. Simultáneamente se preparó el gradiente de sacarosa con 1.5 y 4 ml de las soluciones A y B respectivamente, quedando la solución más concentrada en el fondo del tubo.

La suspensión de membranas plasmáticas se colocó encima de la solución A y se centrifugó a 40,000 rpm, durante 4 horas a 4 °C en el rotor 65 Ti. Al término de este lapso se colectó la banda que se forma entre las dos soluciones de sacarosa, que corresponde a la membrana plasmática; esta se diluyó con la solución EGTA- Tris pH 7.2 y se centrifugó una hora a

40,000 rpm en el mismo rotor. La pastilla resultante se resuspendió en un volumen mínimo de Tris-EGTA 1mM pH 7.2 con glicerol al 10% (v/v).

4.2 La purificación de la ATPasa con un gradiente zonal de glicerol

Con el fin de purificar a la H^+ -ATPasa, las proteínas de la membrana plasmática cruda o purificada con el gradiente de sacarosa se solubilizaron con desoxicolato (DOC) y Zwittergent 3-14 y la H^+ -ATPasa se aplicó a un gradiente de glicerol. Para ésto, se siguió en lo general el método propuesto por Bowman, Blasco y Slayman en 1981 (que se esquematiza en la figura 17).

Para purificar la H^+ -ATPasa, se prepararon las siguientes soluciones:

Buffer A (3 x):

KCl	0.6 M.
EDTA	6 mM.
Tris-KOH pH 7.5	75 mM.

Buffer B (1 x):

KCl	0.3 M.
Glicerol	45 %.
EDTA	2 mM.
Tris-KOH pH 7.5	25 mM.

Para formar el gradiente de glicerol se prepararon soluciones de glicerol al 50, 55, 60 y 65 % (v/v), el gradiente se formó colocando 2, 4, 4 y 6 ml de cada uno de las soluciones de glicerol, quedando la más concentrada en el fondo del tubo.

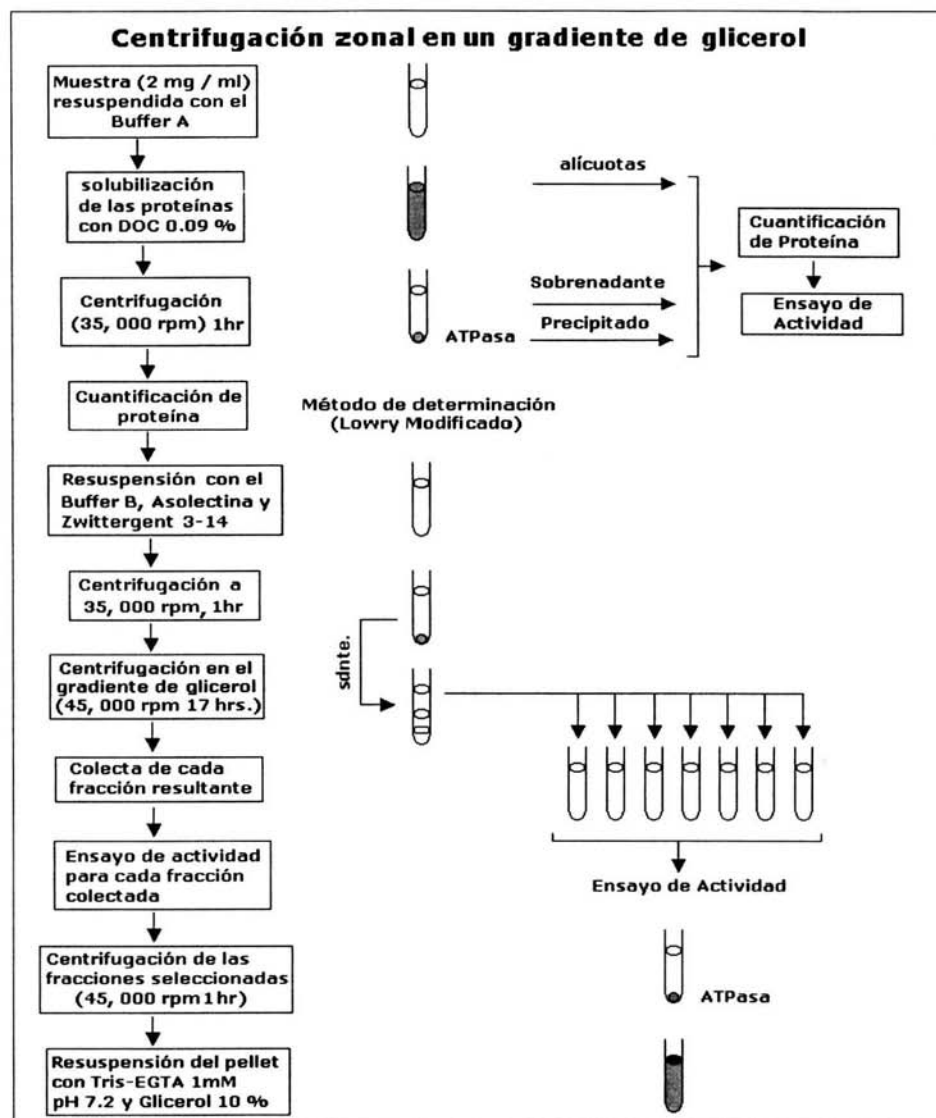


Figura 17. Diagrama de flujo del protocolo para la purificación de la ATPasa con un gradiente de densidad zonal utilizando soluciones de glicerol. Las muestras llevadas a 2 mg /ml con el buffer A, pueden provenir tanto de la fracción membranal cruda (a partir de la extracción de la membrana plasmática con las perlas de vidrio) como de la H⁺-ATPasa semipurificada con el gradiente de sacarosa.

La muestra de la membrana plasmática (cruda o purificada con el gradiente de sacarosa), se llevó a una concentración de 2 mg/ml (0.02 % p/v) con el amortiguador Tris-EGTA 1 mM pH 7.2 y el buffer A. Se añadió lentamente el detergente desoxicolato hasta conseguir la concentración de 0.09% (p/v) y se incubó durante 10 minutos en hielo con agitación constante. Se centrifugó la preparación a 175,000 g a 4 °C durante 1 hora. Al término de la centrifugación, se determinó el volumen del sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 500 µl del buffer B y se almacenaron en un solo lote a -70° C. Se determinó la concentración de la proteína del sobrenadante y de las pastillas resuspendidas con el buffer B. Las pastillas resuspendidas se llevaron a una concentración de proteína de 5 mg/ml con el buffer B y se añadió la asolectina a una relación final de 0.85% asolectina /proteína (p/p). Posteriormente, se aplicó gota a gota el detergente Zwittergent 3-14, hasta conseguir una relación de 0.85 mg del detergente por miligramo de proteína, y se mantuvo una agitación suave durante 10 minutos a 4 °C, después de los cuales la preparación se centrifugó durante una hora a 175,000g. Se rescataron los sobrenadantes e inmediatamente se aplicaron al gradiente de glicerol.

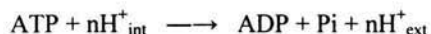
Una vez montados los gradientes se centrifugaron las muestras durante 17 horas a 225,000 g a 4 °C. Al finalizar la corrida, cada tubo fue fraccionado por aspiración lenta (de arriba abajo) en volúmenes de 800 µl. A cada una de estas fracciones se les determinó la actividad de hidrólisis de ATP y se seleccionaron los tubos con mayor actividad; se reunieron las fracciones en un solo lote, se diluyó éste 1/5 con EGTA-Tris pH 7.2 y se centrifugó a 225,000 g durante 4 horas a 4 °C. Las pastillas formadas se resuspendieron en Tris-EGTA 1mM pH 7.2 y glicerol 10% y se almacenaron a - 70° C hasta la determinación de proteína y el ensayo de actividad.

4.3 Determinación de proteína

La concentración de proteína se determinó utilizando el método de Lowry y colaboradores, modificado por Bensadoun y Weinstein en 1976. Se utilizaron estándares de albúmina de suero bovino (BSA) comprados a Sigma Chemical Company.

5 Determinación de la actividad de la H⁺-ATPasa

La ATPasa de protones de la membrana plasmática de las levaduras cataliza la siguiente reacción:



en donde el valor de “n” representa la estequiometría de los protones transportados desde el interior de las células (int) hacia el periplasma o exterior (ext) celular, por cada molécula de ATP utilizada (H⁺ /ATP).

Por tanto, se puede determinar la actividad enzimática de la ATPasa por medio de la cuantificación del fosfato inorgánico (Pi) que se libera, acoplado el ensayo de actividad al método colorimétrico para el Pi, propuesto originalmente por Fiske y Subbarow en 1925 (ver la sección 5.3 de la metodología).

5.1 Ensayo de actividad de la ATPasa

El esquema de la figura 18 muestra la estrategia que se siguió para determinar la actividad de la ATPasa. La reacción de hidrólisis del ATP se inició al diluir 25 veces una alícuota de 10 µl de una suspensión de la ATPasa o de la membrana plasmática del medio de incubación, en 250 µl de una solución de ensayo de la ATPasa, que contiene un sistema regenerador de ATP. La mezcla se incubó a 30° C por 30-120 minutos y la reacción de la ATPasa se detuvo por adición de 50 µl de ácido tricloro acético al 30% (concentración final 7%, p/v) y los tubos se colocaron en hielo para evitar la hidrólisis del ATP.

Las dos soluciones que se utilizaron en los ensayos de actividad se describen a continuación:

- a) Medio de incubación. Una solución acuosa de MES-KOH 50 mM, glicerol al 15% (v/v) con el pH ajustado a 6.0. El volumen final de esta solución fue de 130 µl y la concentración de proteína varió dependiendo de la preparación, de 0.6 a 3.4 µg / µl.
- b) Solución de ensayo de la ATPasa. Esta solución regeneradora de ATP se preparó siguiendo la siguiente receta: Na₂ATP 5 mM, MgSO₄ 10 mM, MES 10 mM, azida de sodio 5 mM y fosfoenolpiruvato 5 mM. El pH final de la mezcla se ajustó a 6.0 con hidróxido de potasio (KOH).

Si bien el medio de ensayo se utilizaba fresco, podía también almacenarse a -4°C en alícuotas de 100 o 200 ml, que se iban descongelando conforme se realizaban los ensayos de actividad. Al momento de cada ensayo se añadió la enzima piruvato cinasa comercial de músculo de conejo ($5\mu\text{l/ml}$ de reacción) al medio de incubación para completar el sistema regenerador del ATP, pues los ensayos se realizaron siempre en tiempos largos, de 30 o hasta 120 minutos.

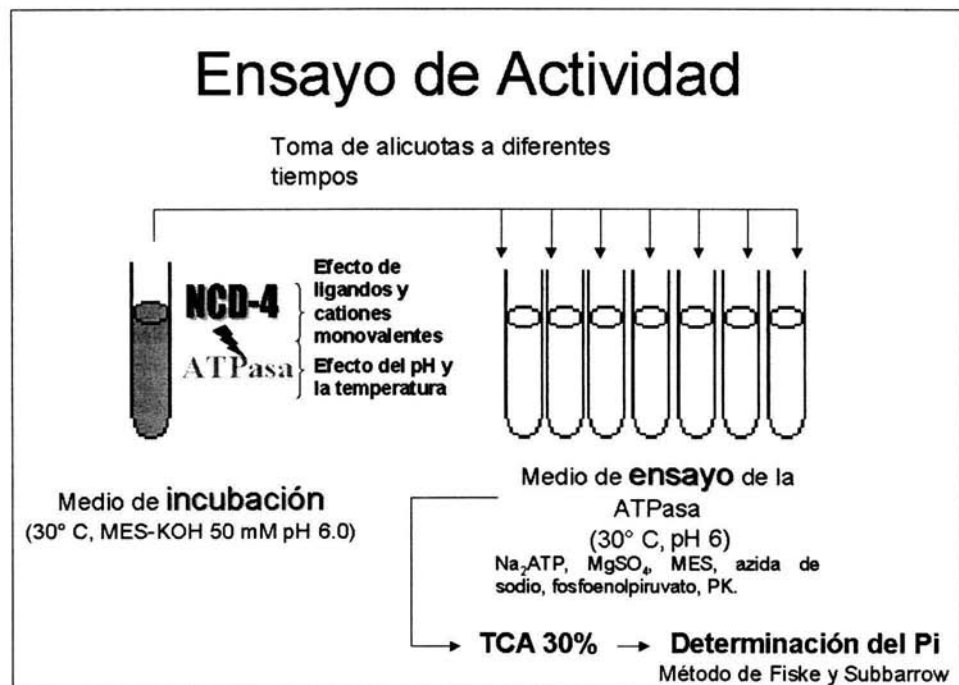


Figura 18. El ensayo general para determinar la estabilidad y la actividad de la H^+ -ATPasa de *K. lactis*. Tanto el medio de incubación como el de ensayo se mantuvieron en el baño térmico a 30°C .

5.2 El método colorimétrico para la determinación de Pi

El fosfato inorgánico (Pi) liberado durante el ensayo de actividad se determinó por el método de Fiske y Subbarrow (1925), que se basa en la formación de un complejo de molibdato-fosfato (de color amarillo) que al reducirse con el sulfato de *p*-metil amino fenol (ELON) produce una coloración azul. A cada uno de los tubos donde se detuvo la reacción de la ATPasa se añadió 1.7 ml de agua bidestilada, 250 μl de una solución de molibdato-ácido sulfúrico y 250 μl de sulfato de ELON. La mezcla se dejó reposar por 30 minutos a

temperatura ambiente, al término de los cuales se leyó la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm. Las soluciones para la cuantificación del Pi liberado se prepararon en la siguiente forma: molibdato-ácido sulfúrico (aforar a un l litro): molibdato de amonio 50 g, H₂SO₄ 111 ml, ddH₂O: 800 ml. Solución de ELON (aforar a 1 litro): sulfato de ELON 10 g, bisulfito de sodio 30 g.

6 Estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas

Con el fin de caracterizar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la enzima, se incubó a la preparación de la ATPasa en el medio de incubación a diferentes temperaturas, y a los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 10 µl que se mezclaron con 250 µl del medio de ensayo de la ATPasa a 30° C para determinar la actividad de la enzima. Las temperaturas que se ensayaron fueron: 20, 25, 30, 35 y 40° C.

7 Estabilidad de la enzima a diferentes pHs

Para determinar el efecto de diferentes condiciones de acidez y basicidad sobre la estabilidad de la ATPasa de *K. lactis*, se conservó la estructura general del ensayo. La temperatura se mantuvo fija a 30° C y la única modificación fue el amortiguador del medio de incubación de la enzima, que se ajustó a diferentes valores de pH. Para estos experimentos, se preparó una mezcla de MES-HEPES que se ajustó con KOH a valores de pH de 5, 6, 7 y 8. La concentración final de cada amortiguador en el ensayo fue de 25 mM.

8 La inhibición de la ATPasa con NCD-4

8.1 La preparación del NCD-4

El NCD-4 es un carbodiimida hidrofóbica que se debe disolver en solventes no polares como el dimetil sulfóxido (DMSO) o el etanol, por lo que se preparó un stock del inhibidor en DMSO a una concentración de 50 µM. Esta solución se colocó en un recipiente de vidrio

(para evitar que la carbodiimida se adsorbiera a las paredes de recipientes de plástico) y se almacenó a -70°C . En estas condiciones el compuesto fue estable durante varias semanas. A partir del stock de NCD-4-DMSO $50\ \mu\text{M}$, se prepararon soluciones de NCD-4 $10\ \mu\text{M}$ en DMSO o etanol, que se utilizaron en los experimentos de inhibición de la ATPasa.

8.2 La inactivación de la ATPasa por el NCD-4

Para caracterizar la inactivación de la H^{+} -ATPasa por el NCD-4, se incubó a la enzima en el medio de incubación (MES-KOH $50\ \text{mM}$, pH 6, glicerol 15%) a 30°C , en un volumen final de $130\ \mu\text{l}$, en presencia de diferentes concentraciones de NCD-4/DMSO ó NCD-4/Etanol. A diferentes tiempos se tomaron alícuotas de $10\ \mu\text{l}$ del medio de reacción y se mezclaron en $250\ \mu\text{l}$ de la solución de ensayo de la ATPasa. Los tubos se mantuvieron a 30°C y sesenta minutos después de iniciada la reacción de hidrólisis del ATP, ésta se detuvo con TCA al 30 % a 4°C .

8.3 La inactivación de la H^{+} -ATPasa por el NCD-4 vs el DCCD

Con el fin de averiguar si ambas carbodiimidias compiten por uno o más grupos carboxilo de la cATPasa de *K. lactis*, se realizaron ensayos de actividad en los que el tiempo cero del curso temporal estuvo marcado por la adición $200\ \mu\text{M}$ del NCD-4, y a los 15 minutos se añadieron $200\ \mu\text{M}$ de DCCD. Se realizaron ensayos complementarios invirtiendo el orden en que se añadieron los dos reactivos, primero el DCCD y luego el NCD-4.

9 La determinación del efecto de los cationes mono y divalentes sobre la inactivación de la H^{+} -ATPasa por el NCD-4

9.1 Inactivación de la H^{+} -ATPasa en presencia de ligandos fisiológicos

Los ligandos fisiológicos que se probaron en la inactivación de la H^{+} -ATPasa por el NCD-4 fueron el Mg^{2+} , el ADP y el Mg-ADP. Todos ellos se agregaron al medio de incubación antes de añadir el NCD-4, y el tiempo cero de cada curso temporal estuvo marcado por la adición del inhibidor.

9.2 El cálculo de las concentraciones de cationes en las soluciones

Para determinar las concentraciones totales de los diferentes ligandos que hay que utilizar para conseguir las concentraciones de cationes libres en las soluciones de ensayo, se utilizó el programa Chelator. En la misma forma, este programa calcula la fuerza iónica que aporta el amortiguador.

10 La electroforesis en condiciones desnaturalizantes

La composición de proteínas de cada una de las preparaciones se estudió por medio de la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, con geles de acrilamida y bisacrilamida. La electroforesis se realizó de acuerdo con el método de Laemmli (1970). El gel separador consistió de acrilamida al 10%, bisacrilamida al 0.27%, tris/HCl 0.5 M, pH 8.8 y SDS al 0.1%. El gel concentrador contenía acrilamida al 4%, bisacrilamida al 0.1%, tris/HCl 0.125 M pH 6.8 y SDS al 0.1%. La polimerización se inició con la adición de persulfato de amonio al 0.067 % y TEMED al 0.33 %. El amortiguador de corrida contenía glicina 0.2 M, tris 25 mM, SDS al 0.1 % y tioglicolato 1 mM. Los geles se corrieron a 100 V durante 3 horas y se tiñeron con azul de Coomassie al 0.25%, metanol al 40% y ácido acético glacial al 7%. La destinción de los geles se realizó con una solución de metanol al 40% y ácido acético glacial al 7%. Los geles se deshidrataron por 3 o cuatro días envueltos en una membrana de celofán. El peso molecular aproximado de la proteína se obtuvo al interpolar la movilidad electroforética de la ATPasa con la de los estándares de peso molecular.

10.1 El marcaje específico de la H⁺-ATPasa por el NCD-4

Para confirmar el marcaje específico del NCD-4 sobre la H⁺-ATPasa, se incubó a la membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa o a la H⁺-ATPasa purificada con el gradiente de glicerol con 200 μM del NCD-4 durante 45 minutos a 30° C y pH 6. Al término de este tiempo la proteína se diluyó 25 veces en una solución acuosa de MES-KOH 50 mM pH 6, glicerol al 10% (v/v) y se centrifugó la suspensión por 30 minutos a 33, 000 rpm en el rotor 65 Ti a 4 °C. El sobrenadante se desechó por decantación y la pastilla se

resuspendió en 50 μl de SDS al 0.1% y 20 μl de la mezcla de solubilización (que contiene glicerol al 25%, SDS al 5%, azul de bromofenol al 0.02%, β -mercaptoetanol 14 M y Tris-HCl 0.125 M a pH 6.8). La electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realizó de acuerdo con el método de Laemmli. La fluorescencia de la H^+ -ATPasa marcada con el NCD-4 se detectó con luz ultravioleta y se fotografió el gel en un trans-iluminador convencional.

10.2 El marcaje de la H^+ -ATPasa por el NCD-4 vs el DCCD

Para confirmar que el NCD-4 y el DCCD actúan en sitios distintos sobre la ATPasa de protones, se incubó la membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa (40 mg) con 200 μM de NCD-4, y a los 15 minutos de haber iniciado la reacción se añadieron 200 μM de DCCD. En otro curso temporal se añadieron las mismas concentraciones de las carbodiimidias pero se invirtió el orden en que fueron añadidas. Una vez que transcurrieron 50 minutos de incubación a 30° C y pH 6, se centrifugaron a 33, 000 rpm durante 30 minutos en el rotor 65 Ti a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 30 μl de SDS 0.1% y enseguida se añadieron 20 μl de la mezcla de solubilización y se corrieron las muestras siguiendo el protocolo de Laemmli descrito arriba (a 100 V durante 1 hora) para después ser las vistas las bandas fluorescentes en el transiluminador de ultravioleta.

IV. RESULTADOS

El objetivo principal de este trabajo fue caracterizar la inhibición de la bomba de protones de la membrana plasmática de *Kluyveromyces lactis*, por la carbodiimida NCD-4 (N-ciclohexil-N'-(4-dimetilamino- α -naftil)carbodiimida), que se une de manera covalente a los grupos carboxilo de la proteína. Se ensayaron diferentes condiciones de temperatura, sales, ligandos fisiológicos y valores de pH, con el fin de determinar si existía uno o más grupos carboxilo involucrados en el funcionamiento catalítico de la enzima. Para cumplir con los objetivos planteados, en el primer paso se llevó a la membrana plasmática y a la H⁺-ATPasa a una condición parcialmente purificada, utilizando las técnicas de centrifugación en gradientes de densidad zonal formados con disoluciones de sacarosa y glicerol.

1 La purificación de la membrana plasmática de *K. lactis*

1.1 La purificación de la membrana plasmática en un gradiente de sacarosa

La preparación cruda de la membrana plasmática que se sometió al gradiente de sacarosa se obtuvo por medio de una centrifugación diferencial, luego de la ruptura de las levaduras con las perlas de vidrio. Como se observa en la tabla 1, la purificación de la membrana plasmática partió de 23.8 miligramos de proteína total que exponían una actividad específica de 1.6 micromolas de fosfato inorgánico producido por miligramo de proteína por minuto.

Tabla 1. Valores de purificación de la H⁺-ATPasa en el gradiente de sacarosa.

	Volumen (μ l)	Proteína (mg/ml)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (μ molPi/ μ gxmin)	Actividad Total (U) (μ molPi/min)	Rendimiento (%)	Factor de Purificación
M. P. Cruda	2,000	11.9	23.8	1.56	37.13	100	1
M. P. Sacarosa	700	8.97	6.27	3.57	22.38	60	2.28

La determinación de la proteína se realizó siguiendo el protocolo modificado de Lowry. El rendimiento se calculó a partir de los valores de actividad total antes y después de la purificación con el gradiente de sacarosa. El factor de purificación o número de veces que se consiguió purificar la proteína, se obtuvo a partir de las actividades específicas de cada muestra. M.P. es membrana plasmática.

Al purificar a la membrana plasmática con el gradiente de densidad de sacarosa se consiguió una preparación 2.28 veces más pura que la preparación inicial, se conservó el 26% de la proteína original (se desechó casi un 75% de proteína contaminante) y se obtuvo un incremento de casi tres veces en la actividad específica, con un rendimiento del 60% en la actividad total de la H^+ -ATPasa. Las proteínas contaminantes que se separaron pueden ser proteínas estructurales de la membrana plasmática o polipéptidos externos a la fracción membranal, que pueden provenir de las fracciones mitocondriales, microsomales (fracción formada principalmente por vesículas del aparato de Golgi y/o del retículo endoplásmico) y solubles que sedimentaron de manera conjunta con la fracción de la membrana plasmática durante la centrifugación diferencial (Alberts, et al, 1994; Darnell et al, 1990).

Los valores experimentales de la actividad específica de las preparaciones cruda y de la membrana plasmática purificada fueron similares a los reportados en la literatura (Bowman et al. 1981; Goffeau and Slayman 1981; Sussman and Slayman, 1982; Broker and Slayman, 1983 (a y b); Bowman, 1983; Sychrová and Kotyk, 1985; Koland and Hammes, 1986; Eraso and Gancedo, 1987; Serrano, 1988; Velásquez, 1996; Møller et al, 1996).

2 La purificación de la H^+ -ATPasa

2.1 La purificación de la H^+ -ATPasa con gradientes de sacarosa y glicerol

Con el fin de conseguir preparaciones de la H^+ -ATPasa con mayor grado de pureza, se combinaron las técnicas de centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa y de glicerol en un solo protocolo de purificación. Como se observa en la tabla 2, al término de la purificación de la membrana plasmática con el gradiente de sacarosa se consiguió una preparación 2.58 veces más pura que la inicial. El rendimiento en este primer paso se acercó al 50% de la actividad inicial, lo cual contrasta con la proteína que se recuperó al final del protocolo, que representó apenas el 19.3% de la proteína inicial. La membrana plasmática purificada con sacarosa se sometió a un tratamiento con detergentes y a una centrifugación en un gradiente de glicerol. A las diferentes fracciones que se obtuvieron al término de la centrifugación en el gradiente zonal de glicerol se les determinó la actividad de ATPasa para seleccionar aquellas que exhibían una mayor actividad. Los resultados de estos ensayos de actividad se muestran en la figura 19, junto con los resultados de las membranas crudas, en las cuales solamente se utilizó el gradiente de densidad de glicerol y

no se purificó previamente a la membrana plasmática con el gradiente de sacarosa. Se seleccionaron y mezclaron las fracciones 4 a 12, y se centrifugaron para obtener un paquete que contenía la mayor parte de la H^+ -ATPasa.

Como se puede ver en la tabla 2, al finalizar este paso la actividad específica de la H^+ -ATPasa se incrementó en un orden de magnitud con respecto a la muestra original, lo que corresponde a un factor de purificación de 10.47. Sin embargo, la cantidad de proteína recuperada al finalizar la purificación representó apenas el 0.2% de la proteína total en la membrana plasmática cruda, mientras que el rendimiento en la actividad de la H^+ -ATPasa fue del 5.4%. Estos resultados indican que aún cuando se perdió cerca del 95% de la ATPasa en este protocolo, se consiguió una muestra altamente purificada (como se observa en el gel de poliacrilamida de la figura 20), pues gran parte de la proteína que se removió representa polipéptidos distintos a la H^+ -ATPasa.

Tabla 2. Seguimiento de la H^+ -ATPasa durante la purificación de la membrana plasmática, en su paso a través de los gradientes de densidad de sacarosa y de glicerol.								
	Volumen (μ l)	Proteína (μ g/ μ l)	Proteína Total (μ g)	Actividad Específica (nmolPi/ μ gxmin)	Actividad Total (U) (μ molPi/min)	Rendimiento (%)		Factor de Purificación
						a	b	
M. P. Cruda	6,000	24.4	146.4	1.2	175.68	100	200.59	1
M. P. Sacarosa	730	38.7	28.251	3.1	87.578	49.85	100	2.58
* M. P. DOC	13,500	2.1	28.35	2.57	72.85	41.47	83.18	---
* Sobrenadante	13,500	0.46	6.21	0.097	0.602	0.342	0.68	---
*Precipitado (Zwittergent 3-14)	500	42.59	21.295	3.4	72.403	41.21	82.67	2.58
* Fracciones del Gradiente de Glicerol (Zwittergent 3-14)	7,200	---	---	---	7.85	4.46	8.96	---
ATPasa-Glicerol	250	0.8488	0.2122	12.57	2.667354	1.518	5.35	10.47

El rendimiento se divide en dos columnas, en la columna *a* se toma como referencia la actividad total (U) de la membrana plasmática cruda, mientras en la columna *b* el 100 de actividad corresponde a la actividad total de la membrana con el gradiente de sacarosa. Las filas señaladas con un asterisco (*) corresponden a los pasos intermedios que se obtienen durante el método de purificación de la H^+ -ATPasa con el gradiente de glicerol.

Si se hace un balance del rendimiento de la actividad de la H^+ -ATPasa conseguida al final de este protocolo, se encuentran valores entre 1.52 y 5.35%, dependiendo que se tome como referencia a la actividad total de la muestra cruda o de la membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa, respectivamente, lo que indica que el rendimiento de este paso fue muy pobre independientemente de cual haya sido la preparación purificada.

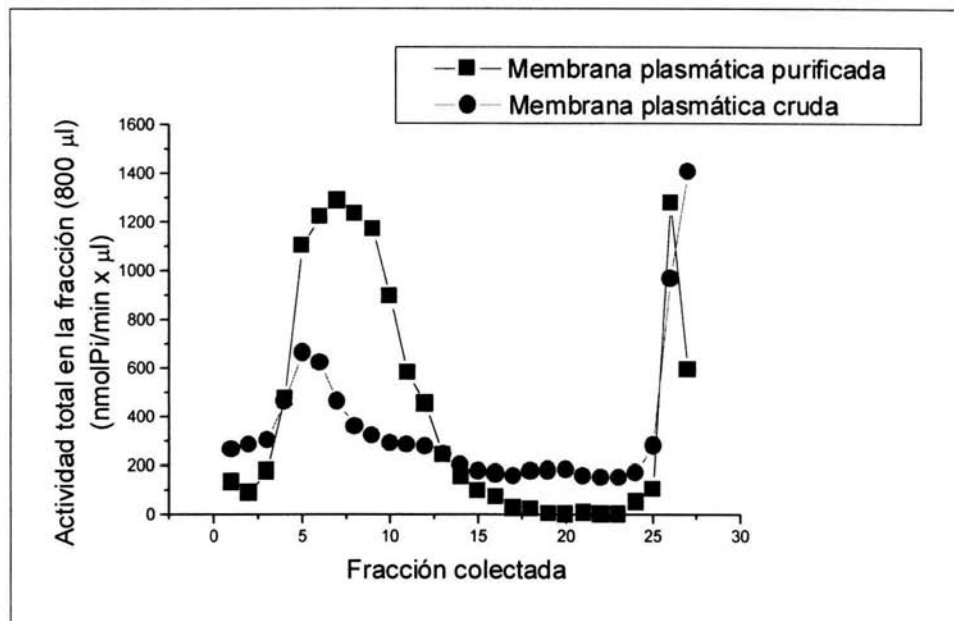


Figura 19. El perfil de la actividad de ATPasa en el gradiente de glicerol. Con trazos redondos se muestra la membrana plasmática cruda y en trazos cuadrados la membrana purificada previamente con el gradiente de sacarosa. De cada una de las preparaciones resultaron más de 30 fracciones diferentes fueron separadas con el colector de fracciones. Para identificar en cuales de ellas se localizaba la actividad de la ATPasa, se tomaron alícuotas de cada una de las fracciones y se realizaron ensayos de actividad acoplados al método colorimétrico de Fiske y Subbarow.

3 La electroforesis de las preparaciones

Para verificar la presencia de la ATPasa de protones en las muestras que se obtuvieron con los dos protocolos, se realizó una electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes; es decir, en presencia del agente reductor β -mercaptoetanol y del detergente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS).

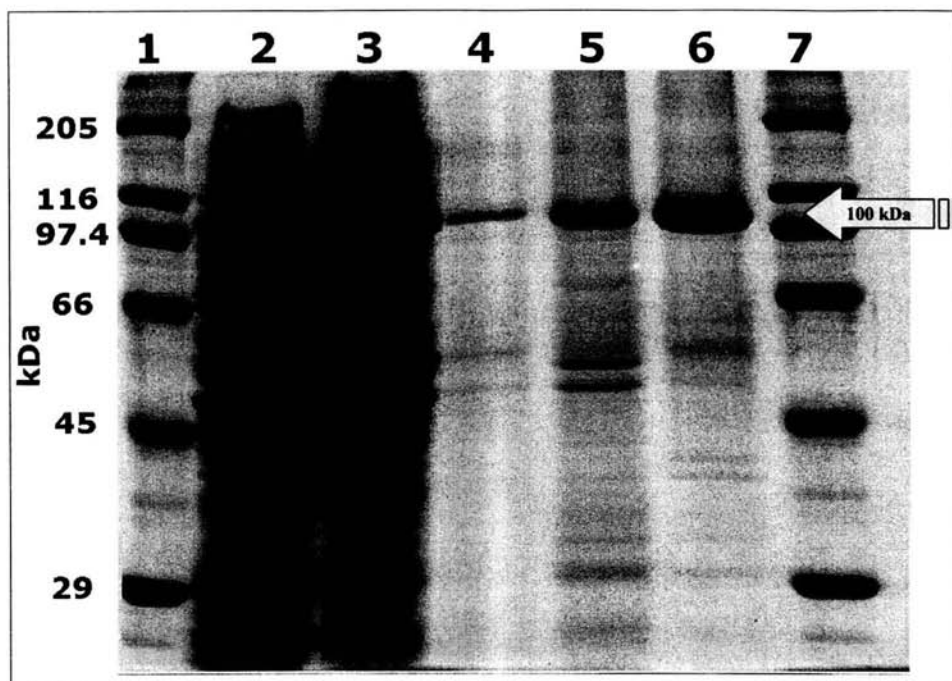


Figura 20. El patrón electroforético de la H^+ -ATPasa en condiciones desnaturalizantes. En los carriles 1 y 7 se muestra el corrimiento de 50 μ g de los marcadores de alto peso molecular (29, 45, 66, 97.4, 116 y 205 kDa). En los carriles 2 y 3 se colocaron 40 μ g de las preparaciones de membrana plasmática cruda de diferentes cultivos. El carril 4 corresponde a 20 μ g de la membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa. En el carril 5 se muestran 15 μ g la ATPasa purificada sólo con el gradiente de glicerol. En el carril 6 aparecen 15 μ g de la preparación de la ATPasa purificada sucesivamente con los gradientes de sacarosa y glicerol.

Como puede verse en el gel de la figura 20, a partir de una preparación de membrana plasmática cruda con un alto grado de contaminación (carriles 2 y 3), con el gradiente de sacarosa se obtienen preparaciones de membrana plasmática purificada en las que la H^+ -ATPasa es la proteína más abundante (carril 4). En la misma forma, la solubilización de las proteínas de la membrana por medio de detergentes, y la purificación con un gradiente de glicerol, conduce a un enriquecimiento de la ATPasa de protones (carriles 5 y 6). Esta preparación se emplea para los experimentos de la modificación química de la H^+ -ATPasa.

4 La estabilidad de la H⁺-ATPasa

Antes de caracterizar la inhibición de la H⁺-ATPasa de *K. lactis* con el inhibidor NCD-4, se estudió el comportamiento de la enzima en el medio de incubación (descrito en la sección 5.2 de los materiales y métodos). Se probaron diferentes condiciones en las que se varió el pH, la temperatura y la presencia de glicerol, etanol o dimetil sulfóxido. En la figura 21 se muestra el efecto del glicerol sobre la estabilidad de la H⁺-ATPasa; en ausencia de glicerol se encontró que ocurría una caída importante en la actividad de la H⁺-ATPasa.

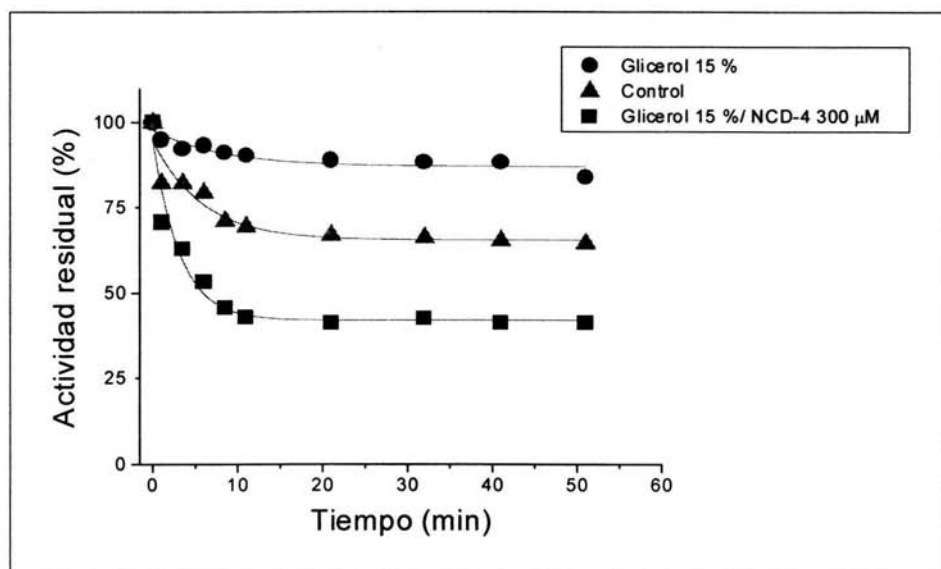


Figura 21. Ensayo de actividad y modificación química de la H⁺-ATPasa en la membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa. La membrana se incubó en presencia de 15% de glicerol (círculos), o en presencia de 15% de glicerol y 300 µM de NCD-4 (cuadros). El control sólo contenía al amortiguador MES-KOH pH 6 a 30 °C.

Esta caída podía deberse a dos factores principales: uno, la inactivación de la enzima provocada por las condiciones de la temperatura, el pH y la fuerza iónica entre otros factores, o a la degradación enzimática provocada por proteasas presentes en la preparación. El segundo factor se descartó, pues las dos preparaciones ensayadas se habían tratado previamente con el inhibidor de proteasas PMSF (1 mM), el cual se añadió durante la ruptura de las células con las perlas de vidrio, y al finalizar cada una de las purificaciones con los gradientes de sacarosa o glicerol.

De esta manera, nos enfocamos a estudiar el efecto del glicerol sobre la estabilidad de la H^+ -ATPasa. Se añadieron diferentes concentraciones de glicerol al medio de incubación (5, 10, 15 y 20%) y se encontró que a concentraciones de glicerol mayores al 10% (v/v) se incrementaba la estabilidad de la enzima incluso a tiempos de entre 40 a 120 minutos (datos no mostrados). Por tanto, se decidió que los ensayos posteriores se realizaran en presencia de glicerol al 15% (ver figura 21).

4.1 El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la H^+ -ATPasa

Una vez que se sabía que la actividad de la ATPasa se mantenía constante a 30° C y pH 6, se decidió estudiar la estabilidad de la enzima a diferentes temperaturas y diferentes condiciones de pH. Las temperaturas que se utilizaron en los ensayos abarcaron el intervalo de 20 a 40° C.

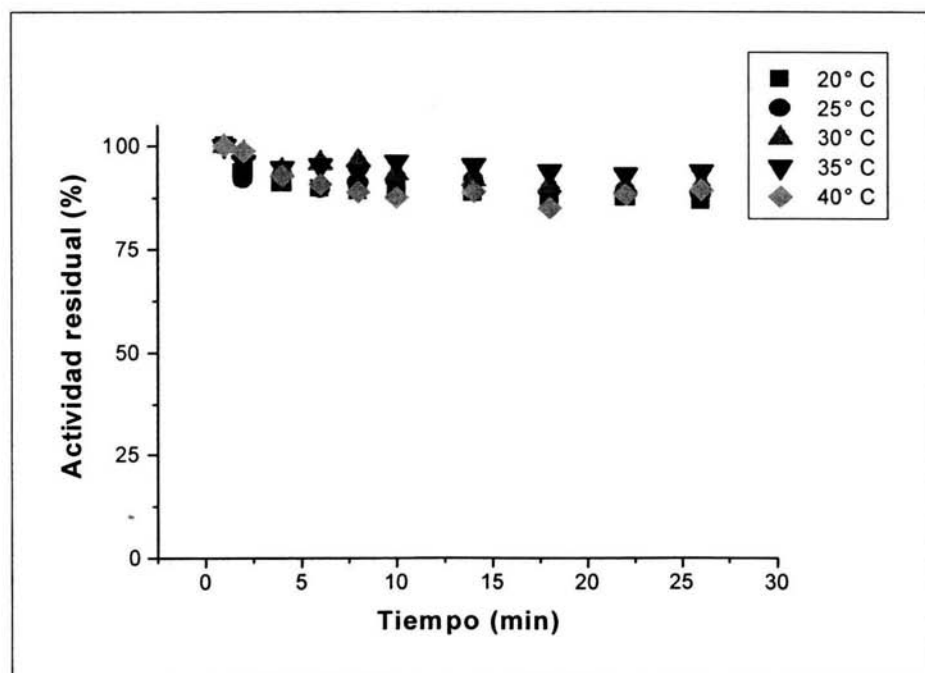


Figura 22. Efecto de la temperatura sobre la actividad de ATPasa de la membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa. Las condiciones del ensayo de estabilidad se realizaron bajo las mismas condiciones que la figura 21, es decir, buffer MES-KOH pH 6, glicerol 15%.

La figura 22 muestra que la actividad de la H^+ -ATPasa permanecía constante en cualquiera de las temperaturas ensayadas, y no se observaron cambios que indicaran alguna alteración de la estabilidad de la enzima.

4.2 El efecto del pH sobre la estabilidad de la H^+ -ATPasa

Los valores de pH que se probaron estuvieron en el intervalo de 5 a 8. Para conseguir este intervalo, se utilizaron soluciones formadas con una mezcla equimolar de 250 mM de los amortiguadores MES y HEPES, y se mantuvo fija la temperatura de los ensayos a 30° C.

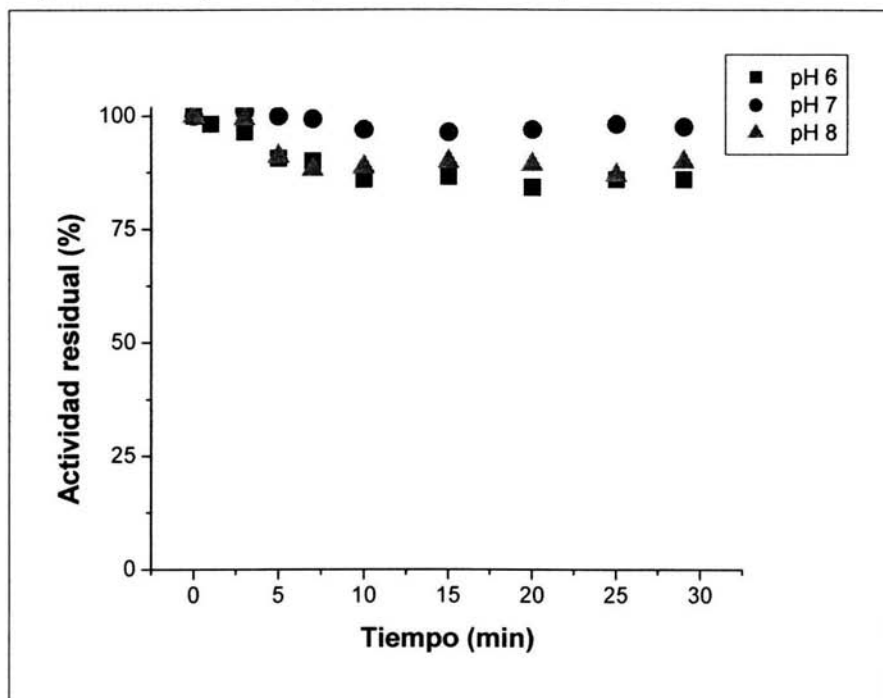


Figura 23. El efecto del pH sobre la actividad de la ATPasa de la membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa. A pH 5 la inactivación de la ATPasa fue inmediata, la actividad se perdió antes del primer minuto de incubación. Estos ensayos fueron realizados a 30° C y en presencia de glicerol 15%.

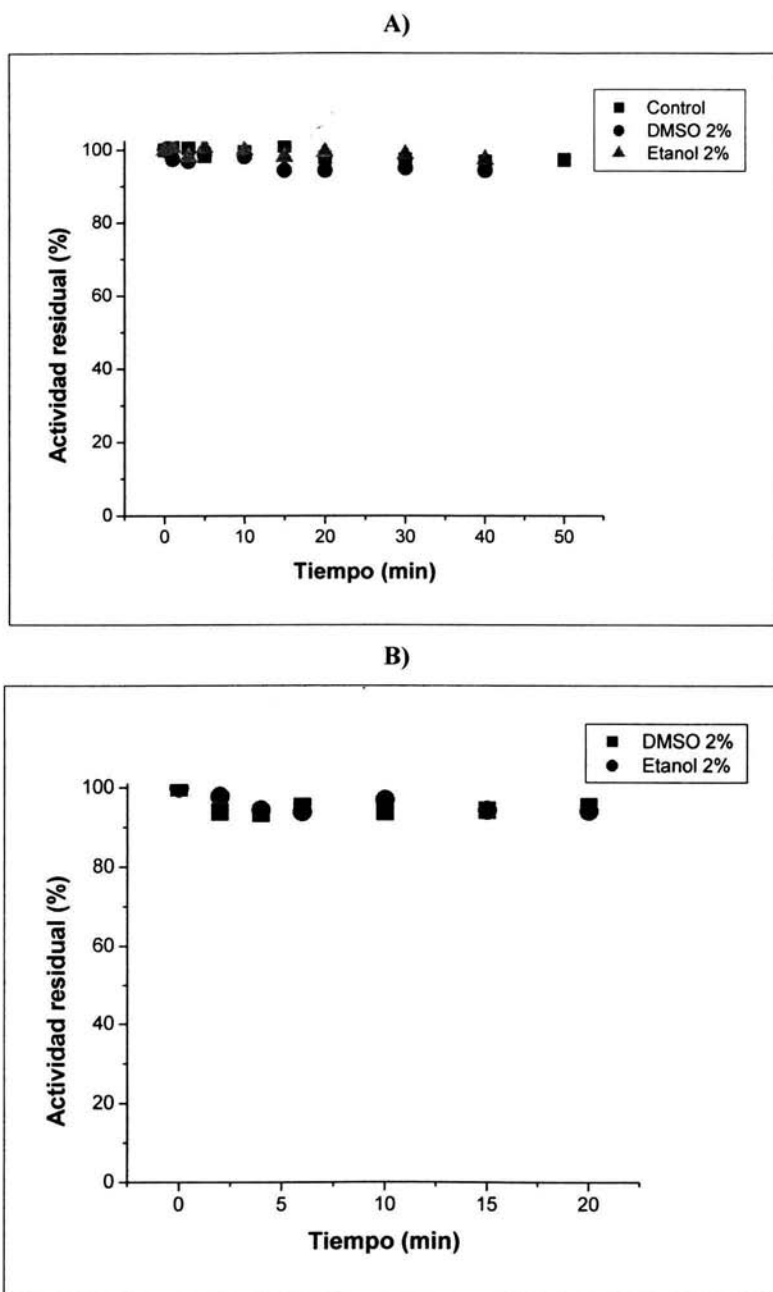
A pH 5 se presentó una inactivación de la enzima dentro del primer minuto de incubación. A pH 6, 6.5, 7 y 8 (no se muestran los datos de pH 6.5) se observó que la enzima fue estable durante los minutos de incubación y la mayor actividad específica para la H^+ -ATPasa se registró en el intervalo de pH 6 a 8. Con base en los resultados se escogió la temperatura de 30° C de y un pH de 6 para realizar los estudios de inactivación de la

ATPasa con el NCD-4, y ver el posible efecto que podían mostrar los solventes (etanol y dimetil sulfóxido) sobre la estabilidad de la enzima. Se debe señalar que aún cuando se observó la estabilidad de la enzima en el intervalo de pH de 6 a 8 y por tanto se pudo haber escogido cualquier valor dentro de este rango, se escogió el valor de pH 6 para ser congruente con los datos reportados en la literatura y de esta forma tener un marco de referencia al comparar nuestros resultados.

4.3 El efecto del etanol y el DMSO en la estabilidad de la H⁺-ATPasa

Como el NCD-4 es un compuesto hidrofóbico que se disuelve en etanol o DMSO, se estudió el efecto de estos solventes sobre la estabilidad de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática purificada con un gradiente de sacarosa y de la H⁺-ATPasa solubilizada con detergentes y purificada con el gradiente de glicerol.

Como se ve en la figuras 24A y 24B, ninguno de los dos solventes afectó la estabilidad de la H⁺-ATPasa a las concentraciones ensayadas (menores a 2%), sin importar cual de las muestras fuera la examinada. La actividad de la H⁺-ATPasa se mantuvo estable durante los primeros 20 minutos de ensayo en cualquiera de las dos preparaciones. La única variación que se halló se refirió a los valores de actividad específica, las preparaciones de la membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa (ver figura 22A) presentaron actividades entre 3 y 3.7 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, mientras que las muestras purificadas con ambos gradientes mostraron actividades de 10 a 16 $\mu\text{mol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$. En la figura 24 B se muestra la estabilidad de la enzima en los primeros 20 minutos de ensayo; sin embargo, la enzima permanece estable hasta por 40 o 60 minutos bajo las condiciones ensyadas: MES-KOH pH 6, glicerol 15%, 30 °C (datos no mostrados).



5 El efecto del NCD-4 sobre la actividad de ATPasa

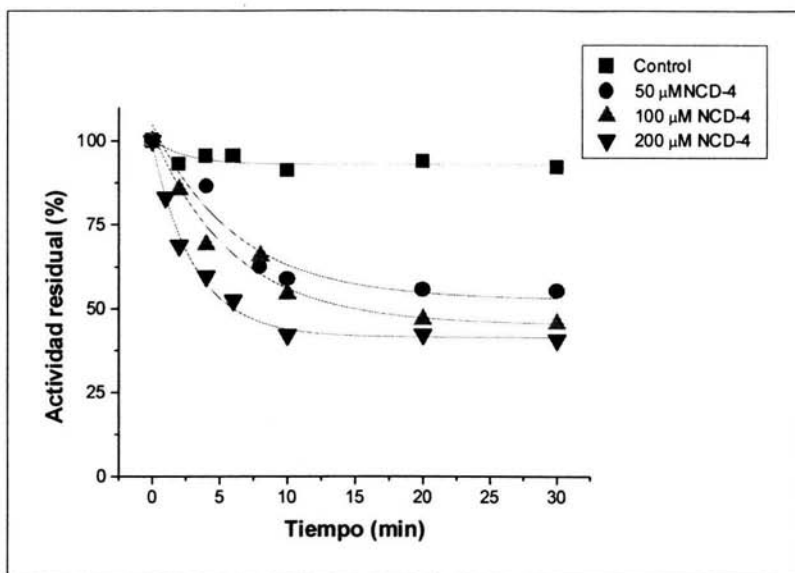
Una vez que se determinó el efecto del etanol y el DMSO sobre las preparaciones de la H⁺-ATPasa, el siguiente paso fue averiguar el efecto de las diferentes concentraciones del inhibidor NCD-4 sobre la actividad de la enzima en cada una de las preparaciones (ver figura 25). Se examinaron los efectos del inhibidor sobre la H⁺-ATPasa en el intervalo de 5 a 500 μM. Los resultados muestran que la inhibición de la ATPasa es función del tiempo y de la concentración del NCD-4. Además, la inhibición es parcial en cualquiera de las dos preparaciones, lo cual significa que a tiempos largos el porcentaje de inhibición de la H⁺-ATPasa producido por el NCD-4 permaneció constante (ver figura 25B).

Probando diferentes algoritmos, se encontró que la ecuación matemática que mejor modela el efecto del inhibidor NCD-4, sobre la actividad de la ATPasa de protones es la siguiente:

$$Y = Y_0 + Ae^{Rt}$$

De esta forma, una vez conocido el efecto del inhibidor sobre la H⁺-ATPasa, se decidió estudiar el efecto de los ligandos fisiológicos y los cationes monovalentes sobre la inhibición de la H⁺-ATPasa producida por el NCD-4, para lo cual se seleccionó la concentración de 200 μM de NCD-4 disuelto en DMSO, aunque la disolución de 200 μM del mismo inhibidor en etanol arroja los mismos resultados (datos no mostrados).

A)



B)

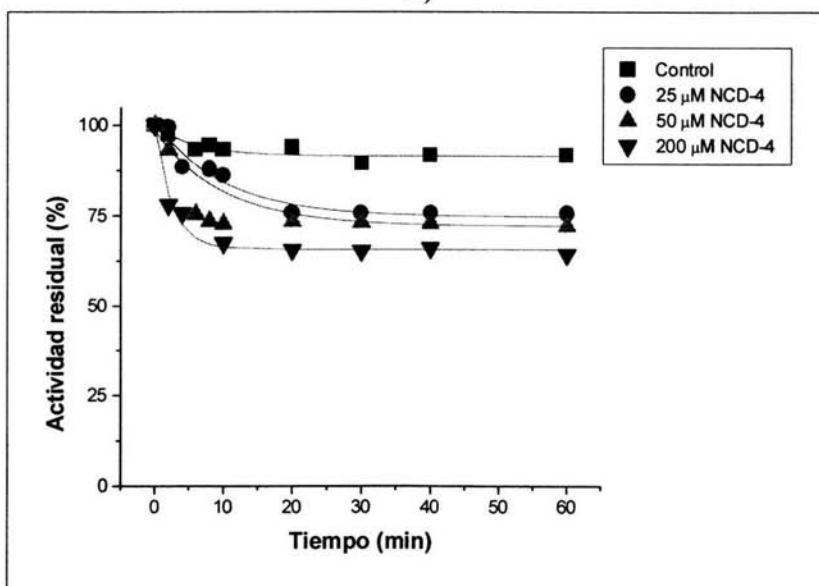


Figura 25 Efecto de diferentes concentraciones del NCD-4 sobre la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa (A) y sobre la H⁺-ATPasa purificada con sacarosa y glicerol (B). Ambos ensayos se realizaron en presencia de glicerol 15%, MES-KOH pH 6, a 30 °C. La ecuación que se ajusta a la inhibición parcial de la por el NCD-4 es $Y = Y_0 + Ae^{Ro}$

Sin embargo, aunque la H^+ -ATPasa se inhibió con el NCD-4, cabía la posibilidad de que el efecto parcial se debiera a la degradación del inhibidor en el medio de reacción, por lo que se realizó un experimento adicional para verificar el carácter parcial de la inhibición producida por el NCD-4 (ver la figura 26), que consistió en modificar a la ATPasa con 200 μ M de NCD-4 hasta que la actividad de la enzima disminuyera en un 30-35%, para luego mantenerse constante a partir de los 15 minutos de incubación (ver trazo con círculos); transcurrido este tiempo, se añadió una cantidad adicional del inhibidor (200 μ M más de NCD-4) sin que se observara cambio alguno en la actividad residual, con lo que se confirmó el carácter parcial de la inactivación producida por el NCD-4 sobre la H^+ -ATPasa, y no a la pérdida o degradación del inhibidor.

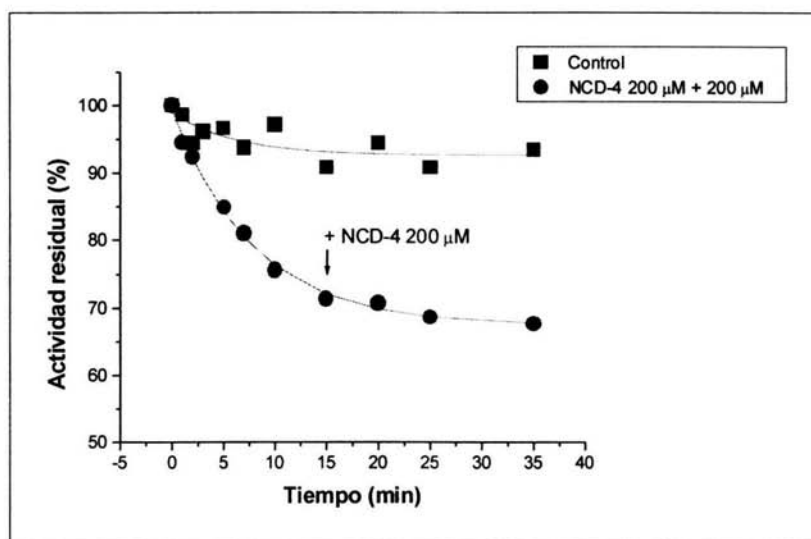
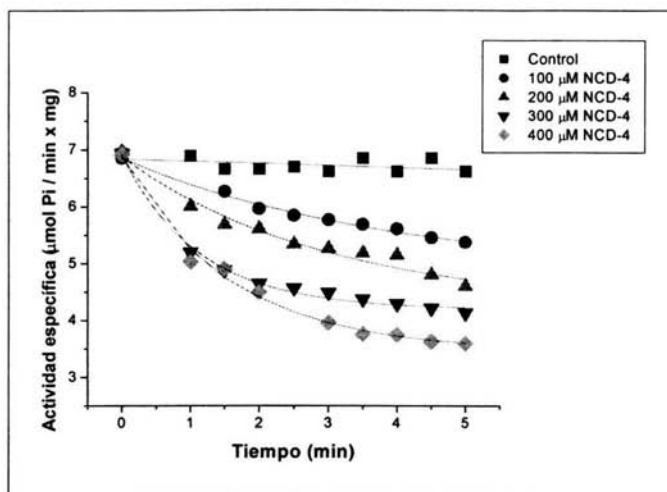


Figura 26. Comprobación del carácter parcial de la inhibición producida por el NCD-4. La membrana plasmática purificada con sacarosa se incubó a 30° C en ausencia de NCD-4 (cuadros) o en presencia de 200 μ M de NCD-4 (círculos), por un tiempo total de 35 minutos. En el último experimento se inició la reacción de inactivación añadiendo 200 μ M de NCD-4 y a los 15 minutos se realizó una segunda adición de 200 μ M de NCD-4.

Con el fin de obtener la constante de velocidad de segundo orden para el NCD-4, se realizaron ensayos de inactivación de la H^+ -ATPasa con diferentes concentraciones del inhibidor. Se obtuvo una relación lineal entre las constantes de inhibición (k) y la

concentración del NCD-4, a partir de la cual se calculó una constante de velocidad de segundo orden cuyo valor es de $1522 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

A)



B)

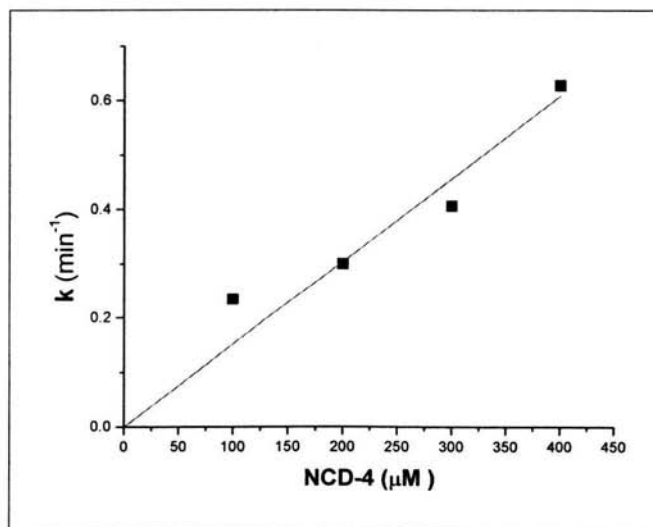


Figura 27. Curso temporal de la ATPasa a diferentes concentraciones de NCD-4. A) La ATPasa (0.5 mg / ml) se incubó con 50 mM de MES-HEPES pH 6.5 por dos minutos. La reacción se inició al añadir las concentraciones de 100 , 200 , 300 y 400 µM de NCD-4. B) Gráfica de la constante de inactivación de pseudoprimer orden (k) contra la concentración de NCD-4. La constante de segundo orden se obtiene de la pendiente de la recta.

Es interesante constatar que este valor es 3.6 veces mayor que la del DCCD, Velásquez, en 1996 encuentra un valor para la constante de segundo orden de $430 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ con la H^+ -ATPasa de *K. lactis*. Con el fin de conocer el efecto del NCD-4 sobre las constantes cinéticas de la ATPasa de protones, se estudió la cinética de estado estacionario de la proteína sin modificar y modificada con $200 \mu\text{M}$ del NCD-4. La figura 28 muestra que la modificación de la H^+ -ATPasa con el NCD-4 disminuye principalmente la V_{max} .

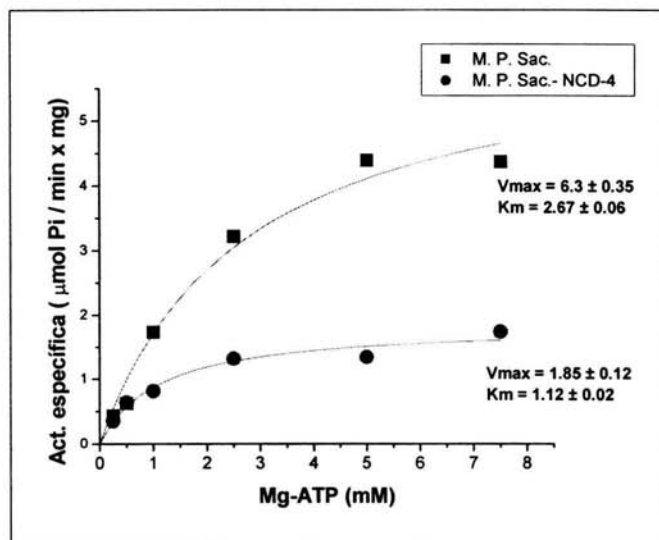


Figura 28. La cinética de estado estacionario de la H^+ -ATPasa purificada con el gradiente de sacarosa. La K_m para la ATPasa sin modificar es de 2.67 y la V_{max} de 6.3; mientras para la ATPasa modificada fueron 1.12 y 1.85 para la K_m y V_{max} respectivamente. La concentración de NCD-4 con que se incubó la membrana fue de $200 \mu\text{M}$ durante 40 minutos, al término de los cuales se centrifugó a 35,000 en el rotor 65 Ti.

6 La determinación del carácter irreversible de la modificación química

En la literatura está ampliamente reportado que las carbodiimidias reaccionan covalentemente con las proteínas, pues se unen de manera covalente a distintos grupos funcionales del polipéptido, como son los grupos carboxilo y sulfhidrilo (Carraway, 1972; Fillingame, 1980; Sussman, 1982; Chadwick, 1983; Chadwick, 1985; Sussman, 1987). Con el fin de averiguar si la formación del complejo enzima-inhibidor se debía a la aparición de

un enlace covalente, se realizó un experimento en el que se estudió la recuperación de la actividad de la H^+ -ATPasa al diluir el inhibidor.

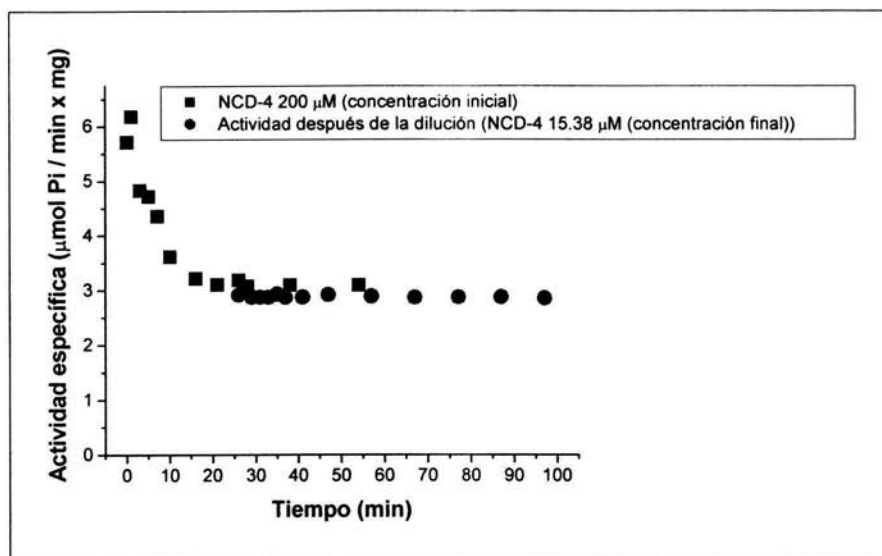


Figura 29. Modificación química irreversible entre el NCD-4 y la H^+ -ATPasa de *K lactis*. La ATPasa purificada con el gradiente de glicerol se modificó con 200 μ M de NCD-4, se incubó a 30° C y pH 6, a los 20 minutos de haber iniciado la reacción con la carbodiimida, se diluyó 100 veces la preparación en la solución de la H^+ -ATPasa y se determinó la liberación de Pi (hidrólisis del sustrato MgATP) acoplado el curso temporal al método colorimétrico de Fiske y Subbarrow.

En una primera etapa se incubó a la enzima con 200 μ M de NCD-4 y para los 20 minutos la actividad de hidrólisis de la H^+ -ATPasa había disminuido en un 50 % y se mantuvo constante (ver figura 29). En la segunda parte del experimento, la proteína modificada con el NCD-4 se diluyó en la solución de ensayo de la H^+ -ATPasa y se mantuvo en hielo. Con esta dilución, la concentración final del NCD-4 fue de 20 μ M; a diferentes tiempos se tomaron alícuotas de 250 μ l que se colocaron en el baño a 30° C y se les determinó la hidrólisis del MgATP. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 29, donde se observa que la modificación química de la H^+ -ATPasa producida por el NCD-4 es irreversible (ver círculos), ya que la inhibición de la enzima por la carbodiimida no se revierte cuando el sistema se diluye para disminuir la concentración del NCD-4. Si la interacción entre la ATPasa y la carbodiimida fuera a través de interacciones no covalentes, al diluir las muestras se observaría la recuperación de la actividad de la enzima. Otra

evidencia de que la modificación química que produce el NCD-4 sobre la ATPasa de protones es covalente, proviene de la electroforesis en condiciones desnaturalizantes de las preparaciones de la H^+ -ATPasa y de la membrana plasmática marcada con NCD-4 (figura 30). En este gel se observa que la unión del compuesto se lleva a cabo predominantemente sobre la H^+ -ATPasa, y que el inhibidor se desplaza de manera conjunta con la proteína aún en las condiciones desnaturalizantes en las que se realizó la electroforesis.

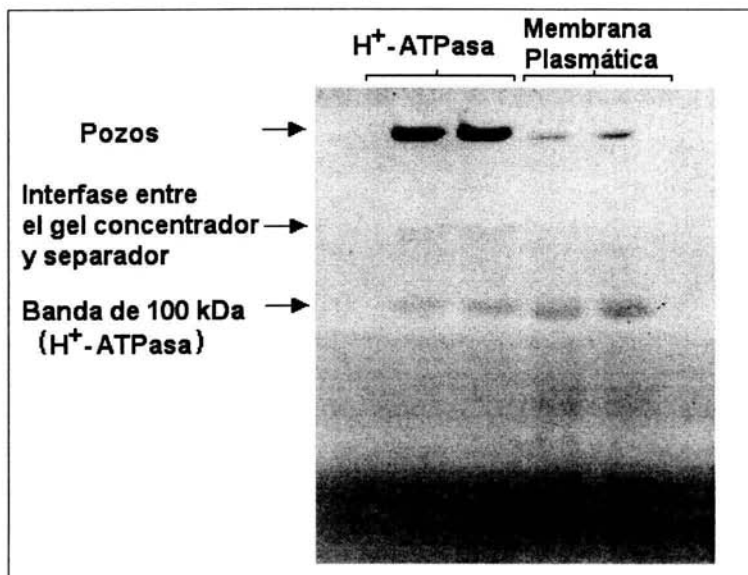


Figura 30. Electroforesis desnaturalizante de la H^+ -ATPasa modificada por el NCD-4. Aún cuando gran parte de la enzima no alcanzó a entrar al gel concentrador (pues se formaron agregados de la H^+ -ATPasa que no se disolvieron con β -mercaptoetanol y SDS 0.1%), en la proteína que alcanzó a penetrar el gel concentrador y el separador se observa que una sola banda (que corresponde a la H^+ -ATPasa ~100 kDa) presenta fluorescencia que corresponde al inhibidor. En cada carril se corrieron 50 μ g de proteína.

7 El efecto de los ligandos fisiológicos sobre la inhibición de la ATPasa por NCD-4

Los ligandos fisiológicos que se probaron para caracterizar la inhibición de la H^+ -ATPasa con el NCD-4 fueron el Mg^{2+} , Mg-ADP y ADP. Cuando se ensayó el catión divalente Mg^{2+} , se encontró que la inactivación de la enzima por el NCD-4 se incrementó (ver figura 31), probablemente debido a que el catión Mg^{2+} induce cambios conformacionales que

facilitan la entrada del NCD-4 a un sitio hidrofóbico, donde se localiza el o los grupos carboxilo que reaccionan de manera covalente. En forma similar, el complejo Mg-ADP potenció la inactivación de la H^+ -ATPasa por el NCD-4. En contraste con lo anterior, el ADP no afectó la cinética de inactivación de la H^+ -ATPasa por la carbodiimida, resultado que se puede explicar debido a que la especie que se une a la enzima es el complejo Mg-ADP como inhibidor competitivo (datos no mostrados).

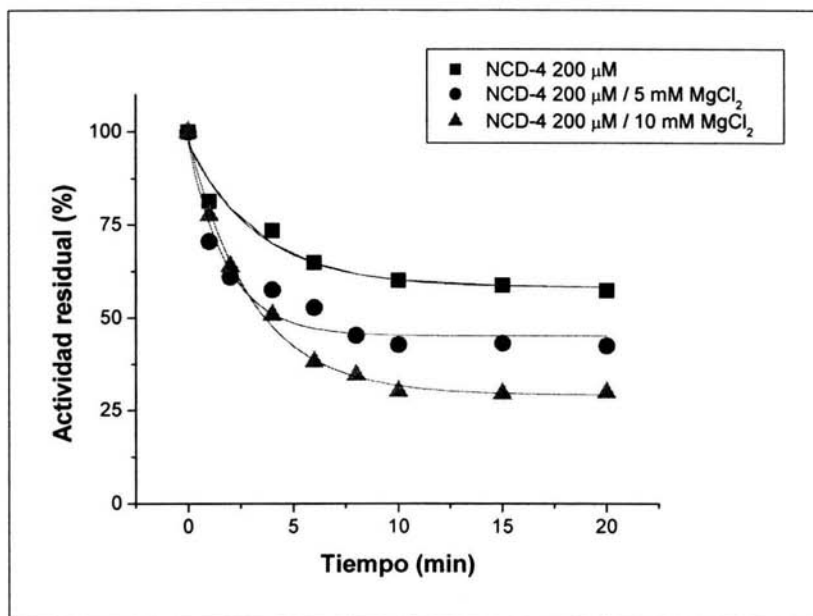


Figura 31. Efecto de diferentes concentraciones de Mg^{2+} sobre la inhibición de la H^+ -ATPasa por NCD-4. Las condiciones de ensayo son similares a los experimentos anteriores: glicerol 15%, MES-KOH pH 6, 30 °C.

8 El efecto de los cationes monovalentes sobre la inhibición de la ATPasa por NCD-4

Contrario al efecto visto con el catión divalente Mg^{2+} , los cationes monovalentes (que se añadieron en forma de NaCl y KCl) mostraron protección contra la inhibición de la H^+ -ATPasa (ver figura 32).

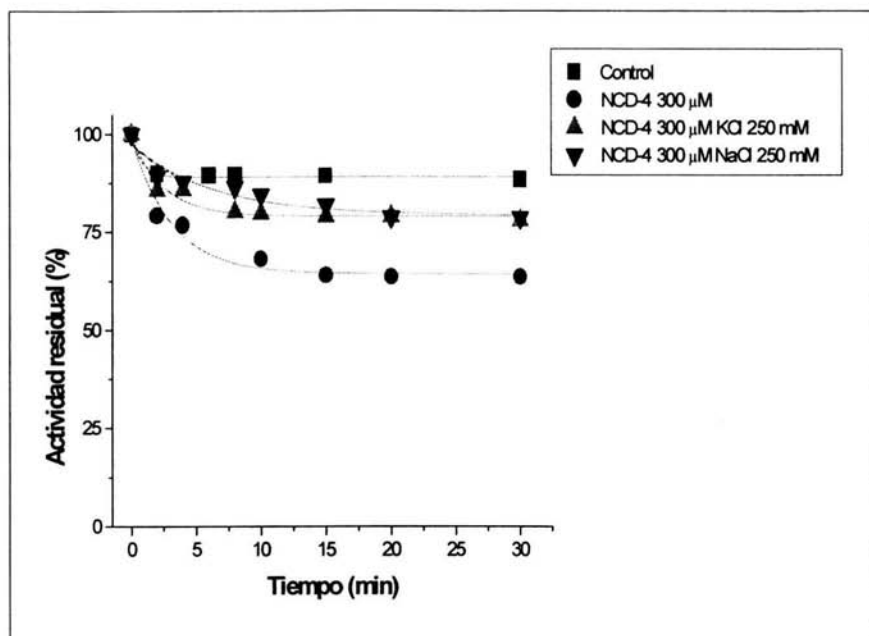
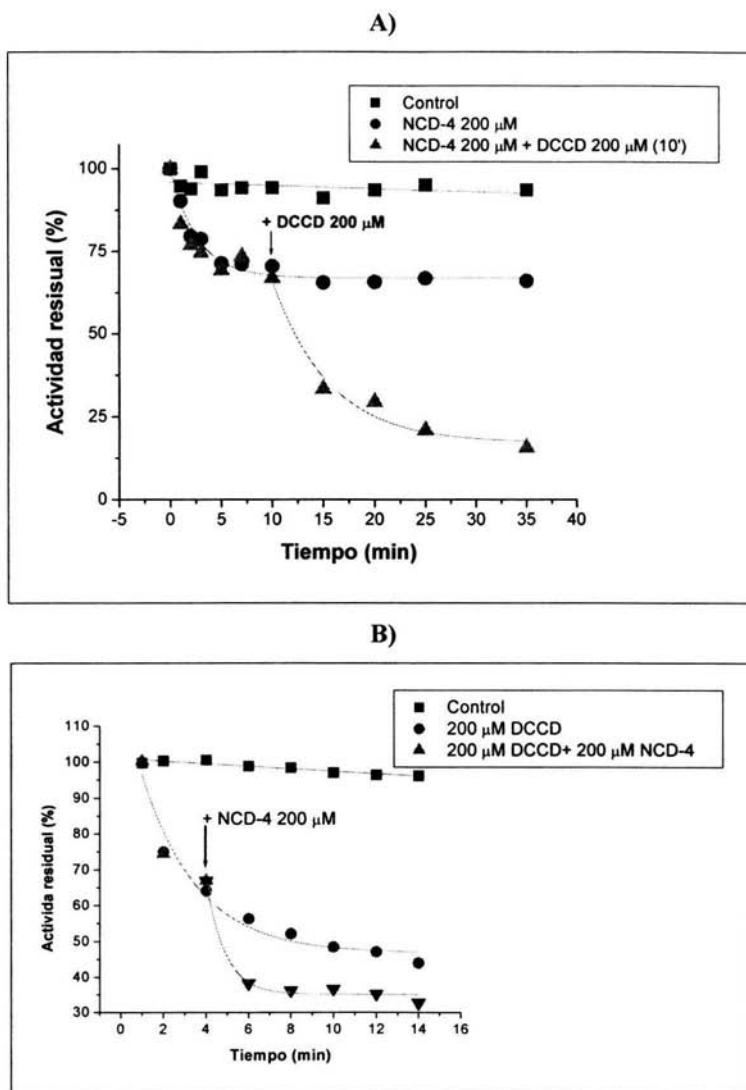


Figura 32. Efecto del K⁺ y Na⁺ sobre la inhibición de la H⁺-ATPasa por NCD-4. Las condiciones del ensayo son glicerol 15 %, pH 6, 30 °C.

9 El efecto del DCCD sobre la ATPasa modificada previamente con NCD-4

Con el fin de averiguar si la inhibición producida por el NCD-4 afecta a grupos carboxilo diferentes de los modificados por el DCCD (una carbodiimida hidrofóbica que inhibe totalmente a la ATPasa de protones), se decidió realizar dos ensayos de actividad en los cuales se observaría el comportamiento de la H⁺-ATPasa modificada por el NCD-4 frente al DCCD. Se esperaba que si las dos carbodiimidas afectan a grupos funcionales distintos, entonces el DCCD produciría una inhibición de la H⁺-ATPasa aún cuando ésta hubiese sido modificada previamente por el NCD-4. Los resultados de estos experimentos (figura 33A y 33B) muestran que el NCD-4 y el DCCD reaccionan con grupos carboxilo diferentes, ya que el DCCD fue capaz de inhibir a la H⁺-ATPasa modificada con el NCD-4; y también el NCD-4 incrementa la inhibición de la proteína modificada con el DCCD.



El que las dos carbodiimidas se unen a sitios distintos en la H^+ -ATPasa, se confirmó por medio de una electroforesis en condiciones desnaturalizantes en donde en una primera etapa se incubó a la enzima con 200 μ M de NCD-4 y a los 15 minutos se añadieron 200 μ M de DCCD. En una segunda etapa del experimento, la proteína fue modificada primero con 200 μ M de DCCD y a los 15 minutos se añadieron 200 μ M de NCD-4. El resultado de esta electroforesis se muestra en la figura 34.

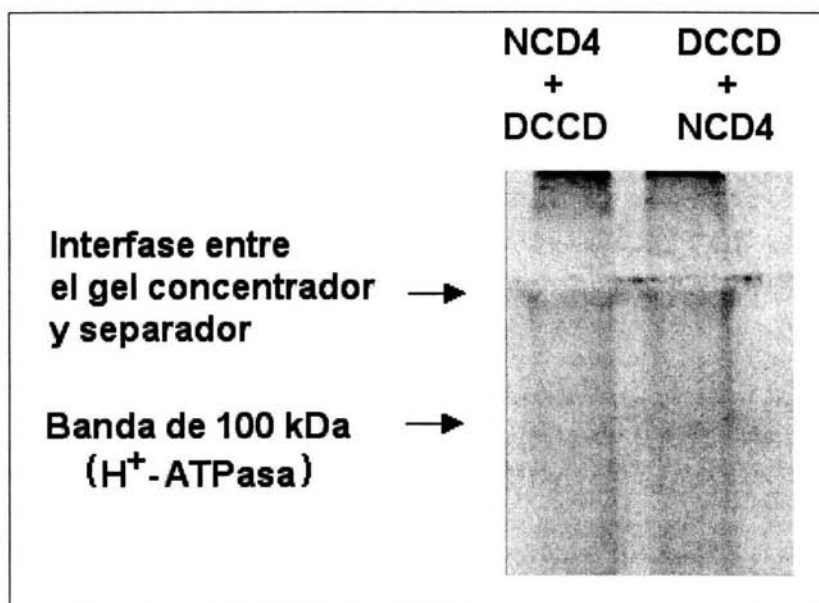


Figura 34. La electroforesis desnaturalizante de la membrana plasmática purificada con sacarosa modificada con NCD-4 vs DCCD. Carril izquierdo) la H^+ -ATPasa fue modificada con 200 μ M NCD-4 y 200 μ M DCCD añadido 15 minutos después de haber iniciado la reacción. Carril derecho) la H^+ -ATPasa se modifica primero con DCCD y 15 minutos después se añadió el NCD-4.

V. DISCUSIÓN

Aunque se conoce mucho sobre el funcionamiento y la estructura de las ATPasas de la membrana plasmática de hongos y plantas, aún quedan varias interrogantes por contestarse, la mayoría de ellas relacionadas con la falta de información sobre la estructura tridimensional de la proteína. Así, se desconoce el mecanismo del transporte de los iones a través de las membranas, de la hidrólisis del ATP y de la transducción de energía para la generación del gradiente de potencial electroquímico (Pedersen y cols, 1987; Morsomme y cols, 2000). También se desconocen las relaciones espaciales que existen entre las diferentes regiones de la estructura primaria, la identidad de los aminoácidos que son funcionalmente importantes, así como el establecimiento de la estructura terciaria y cuaternaria de las ATPasas (Miranda, 1993; Morsome, 2000). De igual forma, falta por identificar y determinar el número y la localización espacial de los sitios específicos en donde ocurre la unión del ATP y de los cationes fisiológicos.

Por estas razones, con el fin de obtener mayor información acerca de los residuos involucrados en la unión de los ligandos fisiológicos y de los residuos esenciales para la actividad de la enzima, se realizaron modificaciones químicas de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática del hongo hemiascomiceto *Kluyveromyces lactis* con el inhibidor NCD-4.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la modificación química de la H⁺-ATPasa por esta carbodiimida es irreversible, se potencia con los ligandos fisiológicos Mg²⁺ y Mg-ADP, y disminuye con los cationes monovalentes Na⁺ y K⁺. Un dato interesante es que al modificarse la H⁺-ATPasa con el NCD-4, ésta se inhibe parcialmente y la enzima retiene alrededor de un 60-70% de su actividad, lo cual contrasta con la inactivación total que produce el DCCD.

1 La membrana plasmática de *K. lactis*

El hongo hemiascomiceto *K. lactis* se seleccionó por la facilidad que ofrece para cultivarse y obtener grandes cantidades de células bajo condiciones de luz, temperatura y medio de cultivo sencillos y económicos. Otras ventajas de este hongo son el tiempo de cultivo corto y su cómodo manejo y almacenamiento, además de que se obtienen preparaciones con

mayor rendimiento de membrana plasmática y mayores actividades específicas de la H^+ -ATPasa purificada, en comparación con otros hongos como *S. cerevisiae*.

Asimismo, se tiene la estructura primaria del gen PMA1 que codifica para la ATPasa de protones de *K. lactis* (Miranda y cols, 1995), la cual muestra homología con las ATPasas de *C. albicans*, *S. cerevisiae* y *Z. rouxii*, con las que comparte un 93% de similitud y un 85% de identidad; las regiones con menos similitud se localizan en el extremo amino terminal (Miranda, 1995), lo cual sugiere diferencias en la regulación de la H^+ -ATPasa en cada una de las especies. Por el contrario, la alta similitud sugiere que todas estas enzimas deben poseer estructuras secundarias muy parecidas y que el arreglo tridimensional debe ser también muy similar.

En la misma forma, al comparar algunas de las secuencias de las ATPasas de protones con las secuencias de las ATPasas de Na^+/K^+ , ATPasas de Ca^{2+} y ATPasas de H^+/K^+ , se descubre que hay homología a pesar de las capacidades de transporte y la especificidad por cationes distintos. De nueva cuenta, la región más conservada en estas ATPasas corresponde a la secuencia que comprende desde el final del cuarto segmento transmembranal hasta el sitio de fosforilación, lo que sugiere que todas las ATPasas tipo P evolucionaron a partir de un ancestro común que formaba un intermediario covalente aspartil fosfato durante su ciclo catalítico. A partir de este ancestro evolucionó la capacidad para transportar diferentes cationes (Serrano, 1993).

Otro punto a favor de la H^+ -ATPasa como modelo biológico, es que se realizaron estudios en donde se caracterizó la inhibición de la H^+ -ATPasa con agentes químicos como la N-etilmaleimida (NEM), el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y el bromuro de etidio (EB) (Brooker and Slayman, 1983; Miranda, 1995), y algunas carbodiimidas como el DCCD y el EDC (Velásquez, 1996).

2 La purificación de la H^+ -ATPasa

Para purificar la membrana plasmática de *K. lactis* se utilizó un gradiente de densidad zonal de sacarosa, mientras que para purificar a la H^+ -ATPasa se utilizaron detergentes y técnicas de centrifugación zonal con gradientes de glicerol. Al término de la purificación de la membrana plasmática con el gradiente de sacarosa, se obtuvo una preparación que mostró en un gel con SDS, una banda predominante de 100 kDa que corresponde a la H^+ -ATPasa.

Con este método se consiguió una preparación 2.28 veces más pura que la preparación de membrana plasmática cruda, con una recuperación del 26% de la proteína original y un incremento de casi tres veces en la actividad específica, con un rendimiento del 60.27% en la actividad total de la H^+ -ATPasa.

Con la purificación de la ATPasa de protones a partir de la membrana plasmática cruda, utilizando el gradiente de glicerol y el detergente Zwittergent 3-14, se consiguió una preparación que incrementó la pureza de la H^+ -ATPasa alrededor de 3.15 veces y que tuvo un aumento de 3.18 veces en la actividad específica de la enzima. El rendimiento de este procedimiento resultó de 5.38% para la proteína total y de 5.37% para la actividad total. Cuando se combinaron ambos gradientes de densidad zonal en un solo protocolo, se consiguió una muestra altamente purificada, en la que la actividad específica de la H^+ -ATPasa aumentó en un orden de magnitud y la pureza de la H^+ -ATPasa se incrementó 10.47 veces. Sin embargo, el rendimiento de este último protocolo fue muy pobre, con una recuperación de 0.145% de la actividad de la muestra inicial.

En el gel de la electroforesis en condiciones desnaturizantes de las tres preparaciones (ver la figura 20) se observa una banda de 100 kDa que corresponde al polipéptido de la ATPasa, y varias bandas de menor peso molecular. Estas bandas contaminantes son difíciles de separar y se presentan también cuando se utilizan otros métodos de purificación descritos en la literatura (Malpartida y Serrano, 1981; Olivera, 1990).

Cuando se hizo el balance de los métodos, se decidió trabajar con la muestra de la membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa. La H^+ -ATPasa que se obtuvo en estas preparaciones fue activa y estable con las condiciones experimentales diseñadas, por lo que la consideramos adecuada para estudiar el efecto del NCD-4 sobre la enzima y también para observar el efecto de los cationes mono y divalentes sobre la modificación química con la carbodiimida. Por otro lado, aún cuando se obtuvieron muestras de ATPasas muy puras al solubilizar con el detergente Zwittergent 3-14 y purificar con el gradiente de glicerol, el rendimiento de estos protocolos fue muy bajo.

3 La estabilidad de la H⁺-ATPasa en las condiciones experimentales

La H⁺-ATPasa de la membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa fue inestable a 37° C y pH 6, pues conforme avanzaba el tiempo del ensayo se observaba que su actividad disminuía. Este problema se resolvió añadiendo glicerol a concentraciones mayores de 10% (volumen /volumen). Con una concentración de glicerol de 15% la ATPasa mantuvo su estabilidad en las condiciones diseñadas para los ensayos de actividad, incluso durante 120 minutos. A la par de estos experimentos, se descartó la presencia de alguna proteasa en las preparaciones que pudiera afectar el funcionamiento de la ATPasa de protones. Otros agentes que también pudieron ser utilizados para conseguir la estabilidad de la H⁺-ATPasa en los ensayos, son el fosfato de inositol, la sacarosa, la trealosa, entre otros, y se decidió utilizar al glicerol como agente estabilizante de la proteína siguiendo los antecedentes inmediatos del laboratorio (Pardo, 1990; Velásquez, 1996).

4 El efecto de los solventes etanol y DMSO sobre la estabilidad de la H⁺-ATPasa

Al ser el NCD-4 una carbodiimida hidrofóbica que se disuelve en DMSO y etanol, se estudió el efecto de estos solventes sobre la estabilidad de la H⁺-ATPasa. Se encontró que a las concentraciones ensayadas, ninguno de los dos solventes afecta la estabilidad de la enzima, independientemente de la preparación que se use (membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa o la ATPasa solubilizada con detergentes y purificada con el gradiente de glicerol). De esta forma, se descartó un efecto inespecífico de los solventes que pudiera alterar la estabilidad de la ATPasa y/o la inhibición provocada por el NCD-4.

5 El efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la H⁺-ATPasa

Se ha reportado el efecto de la temperatura sobre las ATPasas *S. cerevisiae* y *N. crassa* (Ahlers, 1981, Bowman and Blasco, 1981), pero se desconocía la estabilidad de la H⁺-ATPasa de *K. lactis* en nuestras condiciones experimentales. Por esta razón se decidió

estudiar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa y también sobre la H^+ -ATPasa purificada con los gradientes de sacarosa y glicerol.

Se encontró que siempre que se trabajara con concentraciones de glicerol mayores de 10% (v/v), la ATPasa de protones permanecía estable en el intervalo de temperaturas de 20 a 40° C.

6 El efecto del pH sobre la estabilidad de la H^+ -ATPasa

Para observar el efecto del pH sobre la estabilidad de la H^+ -ATPasa, se examinaron valores de pH entre 5 y 8. Se encontró que a un pH menor de 6 la enzima se inactiva rápidamente, mientras que a valores de pH mayores o iguales a 6 y menores a 8.6, la enzima mostraba estabilidad en las condiciones del ensayo, incluso hasta por 40 o 60 minutos. Las mejores condiciones para la estabilidad de la membrana plasmática y de la H^+ -ATPasa purificada, se presentaron en el intervalo de pH de 6 a 7. Estos resultados concuerdan con los datos reportados en la literatura para las ATPasas de otros hongos, como *S. cerevisiae* y *Z. rouxi*.

Una conclusión que se derivó de estos ensayos, es que a valores de pH ácidos no se podría analizar la protección por uno de los sustratos (el H^+) ó por el producto de la reacción (Mg-ADP) contra el inhibidor NCD-4, pues a altas concentraciones del ión H^+ (valores de pH menores a 6) la inactivación de la H^+ -ATPasa es muy rápida, y en estas condiciones es difícil detectar algún efecto de protección del sustrato fisiológico o del producto de la enzima sobre la inhibición producida por el NCD-4. En la misma forma, el intervalo de pH que se seleccionó para estudiar el efecto de los ligandos fisiológicos y de los cationes monovalentes sobre la inactivación de la H^+ -ATPasa producida por el NCD-4, fue de pH 6 a 8.5.

7 El efecto del NCD-4 sobre la actividad de la H^+ -ATPasa

El NCD-4 es una carbodiimida hidrofóbica de estructura voluminosa, que carece de carga, y que al igual que otras carbodiimidias con características similares, reacciona con grupos carboxilo que se localizan en un ambiente hidrofóbico (Means y Feener, 1971; Carraway, 1972, Chadwick, 1975, Velásquez, 1996). Para caracterizar el efecto de este inhibidor sobre la ATPasa de protones de *K. lactis* se probaron diferentes concentraciones de NCD-4 que abarcaron el intervalo de 5 a 500 μ M. Se encontró que la inhibición de la H^+ -ATPasa por el

NCD-4, es dependiente del tiempo y de la concentración del reactivo. En todas las concentraciones del inhibidor que se probaron se inactivó parcialmente la enzima en los primeros 20 minutos de incubación con el NCD-4. El hecho de que el valor de la inhibición parcial de la H^+ -ATPasa dependa de la concentración del inhibidor, se puede explicar teniendo en cuenta que el intermediario O-acilurea no solo produce al aducto estable N-acilurea fluorescente, sino que existen por lo menos otras tres rutas alternativas que permiten la regeneración del carboxilo (ver figura 12) y que disminuyen la concentración efectiva del NCD-4. Es decir, cuando se añaden concentraciones pequeñas de NCD-4 al medio de incubación, no todas las moléculas de ATPasa se inactivan con la carbodiimida, pues parte del aducto inestable O-acilurea se va por rutas diferentes que no forman al aducto estable N-acilurea; en cambio, a concentraciones del NCD-4 mayores de 200 μM , se incrementa la probabilidad de que todas las ATPasas se modifiquen. La inhibición fue parcial en cualquiera de las preparaciones utilizadas, ya sea la membrana plasmática purificada con el gradiente de sacarosa, o bien la H^+ -ATPasa solubilizada con detergentes y purificada con el gradiente de glicerol. La modificación de la enzima con el NCD-4 resultó ser estable en los ensayos de actividad de hidrólisis del ATP hasta por 60 minutos.

Se realizaron ensayos de inactivación a tiempos cortos (se tomaron alícuotas cada 30 segundos durante los primeros 5 minutos de la reacción) y se encontró que la constante de velocidad de segundo orden para el NCD-4 fue de $1522 M^{-1} min^{-1}$. Cuando se realizaron las cinéticas de estado estacionario para el complejo Mg-ATP, se halló que al modificar la H^+ -ATPasa con el NCD-4 se afectan los valores de V_{max} (que disminuye 3.4 veces) y de K_m (que disminuye 2.4 veces). El término de inhibidor mixto no puede ser aplicado al NCD-4, pues no es un inhibidor clásico (reversible).

8 El NCD-4 produce una inhibición parcial que involucra la formación de un enlace covalente

El carácter parcial de la inhibición de la H^+ -ATPasa por el NCD-4 se corroboró con el experimento de la figura 26, en donde la enzima se incubó con una concentración de 200 μM de NCD-4 y, una vez que se había inactivado parcialmente la proteína y la actividad de hidrólisis del ATP se mantenía estable, se añadió al medio de incubación otros 200 μM del

NCD-4. Al no cambiar la actividad de la ATPasa con esta segunda adición del inhibidor, se concluyó que la modificación producida por el NCD-4 sobre la H^+ -ATPasa resulta en una enzima con actividad residual que no depende de un exceso de la cantidad del inhibidor.

También se confirmó que la reacción que ocurría entre el NCD-4 y la H^+ -ATPasa implicaba la formación de un enlace covalente. Si la inhibición hubiera sido reversible (no covalente), al disminuir la concentración del inhibidor por medio de una dilución de la solución de ensayo de la ATPasa, se hubiera registrado una recuperación de la actividad de hidrólisis de ATP. Sin embargo, la actividad se mantuvo constante en un 60% de la actividad inicial, lo cual sugiere que la modificación química de la ATPasa es irreversible en las condiciones experimentales descritas en este trabajo.

Además, cuando se realizó una electroforesis en condiciones desnaturalizantes de la enzima modificada previamente con el NCD-4 (ver figura 28), se observó que la marca de la fluorescencia producida por la formación del complejo N-acilurea entre la carbodiimida y uno o más grupos carboxilo de la H^+ -ATPasa permanecía estable en las condiciones de la electroforesis y migraba junto con la banda de 100 kDa correspondiente a la ATPasa de protones. Es importante remarcar que la banda de la H^+ -ATPasa fue la única marcada de manera apreciable por la carbodiimida.

9 El NCD-4 produce una inhibición de la H^+ -ATPasa distinta al DCCD

El DCCD es una carbodiimida hidrofóbica con características muy similares al NCD-4 (Carraway, 1972, Chadwick, 195, Velásquez, 1996), y existen trabajos en donde se caracteriza la inactivación irreversible de algunas ATPasas por este inhibidor (Sussman y cols, 1982 y 1987). Por estas razones se consideró necesario distinguir si la inhibición mediada por el NCD-4 era distinta a la producida por el DCCD, o si estos reactivos competían por los mismos grupos carboxilo inmersos en un ambiente hidrofóbico.

El NCD-4 es una carbodiimida mucho menos reactiva probablemente debido al mayor tamaño de su estructura química en comparación con el DCCD, (Chadwick and Thomas, 1983); sin embargo, con el NCD-4 se abre la posibilidad de utilizar técnicas de fluorescencia para seguir los cambios conformacionales en sitios específicos de la H^+ -ATPasa modificada por el inhibidor, inducidos por distintos ligandos.

El resultado de los experimentos en donde se utilizaron ambas carbodiimidias se muestra en la figura 33. En estos ensayos se añadió 200 μM de DCCD a una H^+ -ATPasa modificada previamente con 200 μM de NCD-4; se esperaba que si las dos carbodiimidias compitieran por los mismos sitios en la proteína, el NCD-4 pudiera proteger a la enzima en contra del DCCD, que ejerce una inhibición total e irreversible de la actividad de la H^+ -ATPasa. Sin embargo, al ser añadido el DCCD a la proteína modificada previamente por el NCD-4 la actividad de hidrólisis del ATP disminuyó drásticamente, lo cual sugiere que la modificación que realizan ambos reactivos afecta a grupos diferentes en la proteína.

La constante de velocidad de segundo orden para el NCD-4 fue 3.6 veces mayor que la constante de velocidad obtenida para el DCCD. Mientras que el curso temporal de la inactivación con el NCD-4 muestra una caída rápida en la actividad de hidrólisis del ATP en los primeros minutos de ensayo y después se alcanza una meseta estable, con el DCCD la inactivación es más lenta. Aunque ambas carbodiimidias son voluminosas e hidrofóbicas y por tanto deberían tener cinéticas de inactivación similares, los efectos que producen sobre la H^+ -ATPasa son diferentes: el DCCD inactiva totalmente a la ATPasa dentro de los primeros 3 minutos de ensayo cuando se utilizan 150 o 200 μM del inhibidor (Sussman y Slayman, 1982), mientras el NCD-4 genera una proteína con una actividad residual. Además, cuando se corrió la electroforesis con la proteína modificada con el NCD-4 e incubada con el DCCD, se confirmó que ambas carbodiimidias atacan a grupos carboxilo diferentes, pues si las dos carbodiimidias compitieran por el mismo sitio, la proteína modificada por el NCD-4 hubiera sido protegida contra la inactivación total producida por el DCCD; y en la misma forma, la ATPasa modificada por el DCCD no permitiría la unión del NCD-4. Sin embargo, esto no ocurrió y la formación del aducto estable N-acilurea (visible con luz ultravioleta) ocurrió independientemente del orden en que fueron añadidas las carbodiimidias.

Otra evidencia que señala que la inactivación producida por las dos carbodiimidias es debido a la modificación de grupos carboxilo diferente proviene de los ensayos de protección con los ligandos fisiológicos Mg^{2+} y Mg-ADP. Para el caso del DCCD se encontró que hay protección por los ligandos (Velásquez, 1996), mientras que para el NCD-4 se encontró que, contrario a lo esperado, la inhibición se potencia con los mismos ligandos.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

10 El efecto de los cationes sobre la inhibición de la ATPasa por el NCD-4

Para entender el mecanismo de transporte y transducción de energía que lleva a cabo la H^+ -ATPasa y en general todas las ATPasas tipo P, es necesario desarrollar un modelo de la estructura de la enzima. Sin embargo, hasta la fecha sólo existen cristales bidimensionales de baja resolución para la ATPasa de *N. crassa*, los cuales no son lo suficientemente buenos para determinar la posición de los elementos transmembranales, así como el arreglo de las regiones hidrofílicas e hidrofóbicas que están involucradas en el mecanismo catalítico de la H^+ -ATPasa (Toyoshima, 1993; Stockes, 1994; Auer, 1998, Stockes, 1999). Por esta razón, el uso de ligandos constituye una estrategia importante para la caracterización de la modificación química de la H^+ -ATPasa producida por el NCD-4, ya que si los ligandos ejercen una protección total, esto sería un indicio útil para identificar el o los residuos que reaccionan con las carbodiimidias, lo cual permitiría conocer de manera indirecta la localización del residuo que interviene en la reacción.

Los cationes que se utilizaron en nuestros experimentos son el Mg^{2+} , el Na^+ y el K^+ . El magnesio se requiere para la hidrólisis del ATP por las P-ATPasas (Ahlers, 1981) y además puede modular la inactivación de algunas ATPasas por agentes como el NEM y el DCCD. En la misma forma, se ha descrito que el Na^+ y el K^+ aumentan o inhiben la actividad de las ATPasas de protones de diversas fuentes (Goffeau, 1981; Ahlers, 1984), lo cual sugiere la presencia de sitios de unión para cationes monovalentes en estas ATPasas.

10.1 El efecto del Mg^{2+} y el MgADP sobre la inhibición de la H^+ -ATPasa por el NCD-4

Para estudiar el efecto de los ligandos fisiológicos de la enzima, en este trabajo se utilizó al inhibidor competitivo del sustrato, el Mg^{2+} -ADP, y al inhibidor no competitivo, el Mg^{2+} , y se observó el efecto que ambos ejercían sobre la inhibición de la H^+ -ATPasa producida por el NCD-4. El catión libre y el complejo Mg^{2+} -ADP potenciaron la inhibición parcial de la H^+ -ATPasa producida por la carbodiimida; sin embargo, el ADP por sí solo no produjo efecto durante los ensayos de inhibición. Estos resultados probablemente se deban a que el catión induce cambios conformacionales que facilitan la entrada del NCD-4 al sitio

hidrofóbico, donde se localizan varios grupos carboxilo con los cuales se une de manera covalente.

10.2 El efecto del Na^+ y del K^+ sobre la inhibición de la H^+ -ATPasa por el NCD-4

Cuando se examinó el efecto de los cationes monovalentes potasio y sodio sobre la inhibición de la H^+ -ATPasa por el NCD-4, se encontró que ambos cationes, que se podrían considerar como análogos al H^+ que es un sustrato de la enzima, protegieron parcialmente a la H^+ -ATPasa. Este resultado sugiere la posibilidad de que el H^+ proteja a la ATPasa contra la inactivación producida por el NCD-4, y de esta manera asemejarse a la protección total dada por el Ca^{2+} contra la inactivación por el NCD-4 de la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico, que encontraron Chadwic y Thomas en 1983. Empero, no es posible demostrar esto directamente, pues a concentraciones altas del protón (pHs menores que 6.0) la enzima se inactiva en los primeros minutos, lo cual impide determinar el pKa del residuo que reacciona con el NCD-4.

Aún cuando pareciera que los volúmenes atómicos del potasio y del sodio son 22 o hasta 60 veces mayores que el volumen del sustrato natural de la H^+ -ATPasa, es importante notar que este ion está unido al menos a una molécula de agua, por lo que su masa molecular mínima es de 19 umas. Tampoco se puede descartar que el efecto del Na^+ y del K^+ se deba a un cambio conformacional a distancia, al interactuar el catión con un sitio de unión específico para cationes monovalentes en la ATPasa, lejos del sitio del protón, el cual se encuentra en el dominio membranal de la proteína.

11 Los probables sitios de unión del NCD-4

Para localizar el (los) sitios donde se une de manera covalente el NCD-4, se ubicó en la estructura primaria de la H^+ -ATPasa a los grupos carboxilo inmersos en la membrana plasmática de la levadura. La secuencia de aminoácidos se dedujo a partir del gen PMA1 de *K. lactis* (Miranda y cols, 1995), y se sometió al análisis de hidropatía para así encontrar los posibles grupos carboxilo que pueden ser modificados por el NCD-4 (ver figura 35).

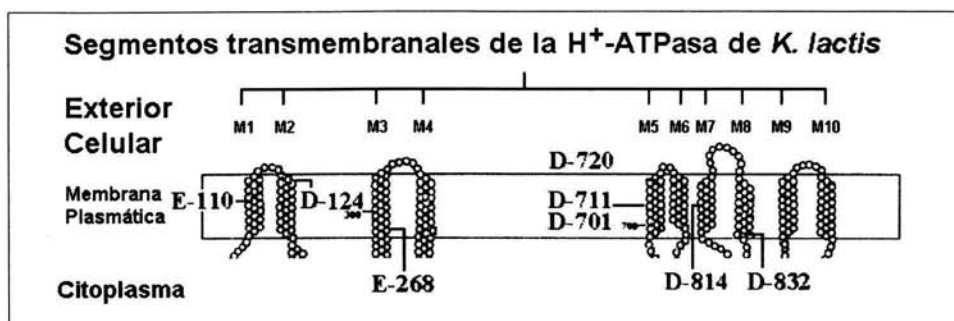


Figura 35. Localización de los grupos carboxilo inmersos en los segmentos transmembranales de la ATPasa de protones de *K. lactis*.

Los residuos de aminoácidos E-110, D-124, D-711 y D-814 de la estructura primaria de *K. lactis* tienen sus homólogos en la secuencia de *S. cerevisiae*, desplazados en las posiciones E-129, D-143, D-730 y D-833, respectivamente; sin embargo, no se ve alterada su ubicación dentro de los segmentos transmembranales. Por tanto, para el análisis de los resultados de este trabajo solamente tomaremos en cuenta a los 4 aminoácidos consenso en los análisis de hidropatía reportados en la literatura como los probables sitios a los cuales pueda unirse el NCD-4.

Así, los ensayos de actividad que se hicieron ocupando el NCD-4 y el DCCD resultan de gran importancia para la localización del (los) grupo(s) carboxilo a los que se une el NCD-4, pues sabiendo que ambas carbodiimidias no compiten por los mismos sitios de unión, resulta que de los cuatro grupos carboxilo de las H⁺-ATPasas inmersos dentro de la membrana plasmática, se descarta al ácido glutámico ubicado en la posición 110 (E-129 en las secuencias de *S. cerevisiae* y de *N. crassa*) que es el sitio en el cual se une de manera covalente el DCCD (Sussman y cols, 1987), quedando de esta forma solamente tres lugares posibles a los cuales pudiera unirse el NCD-4. Estos sitios son los residuos de ácido aspártico 124, 711 y 814 de la secuencia de *K. lactis* (Miranda y cols, 1995).

12 El NCD-4 y la ATPasa de Calcio

Se conoce que los sitios de unión para el NCD-4 en la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico son los residuos de ácido glutámico E-231 y E-309, localizados en los segmentos transmembranales 3 y 4 de la enzima (Sumbilla, y cols, 1991). Sin embargo,

estos residuos no están presentes en la secuencia de aminoácidos de las ATPasas de protones de los hongos. Por tanto, en la misma forma en que el sitio de unión del DCCD en la Ca^{2+} -ATPasa (glutámico 953) no corresponde con el sitio descrito para las ATPasas fúngicas (aspártico 129), esperamos que el (los) sitio(s) de unión del NCD-4 en la ATPasa de protones de *K. lactis* sean también distintos a los reportados para la Ca^{2+} -ATPasa (Goldshelger y cols, 1992).

13 Perspectivas

A partir de los resultados de la inactivación de la ATPasa de protones por el NCD-4, surgen varios puntos que deben de tomarse en cuenta: es necesario mejorar la técnica de purificación de la ATPasa con el gradiente de centrifugación zonal con glicerol, para realizar estudios de cambios en la fluorescencia con la H^+ -ATPasa modificada por el NCD-4 y de esta forma conocer los cambios conformacionales que lleve a cabo la enzima durante su mecanismo catalítico. Al mismo tiempo, también deben localizarse el (los) grupo(s) carboxilos a los que se une el NCD-4 y que se ven involucrados en la formación del aducto estable N-acilurea fluorescente. El estudio de los cambios de fluorescencia en la ATPasa puede resultar de gran valor para resolver la controversia que existe en el campo de las ATPasas tipo P, en donde actualmente se debate la validez del modelo clásico E1-E2 propuesto por Jardetzki y colaboradores en 1966, pues algunos de sus postulados (como la existencia de dos y “solo dos estados conformacionales” para las P-ATPasas, y las predicciones poco acertadas para la orientación espacial y la afinidad de los iones) son puntos de fuerte debate en estos momentos (Stokes y cols, 1999). En la misma forma, se deben estudiar los cambios conformacionales a distancia que relacionan los sitios de unión a los iones y el sitio de fosforilación en las P-ATPasas. También hace falta explicar los cambios en la disposición espacial de las asas citoplásmicas y los segmentos transmembranales en función de la unión de los iones (Scarborough, 2003).

VI. CONCLUSIONES

- Las condiciones óptimas para ensayar la actividad de la H⁺-ATPasa y caracterizar la inactivación de la enzima por el NCD-4 fueron 30° C, pH 6 o 6.5 y 200 o 300 μM del inhibidor y 15% de glicerol.
- Los solventes DMSO y etanol en las concentraciones de 1 a 3%, no alteran la estabilidad de la enzima.
- El NCD-4 es un inhibidor que reacciona covalentemente con la H⁺-ATPasa, y que produce una inhibición parcial e irreversible de la enzima.
- El Mg²⁺ y el Mg-ADP potencian la inactivación de la enzima por el NCD-4.
- Los cationes monovalentes Na⁺ y K⁺ protegen a la ATPasa de la inhibición producida por el NCD-4.
- La inactivación que produce el NCD-4 sobre la ATPasa de protones es diferente a la producida por el DCCD

BIBLIOGRAFÍA

Ahlers, J. (1981) Temperature effects on kinetic properties of plasma membrane ATPase from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. BBA. 649: 550-556.

Alberts, B. B., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1994) Molecular Biology of the cell. Garland Publish, Inc. New York, 1294 pp.

Aravind, L., Galperin, M. Y., and Koonin, E. V. (1998) The catalytic domain of the P-type ATPase has the haloacid dehalogenase fold. TIBS. 23: 127-129.

Altendorf, K., Siebers, A. and Epstein, W. (1992) The KDP ATPase of *E. coli*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 671: 228-243.

Asano, S., Kamiya and Takeguchi, N. (1992) The energy transduction mechanism is different among P-type Ion-transporting ATPases. The Journal Biological Chemistry. 267. 10: 6590-6595.

Auer, M, Scarborough, G.A. and Kühlbrandt, W. (1998) Three-dimensional map of the plasma membrane H^+ -ATPase in the open conformation. Nature. 392: 840-843.

Benito, B., Portillo, F. and Laguna, R. (1992) In vivo activation of the yeast plasma membrane ATPase during nitrogen starvation. FEBS Lett. 300. 3: 271-274.

Boyer Rodney (1999) Conceptos de Bioquímica. International Thompson Editores México D. F.

Bowman, B. J., Blasco, F. and Slayman C. (1981) Purification and Characterization of the plasma membrane ATPase of *N. crassa*. J. Biol. Chem. 256. 23: 12343-12349.

Bowman, B.J., Berenski, C. J. and Jung, C. Y. (1985) J. Biol Chem. 260, 8726-8730.

Brooker R. J. and Slayman C. W. Effects of Mg^{2+} ions on the plasma membrane (H^+)-ATPase of *Neurospora crassa*. Inhibition by N-ethylmaleimide and trypsin. (1983) J. Biol. Chem. 258: 148827-8832

Carraway, K. L. and Koshlan, D. E. Jr. (1972) Carbodiimide Modification of Proteins. Methods in Enzimology. 56: 616-623.

Chadwick, C. C. and Thomas, E. W. (1983) Inactivation of sarcoplasmic reticulum ($Ca^{2+}+Mg^{2+}$)-ATPase by N-cyclohexyl-N'-(4 dimethylamino- α -naftil)carbodiimide. BBA. 730: 201-206.

Chadwick, C. C. and Thomas, E. W. (1985) Inhibition of ($Ca^{2+} Mg^{2+}$)-ATPase by carbodiimides. A structure-activity study. BBA. 827: 419-423.

Chow, D. C., and Forte, J. G. (1995) Functional significance of the b-subunit for heterodimeric p-type ATPases. *The Journal of Experimental Biology*. 198: 1-17.

Collet, J. F., and Tatusov, R. L. (1994) Human L-3-phosphatase: sequence, expression and evidence for a phosphoenzyme intermediate. *J. Mol Biol.* 408: 281-284.

Darnell, J., Lodish, H. and Baltimore, D. (1990) *Molecular cell biology*. Scientific American Books. New York. 221-226 pp.

Eraso, P., and Gancedo, C. (1987) Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* 224. : 187-192

Fanjul, M. L. De Miguel, F, Hiriart, M. Fuentes, B. (1998) *Biología funcional de los Animales*. Siglo veintiuno editores. México D. F.

Fillingame, R. H. (1980) The proton-translocating pumps of oxidative phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 1079-1113.

Ghislain, M., Sclessor, A. and Goffeau, A. (1987) Mutation of a conserved Glycine residue modifies the vanadate sensitivity of the plasma membrane from *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of Biological Chemistry*. 262: 17549-55.

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

Goldshelger R.; Tal. D. M. Moorman. J.; Stein, W. D. and Karlsh S. J. D. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* No. 89: 6911-6915.

Goormaghtigh, E., Chadwick, C., and Sacrborough, G. A. (1986) Monomers of the *Neurospora* Plasma Membrane H⁺-ATPase Catalize efficient proton translocation. *Journal of Biological Chemistry*. 261. 16: 7466-7471.

Hager, K.M., Mandala,S.M., Davenport,J.W., Speicher,D.W., Benz,E.J.Jr. and Slayman,C.W. (1986). Amino acid sequence of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*: deduction from genomic and cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83. 20: 7693-7697.

Hassinen, I. E. and Vuokila, P. T. (1993). Reaction of dicyclohexylcardoimide with mitochondrial proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1144: 107-124.

Hennessey, J. P. Jr. and Scarborough, G. A. (1990) Direct evidence for the cytoplasmic location of the NH₂- and COOH- terminal ends of the N. crassa. Plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 265. 1: 532-537.

- Hernández, A., Cooke, D. T., and Clarkson D. T. (2002) In vivo activation of plasma membrane H⁺-ATPase hydrolytic activity by complex lipid-bound unsaturated fatty acids in *Ustilago maydis*. Eur. J. Biochem. FEBS. 269: 1006-1011.
- Herrerra, T. y Ulloa, M.(1998) El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Fondo de cultura económica. UNAM. México. cfr. Cap 8.
- Jardetzky, O. (1966) Simple allosteric model for membrane pumps. Nature 211: 969-970.
- Koland, J. G., and Hammes, G. (1986) Steady state kinetic studies of purified yeast plasma membrane proton-translocating ATPase. Journal of Biological Chemistry. 261. 13: 5936-5932.
- Koonin, E. V.(1997) Evidence for a family of Archaeal ATPases. Science. 275: 1489-1490.
- Lutsenko, S. and Kaplan, J. H. (1995) Organization of P-Type ATPases: Significance of structural diversity. Biochemistry. 34. 48: 15608-15.
- Kühlbrandt, W., Zeelen, J. and Dietrich, J. (2002) Structure, mechanism and regulation of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase. Science. 297: 1692-1696.
- Malpartida, F., and Serrano, R. (1981) Proton translocation catalized by the purified yeast plasma membrane ATPase reconstituted in liposomas. FEBS Lett. 131. 2: 351-354.
- Mandala, S. and Slayman, C. (1989) The amino and carboxyl termini of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase are citoplasmically located. J. Biol. Chem. 264. 27: 16276-16281
- Mason, A. B., Kardos, T. B., and Monk B. C. (1998) Regulation and pH-dependent expression of a bilaterally truncated yeast plasma membrane H⁺-ATPase. BBA.1372:261-271.
- Mathews, C., van Holde, K. E. and Ahen (2002) Biochemistry. Second Edition. The Benjamin/ Cummings Publishing Company Inc. U.S.A.
- Means, Gary E. and Feener Robert E. (1971) Chemical modification of proteins. Holden-Day Inc. U. S. A. cfr144-148.
- Miranda, M (1993). Clonación molecular de la H⁺-ATPasa de *K. lactis*. Complementación de mutantes resistentes a bromuro de etidio con defectos en el transporte de potasio y en el bombeo de protones. Tesis de Maestría. UNAM. México.
- Miranda, M., Ramírez, J., Peña, A. and Coria R. (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. Journal of Bacteriology. May, 1995., p 2360-2367.

Morsomme, P., Slayman, C., and Goffeau, A. (2000) Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H^+ -ATPase. *BBA* 149: 133-157.

Møller, J. V., Juul, B., and Le Maire, M. (1996) Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *BBA*. 1286: 1-51.

Nakamoto, R. K., Rao, R., and Slayman C. W. (1989) Transmembrane segments of the P-type cation-transporting ATPases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*

Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2000) *Lehninger principles of Biochemistry*. Third edition Worth publishers.

Okamura, H., Denawa, M., Ohniwa, R. and Takeyasu, K. (2003) P-Type ATPase Superfamily. Evidence for critical roles for kingdom evolution. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 986: 219-223

Okorokova, A. L., Appelgren, H., Tabish, M., Okorokov, L. and Ekwall, K. (2002) The endoplasmic reticulum cation P-type ATPase Cta4p is required for control of cell shape and microtubule dynamics. *Journal of Cell Biology*. 157: 1029-1039.

Pardo, J. P. (1990) La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de los hongos. *Mensaje Bioquímico. F. Med. UNAM*. Vol XIII: 119-172.

Pardo, J. P., Martínez, F., Guerra, G., Velásquez, I., Rendón, J. L. and Mendoza, G. (1999) An alternative model for the transmembrane segments of the yeast H^+ -ATPase. *Yeast*, 15: 1585-1593.

Pedersen, P. L. and Carafoli, E. (1987) Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *TIBS*. 12.4: 146-150.

Portillo, F., Larrinoa, I. F., and Serrano, R. (1989) Deletion analysis of yeast plasma membrane H^+ -ATPase and identification of a regulatory domain at the carboxyl-terminus. *FEBS Lett.* 247. 2: 381-385.

Portillo, F., Eraso, P., and Serrano, R. (1991) Analysis of the regulatory domain of yeast plasma membrane H^+ -ATPase by directed mutagenesis and intragenic suppression. *FEBS Lett.* 287. 1. 2: 71-74.

Portillo, F. (2000) Regulation of plasma membrane H^+ -ATPase in fungi and plants. *BBA*. 1469: 31-42.

Rao, R., Nakamoto, R. K., Verjovsky-Almeidas, S. and Slayman C. W. (1992) Structure and function of the yeast plasma-membrane H^+ -ATPase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 195-192.

Scarborough, G. A. (1990) Identification of the mayor cytoplasmic regions of the *N. crassa* plasma membrane H^+ -ATPase using protein chemical techniques. *J. Biol. Chem.* 265. 25: 16145-16149.

Scarborough, G. A. (2000) Crystallization, structure and dynamics of the proton translocating P-type ATPase. *The Journal of Experimental Biology.* 203: 147-154.

Scarborough, G. A. (2003) Rethinking the P-type ATPase problem. *Trends in Biochemical Sciences.* Vol. 28; No. 11: 581-584.

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

Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C., and Fink, G. R. (1986) *Nature.* No 319: 689-693.

Serrano, R. (1988) Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *BBA.* 947: 1-28.

Serrano, R. (1993). Structure, function and regulation for plasma membrane H^+ -ATPase. *FEBS Lett.* 325; 108-111

Shilpa, V., Christian, G. F., Claude, A. J., and Davis T. W. (2002) Two distinctly localized P-type ATPases collaborate to maintain organelle homeostasis required for glycoprotein processing and quality control. *Molecular Biology of the Cell.* 21: 3955-3966.

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

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

Stockes, D. L., Taylor, W., and Green, M (1994) Structure transmembrane topology and helix packing of P-type ion pumps. *FEBS letters* 346, 32-38.

Stockes, D. L., Auer, M., Zhang, P., and Kühlbrandt, W. (1999) Comparison of H^+ -ATPase suggests that a large conformational change initiates P-type ion pump reaction cycles. *Current Biology.* 9, 13: 672-678.

Stryer Lubert. (1995) *Bioquímica.* Cuarta Edición. Editorial Reverté. Bilbao, España.

Sumbilla, C; Cantilina, T; Collins, J. H.; Malak, H; Lakowicz, J. R. and Inesi, G. (1991) Structural perturbation of the transmembrane region interferes with calcium binding by the Ca^{2+} transport ATPase. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol. 266. No. 19: 12682-12689.

Sussman, M. R. and Slayman, C. W. (1982) Modification of the *Neurospora Crassa* plasma membrane (H^+) -ATPase with N, N'-Dicyclohexylcarbodiimide. *The Journal of Biological Chemistry.* Vol 258. No. 3: 1839-1843.

Sussman, M. R., Strickler, J. E., Hager K. M. and Slayman, C. W. (1987) Location of a Dicyclohexylcarbodiimide-reactive Glutamate residue in the *Neurospora crassa* plasma membrane H⁺-ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*. 262: 4569-4573.

Sychrova, H., and Kotyk, A. (1985) Conditions of activation of yeast plasma membrane ATPase. *FEBS Lett.* 183. 1: 21-24.

Toyoshima, C., Sasabe, H and Stockes, D. L. (1993) Three-dimensional cryo-electron microscopy of the calcium ion pump in the sarcoplasmic reticulum membrane. *Nature*, 362: 469-471.

Weissman, A., Berdicevsky, I., Cavari, B. Z., and Kornitzer, D. (1999) The high copper tolerance of *Candida albicans* is mediated by a P-type ATPase. *PNAS*. 97: 3520-3525.

Velásquez López Ma. I. (1996) caracterización de la modificación química en la ATPasa de *Kluyveromyces lactis* por carbodiimidias. Tesis de maestría UNAM México.

Voet, D., and Voet, J. (1995) *Biochemistry*. John Wiley and Sons Inc. C. A. U.S.A.

William, J. R. and Koshland D. E. Jr. (1961) A Method for characterizing the type and number of groups involved in enzyme action. *The Journal of Biochemical Chemistry*. 263. 7: 1973-1979.