

204.4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Instituto de Fisiología Celular

"INHIBICION POR Ca^{2+} DE LA H^+ ATPasa DE MEMBRANA
PLASMATICA DE S. cerevisiae"

T E S I S

que para obtener el titulo de
Licenciado en Investigación Biomédica Básica

P r e s e n t a
HIRAM OLIVERA DIAZ

1 9 8 7



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

Introducción.	
1. Generalidades	1
2. Las levaduras	4
3. La H ⁺ ATPasa de membrana plasmática de levadura.....	4
4. Características generales de la H ⁺ ATPasa	8
4.1 Efecto del pH	8
4.2 Especificidad de sustrato	9
4.3 Afinidad por el sustrato	10
4.4 Efecto de cationes divalentes	10
4.5 Efecto de los cationes monovalentes	11
4.6 Efecto de inhibidores	11
5. El calcio como modulador biológico.	
5.1 Generalidades	13
5.2 Calcio en levaduras	14
6. Objetivos	15
Materiales	18
Metodología.	
1. Activación de las células	19
2. Aislamiento de la membrana plasmática.	
2.1 Método utilizado	19
2.2 Pureza de la preparación	25
3. Determinación de proteína	26
4. Determinación de actividad	26
5. Cálculos de iones metálicos libres y complejos metal-ligando en soluciones	28
6. Constantes de disociación	29
7. Método para eliminar calmodulina de las membranas	31
Resultados y Discusión.	
1. Inhibición por calcio de la H ⁺ ATPasa.	
1.1 Determinación	32
1.2 Variabilidad en el valor de la inhibición	32
1.3 El EGTA no afectó a la ATPasa	34
2. Naturaleza de la inhibición	34
2.1 Efecto de antagonistas de calmodulina	37
2.2 Efecto del método para eliminar la calmodulina	39
2.3 Efecto de la calmodulina	40
2.4 Significado de la inhibición	42
3. Efecto del pH y la fuerza iónica.	
3.1 Efecto del pH	46
3.2 Efecto de la fuerza iónica	48
3.3 Efecto del potasio	50

4. Efecto del magnesio en la actividad de la ATPasa.	
4.1 Antecedentes	54
4.2 Resultados de las cinéticas	59
4.3 Como explicar con un solo sitio la activación y la inhibición	63
4.4 Afinidad de la enzima por el magnesio	64
4.5 Perspectivas	66

5. Conclusiones

ABREVIATURAS USADAS

ATP	adenosin 5'trifosfato.
ADP	adenosin 5'difosfato
ATPasa	adenosin trifosfatasa
AMP	adenosin monofosfato
DCCD	diciclohexilcarbodiimida
Dio-9	un antibiótico de estructura desconocida
EDTA	etilendiaminotetraacético
EGTA	etilenglicol N,N,N',N',bis-beta aminoetileter
F ₁	sector soluble de la ATP sintetasa.
F ₀	sector membranal de la ATP sintetasa.
FCCF	cianuro de fluorcarbonilfenilhidrazona.
GTP	guanidin trifosfato
H ⁺ ATPasa	ATPasa de protones
HEPES	acido N-2-Hidroxietilpiperazina-n'-2- etanosulfonico
MES	acido 2(N-morfolin) etanosulfonico
Pi	Fosfato inorgánico.
PMSF	fenilmetilsulfonilfluoruro
TCA	acido tricloroacético
TEA	trietañolamina
TFP	trifluoperazina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

I N T R O D U C C I O N

1. Generalidades.

Una de las características más importantes que comparten todas las células, es la presencia de la membrana plasmática. Esta es una bicapa lipídica que limita el espacio intracelular y lo separa del medio en que la célula se encuentra. De hecho uno de los resultados que ha tenido más repercusión en la comprensión del origen de la vida, es la demostración de que los fosfolípidos, sometidos a tratamientos bastante simples, pueden formar espontáneamente vesículas perfectamente selladas.

Las ventajas que representa para la célula el tener su espacio delimitado por una membrana son muy evidentes, ya que es más fácil mantener ese espacio en las condiciones adecuadas para optimizar los fenómenos bioquímicos a los que está ligada su existencia.

Ahora bien, aislarse con una membrana lipídica puede ser una mala estrategia, ya que las moléculas que la atraviesan libremente se van a distribuir a la misma concentración a ambos lados, y en cambio la membrana podría limitar y hasta impedir el paso de otras sustancias esenciales para la célula. Frente a estos inconvenientes las células a todo lo largo de la escala filogenética han desarrollado estrategias que incluyen sistemas para transportar, incluso contra gradientes de concentración, los diferentes metabolitos que requieren, y sistemas para

suministrar energía a estos mecanismos de transporte.

Generalmente para suministrar energía a los sistemas de transporte las células energizan sus membranas, construyendo a través de ellas un gradiente de iones, a las moléculas encargadas de esta función se les llama translocadores primarios, porque utilizan energía contenida en enlaces químicos para transportar el ión a través de la membrana, mientras que a los otros se les denomina translocadores secundarios porque utilizan la energía almacenada en el gradiente formado por los translocadores primarios para transportar los diferentes metabolitos.

La energía contenida en el gradiente cuando se trata de un solo ión se puede conocer aplicando la ecuación.

$$\Delta \hat{G}_i = RT \ln \frac{[i \text{ ón}]_{\text{ext}}}{[i \text{ ón}]_{\text{int}}} + ZiF \Delta \psi$$

donde R es la cte. general de los gases, T es la temperatura en grados Kelvin, F es la cte. de Faraday, Z es la valencia del ión y $\Delta \psi$ es el potencial electroquímico.

La energía del gradiente tiene dos componentes. Uno químico que depende de las concentraciones del ión a ambos lados de la membrana, y otro eléctrico que depende de la distribución de las cargas.

En la naturaleza encontramos que las células utilizan diversas fuentes de energía para sus translocadores primarios. En unos casos utilizan la energía que proviene de reacciones de oxidación-reducción; este es el caso de la citocromo oxidasa de la

mitocondria y del centro de reaccion de los organismos fotosinteticos (fig. 1A). En otros utiliza la energia almacenada en las moléculas de ATP (fig. 1C), esto es el caso de las ATPasas de membrana, de las cuales se conocen dos tipos.

Las ATPasas clase I son dependientes de Mg^{2+} y están compuestas de varias proteínas integrales y periféricas, tienen al menos 6 tipos diferentes de polipeptidos que se encuentran organizadas en 2 sectores: el sector F_1 que sale de la membrana y se puede separar de esta por metodos fisicos, es la parte que hidroliza el ATP; y el F_0 o sector hidrofóbico, que está integrado a la membrana y tiene la capacidad de translocar protones.

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

Las ATPasas clase II tambien son dependientes de Mg^{2+} , pero se pueden estimular con otros cationes. Estas enzimas tienen una sola subunidad que pesa alrededor de 100,000 daltones, forman un intermediario fosforilado inestable durante la hidrólisis, y están involucradas en la translocación de iones y el mantenimiento de gradientes de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y H^+ . Este es el tipo de enzimas cuya función es energizar las membranas a expensas de ATP.

2. Las Levaduras.

Las levaduras son microorganismos unicelulares eucariotes que se encuentran clasificadas dentro del reino Fungi. Son probablemente los primeros microorganismos que el hombre utilizó en procesos como la elaboración de cerveza, vino y pan.

También de gran relevancia ha sido su participación dentro del desarrollo de la investigación científica, pues fue en las levaduras donde se comenzaron los estudios que nos han llevado a comprender muchos de los procesos que ahora forman parte de nuestros conocimientos de bioquímica.

En la actualidad la levadura es uno de los microorganismos mejor conocidos y más estudiados, y gracias a que se conoce con detalle su metabolismo, se los puede cultivar y manipular con facilidad, se cuenta con un buen sistema genético y se les puede aplicar muy bien las herramientas de la biología molecular; se ha convertido en uno de los modelos más utilizados tanto para realizar investigación básica como para aplicaciones biotecnológicas.

3. La H⁺ATPasa de Membrana Plasmática de S. cerevisiae.

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

En 1950 Conway y colaboradores confirmaron que durante la fermentación de la glucosa la levadura realiza una producción masiva de protones que acidifica rápidamente el medio. Conway propuso que el responsable de ese bombeo de protones, podía ser un catalizador metálico redox, localizado en la membrana plasmática del microorganismo, que expulsaría los protones al medio y donaría los electrones a algún aceptor intracelular (fig. 1A). Posteriormente Slayman & Slayman (1970) pudieron medir un intercambio H^+/K^+ y propusieron la existencia de un acarreador electroneutro basándose en determinaciones de los flujos de Na^+ , K^+ y H^+ (Fig. 1B); esta proposición tiene la desventaja de que no explica cómo se acopla la energía al proceso.

Por otro lado, Eddis and Indge en 1962 propusieron la existencia de una actividad de ATPasa en la membrana plasmática y trataron de medirla sin éxito. La presencia de esta actividad fue demostrada por primera vez por Matile y col. (1967 y 1970), y posteriormente por Nurminen (1970 y 1976), Schibeci (1973) y Fuhrmann (1974).

Finalmente, la relación entre la actividad de ATPasa y el bombeo de protones fue propuesta por Peña y cols. Al estudiar los efectos del K^+ y el pH en la glucólisis y la respiración, observaron que al añadir potasio o aumentar el pH del medio de incubación se produce una aceleración de la glucólisis y la respiración (Peña 1967), debida a una disminución en las pozas de ATP y a un aumento en las de ADP y fosfato (Peña 1967 y 1972).

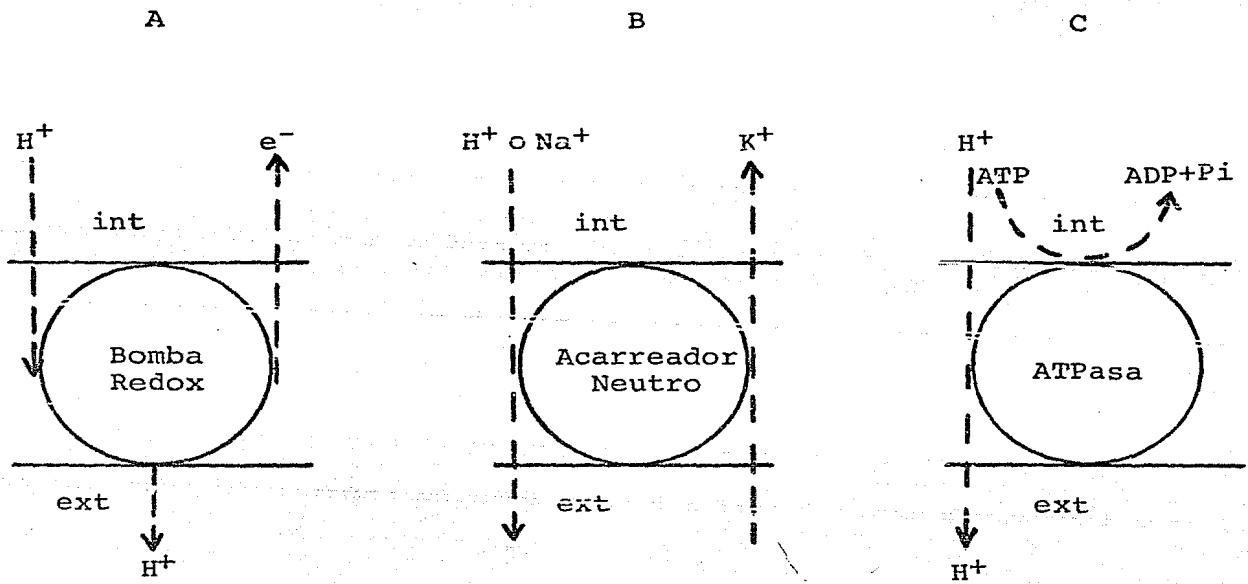


Figura 1. A) Hipótesis redox de Conway
 B) Intercambio electroneutro.
 C) Bomba electrogénica.

A partir de esos datos se propuso que la hidrólisis de ATP que se observaba era producida por una ATPasa anisotrópica semejante a la propuesta por Mitchel en 1951 para la mitocondria y que estaba acoplado a un mecanismo que expulsa protones al medio (fig. 10).

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

Posteriormente Soriano (1980) demostró que diferentes drogas que inhiben la ATPasa *in vitro*, también inhiben el bombeo de protones *in vivo*. Estos experimentos fueron realizados con cepas de levadura deficientes respiratorias para evitar artefactos debidos a efectos de las drogas en la ATPasa mitocondrial.

Otros estudios han demostrado que el transporte de metabolitos como aminoácidos, azúcares, y fosfato se lleva a cabo por cotransporte con protón (Cockburn M. 1973 y Gaaston A. 1973). Esto indica la existencia de un mecanismo quimiosmótico de acoplamiento de energía semejante al propuesto por Mitchel. En

este caso la energía generada por la hidrólisis del ATP, es empleada por la bomba para generar el gradiente, y este es utilizado por los acarreadores para transportar los diferentes metabolitos al interior de la célula.

4. Características generales de la H⁺ATPasa.

En la actualidad, la H⁺ATPasa ha sido objeto de numerosos estudios realizados por diferentes grupos; se ha purificado a partir de difentes microorganismos como N. crassa (Addison 1981), Schizosaccharomyces Pombe (Dufour 1979) y S. cerevisiae (Malpartida 1979 y 1981 y Foury 1981). Se ha reconstituido en liposomas y su actividad como bomba electrogénica de protones dependiente de ATP ha sido perfectamente demostrada (Malpartida 1980, Dufour 1982A y B, Villalobo 1981 y 1982 y Perlin 1984). Así mismo se han analizado sus propiedades como con la respuesta al pH, especificidad y afinidad de sustrato, efecto de cationes mono y divalentes y sensibilidad a diferentes inhibidores. Estos estudios se han realizado tanto con la enzima purificada como con la enzima ligada a membrana, y los resultados se han comparado con los obtenidos en ATPasas de otros microorganismos y de otros organelos de la levadura. A continuación presentará un breve resumen de lo que hasta el momento se puede encontrar en la literatura sobre esta enzima.

4.1. Efecto del pH en la actividad de la H⁺ATPasa.

Los trabajos en donde se ha analizado la respuesta de la H⁺ATPasa de S. cerevisiae a diferentes pH, han dado resultados

muy variados indicando diferentes valores para el pH óptimo.

En 1979 Peters reporta un valor de 5.0 y Willaby reporta un valor de 5.5; Borst-Pauwels en 1981 indica un pH óptimo de 5.8, pero señala que este valor puede variar si se utiliza ATP contaminado con Vanadato. Finalmente Serrano, en 1983 encuentra que si se preincuban las células con glucosa antes de extraer la ATPasa, el pH óptimo para la enzima puede cambiar de 5.7 a 6.6.

Para otras levaduras los valores reportados son los siguientes: 5.0 para Sch. pombe (Duffour y col. 1977), 6.4 para Candida tropicalis (Blasco F. y col. 1981) y 7.0 y 6.0 respectivamente, en ausencia y en presencia de concentraciones muy pequeñas de vanadato para H. crassa (Bowman & Glayman 1979).

La explicación que se ha propuesto para estas variaciones en el pH óptimo reportado, es que se deban a diferencias en las condiciones experimentales, o a contaminación con ATPasa mitocondrial o vacuolar (Goffeau & Glayman 1981). Los valores de pH óptimo reportados para estas dos enzimas son de 7.0 para la mitocondrial y 7.0 y 7.5 para la vacuolar (Peters 1979, Makinuma 1981 y Blasco 1981).

4.2. Especificidad de sustrato.

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

4.3. Afinidad por el sustrato.

A partir de estudios cinéticos es ahora bastante claro que, lo mismo que para otras ATPasas el sustrato de la ATPasa de membrana plasmática es el complejo Mg-ATP (Scarborough 1977 y Delhez 1977), y las constantes de afinidad (K_m) calculadas oscilan entre 0.05 μ M. (Borst-Pauwels 1981) y 1.7 μ M. (Nillsky 1978). Según Ahlers (1981) las diferencias en las K_m reportadas son debidas a que a ciertas concentraciones el Mg^{2+} libre ejerce un efecto de inhibición pseudocompetitiva disminuyendo la afinidad de la ATPasa por el sustrato.

4.4. Efecto de Cationes Divalentes.

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

Ademas de formar parte del sustrato de la enzima se requiere la presencia de iones Mg^{2+} libres para detectar actividad de hidrólisis.

Hay que notar sin embargo que, en presencia de Mg^{2+} , el Zn^{2+} y el Ca^{2+} actúan inhibiendo la enzima, e inclusive el Mg^{2+} si se encuentra presente en altas concentraciones tiene un efecto

inhibitorio.

Es debido a este comportamiento bifásico del Mg^{2+} que se ha propuesto la existencia de 2 sitios alostéricos para magnesio en la ATPasa, uno de alta afinidad que activa la enzima y uno de baja afinidad que la inhibe. Posteriormente en este trabajo tratamos de explicar la doble conducta del Mg^{2+} proponiendo un solo sitio y estudiáramos con profundidad el efecto inhibitorio del calcio.

4.5. Efecto de los cationes monovalentes.

Casi todos los grupos que trabajan con esta ATPasa han encontrado efectos activadores de cationes monovalentes en la actividad de la enzima. Algunos han reportado que el K^{+} tiene un efecto específico y que además la protege de ciertos inhibidores (Beret-Pauwels 1981 y Malpartida 1980 y Villalobo 1982), estos resultados han dado lugar a la idea propuesta originalmente por Malpartida y Serrano (1980) y continuada por Villalobo (1981 y 1982) de que la ATPasa tiene la función de realizar un intercambio H^{+}/K^{+} . Sin embargo, el grupo de Slaysan utilizando la ATPasa de neurospora encontró que no se puede observar un aumento del potencial generado por la enzima en presencia de potasio cuando se compara con el efecto de otros cationes monovalentes (Berlin 1984).

4.6. Efecto de inhibidores.

El uso de inhibidores en el estudio de enzimas ha permitido llegar a un mejor conocimiento de sus mecanismos y ha facilitado

su manejo. Por esta razón se han realizado muchos estudios de la H⁺ATPasa utilizando compuestos que se sabe que inhiben otras ATPasas; por ahora se conoce con mayor o menor detalle el efecto de los siguientes:

La Oligomicina, la Azida de Sodio y la Venturicida, inhiben específicamente a la ATPasa mitocondrial y no afectan a la de membrana plasmática.

El CCCD (50 μ M.), Dio-9 (19 μ g./ml.), el NaF (2 mM.), la Quercetina y el p-Cloromercuribencensulfonato inhiben inespecíficamente tanto la ATPasa mitocondrial como la de membrana plasmática.

Finalmente el Ortovanadato (11 μ M.) y el Dietilstilbestrol (27 μ M.) son inhibidores específicos que no tienen efecto sobre la ATPasa mitocondrial. De estos, el ortovanadato ha recibido mayor atención, debido principalmente a que ciertos lotes de ATP de algunas marcas estaban contaminados con este compuesto, y esto en un tiempo alteró los resultados obtenidos por algunos grupos (Borst-Pauwels 1981).

Recientemente se ha encontrado que algunos derivados de la fenotiazina como la Trifluoperazina (TFP), conocidos tradicionalmente como inhibidores de la calmodulina inhiben la H⁺ATPasa de membrana plasmática (Eylan 1984). Nosotros hemos visto que también el calmidazolium (otro inhibidor de calmodulina) inhibe a la enzima. Todavía no se conoce el significado de estas inhibiciones.

5. El Ca^{2+} como modulador biológico.

5.1 Generalidades.

Las concentraciones reportadas de calcio libre en el citosol se encuentran en un rango de $< 1 \mu M$, para células que no han recibido algún estímulo, mientras que en el medio extracelular suelen ser mayores a $100 \mu M$. Esta diferencia de concentraciones entre el espacio intracelular y el externo forma a través de la membrana plasmática un gradiente muy pronunciado de iones Ca^{2+} .

Las células trabajan incesantemente para mantener este gradiente entre el citoplasma y el medio externo. Para esto utilizan ATPasas de calcio y otros mecanismos de transporte que compartimentalizan el calcio en organelos o lo expulsan de la célula (Becker 1980, Benedetti 1987, Carafoli 1974 y Ellam 1982).

Existen una serie de agentes que van a perturbar este gradiente mediante mecanismos específicos. Cuando la célula recibe uno de estos estímulos, van a ocurrir una serie de cambios conducentes a disipar parte de este gradiente de calcio. Los mecanismos incluyen disminuir la velocidad de los sistemas que lo compartimentalizan o excluyen de la célula, y/o abrir canales que permitan el paso al citoplasma del calcio externo o de los organelos. Cuando esto ocurre la concentración en el citoplasma aumenta hasta unos $10 \mu M$, lo cual hace que una gran cantidad de enzimas, que tienen manera de sentir esos cambios de concentración, alteren su actividad. Los agentes que causan estas perturbaciones pueden ser hormonas, neurotransmisores o algunos tipo de señales internas.

Las funciones reguladas mediante este sistema son muy diversas, algunos ejemplos bien documentados son la contracción muscular, secreción de hormonas y péptidos, alteraciones en el transporte de iones, liberación de neurotransmisores, etc. (Rasmussen 1984 y Monteiinger 1977). También se ha propuesto que el calcio actúa en forma coordinada con el AMP cíclico para regular procesos del ciclo celular (Rebhan 1973 y Whitfield 1980).

Por otro lado se sabe que, en muchos casos, las interacciones del calcio con las enzimas que regula no ocurren en forma directa sino que están mediadas por unas proteínas conocidas como "proteínas moduladoras dependientes de Ca^{2+} ". De estas quizá la más conocida y estudiada sea la Calmodulina, de la cual se ha demostrado que regula un enorme número de procesos (Means 1982). Sin embargo, es necesario mantener presente que se conocen muchas otras proteínas que desempeñan esta función.

5.2. Calcio en las levaduras.

En levaduras se ha demostrado la existencia de proteínas semejantes a calmodulina (Nakamura 1984 y Hubbard 1982), y se ha demostrado por métodos genéticos y bioquímicos que el calcio está involucrado en la regulación del ciclo de división celular (Duffus 1974, Saavedra-Molina 1983 y Ohya 1984), en la polimerización de actina (Creer 1982) y en la respuesta a hormonas (Miyakawa 1986). Sin embargo, el conocimiento en esta área puede decirse que avanza con relativa lentitud.

4. Objetivos.

A pesar de que se sabe que en presencia de magnesio libre el ión Ca^{2+} en altas concentraciones inhibe la actividad de hidrólisis de la H⁺ATPasa de membrana plasmática de la levadura Saccharomyces cerevisiae, en la literatura no aparece ningún reporte de los efectos del calcio a concentraciones fisiológicas que son las que nos interesan. Por esa razón el primer objetivo de este trabajo fué caracterizar el efecto del calcio a concentraciones en el rango micromolar sobre nuestra enzima.

Para analizar dicho efecto, utilizamos amortiguadores Ca-EGTA porque en condiciones normales en los laboratorios, las concentraciones de calcio presentes como contaminante en las soluciones se encuentran en la parte más alta del rango que nos propusimos estudiar. Encontramos que la ATPasa se inhibe un alto porcentaje en ese rango de concentraciones, se probó que el uso de los amortiguadores Ca-EGTA no tuviera efectos colaterales que nos pudieran explicar la inhibición observada. Se encontró también que la inhibición no es una característica propia de la enzima, sino que aparentemente le es conferida por algún modulador al cual aún no hemos logrado identificar.

Existe un reporte (Ahlers 1981) donde se ve que muchas sales utilizadas comúnmente en los ensayos de la ATPasa tienen efectos sobre la enzima (Tabla 1), como nosotros estábamos trabajando con sales existía la probabilidad de que el efecto del calcio tuviera que ver con los reportados por Ahlers. Por esa razón decidimos analizar los efectos de esas sales, ver como se relacionaban con

Tabla 1. Efecto de diferentes sales sobre la actividad de la H⁺ATPasa. (tomada de Ahlers 1981)

Sal utilizada, (50mM.)	Actividad relativa (%).	
	Tricina (pH7.5)	MOFS (pH6.0)
Control	100 (0.14 U/mg)	100 (0.28 U/mg)
KCl	400 ±50	340 ±60
NaCl	370 ±30	330 ±50
LiCl	360 ±30	340 ±40
Tris-Cl	350 ±40	
KNO ₃	460 ±30	280 ±60
NaNO ₃	320 ±50	230 ±40
K ₂ SO ₄	300 ±60	270 ±40
Na ₂ SO ₄	270 ±25	240 ±50
CaCl ₂ (1mM)	55±05	57±05

El experimento fue realizado en 20 mM. de amortiguador tricina, con 0.2 mM. de MgCl₂ y 0.4 mM. de ATP.

la inhibición por calcio y además comprobar si todos esos efectos serían debidos a cambios de la fuerza iónica en el ensayo. Encontramos que efectivamente las sales modificaron la actividad de la H⁺ATPase y las modificaciones observadas fueron efecto de fuerza iónica. Sin embargo el efecto del calcio sí fue específico.

Finalmente decidimos analizar el efecto del Mg²⁺ libre sobre la actividad de nuestra enzima. Como se mencionó en la parte correspondiente a cationes divalentes, el efecto de este catión sobre la enzima ya ha sido estudiado previamente (Ahlers 1981, Borst-Pauwels 1981). Sin embargo en ninguno de los reportes que hemos encontrado se ha tomado en cuenta que la actividad de la H⁺ATPase se ve afectada por cambios en la concentración de calcio libre y en la fuerza iónica, y estos dos parámetros se alteran cuando se varían las concentraciones de Mg²⁺ y Mg-ATP en las condiciones experimentales utilizadas por los autores mencionados. Por esa razón decidimos analizar nuevamente los efectos del magnesio en la H⁺ATPase cuando se mantienen constantes tanto la concentración de calcio libre como la fuerza iónica. Posteriormente mostraremos que, como se esperaba, los resultados obtenidos en estas condiciones difieren de los reportados anteriormente y discutiremos el significado de esas diferencias.

M A T E R I A L E S

La levadura utilizada fue obtenida de "La AZteca S. A. de C.

v.

Los acidos clorhídrico y acético, el imidazol y el sulfato de amonio fueron comprados a Merck.

La trietanolamina y el acido tricloroacético fueron de J. T. Baker S. A.

Utilizamos ATP libre de vanadato, este y todos los demas reactivos usados en este trabajo fueron de Sigma Chemical Company.

MÉTODOS: CONTINUA

1. Activación de las células.

La actividad de la H⁺ATPase de la membrana plasmática de S. cerevisiae se desaparece rápidamente cuando las células se encuentran en ausencia de glucosa (Serrano 1983), por lo tanto 100 gr. de levadura de panadería obtenida de "LA AZTECA S. A." se incubaron durante una hora en 500 ml. de un medio conteniendo:

Sacarosa	0.0 %
K ₂ HPO ₄	0.2 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2 %
CaCl ₂	1 mM.

antes de proceder a la purificación de las membranas. Las levaduras convierten rápidamente la sacarosa en glucosa lo que nos permite obtener una actividad elevada de ATPase en nuestras membranas.

2. Aislamiento de la Membrana Plasmática.

2.1. Método utilizado.

La membrana se aisló utilizando una modificación del método de Franzusoff y Cirillo (1983), que se encuentra esquematizado en la figura 2. A este método le realizamos algunas modificaciones para adaptarlo a nuestras necesidades. El método finalmente utilizado por nosotros se encuentra esquematizado en la figura 3.

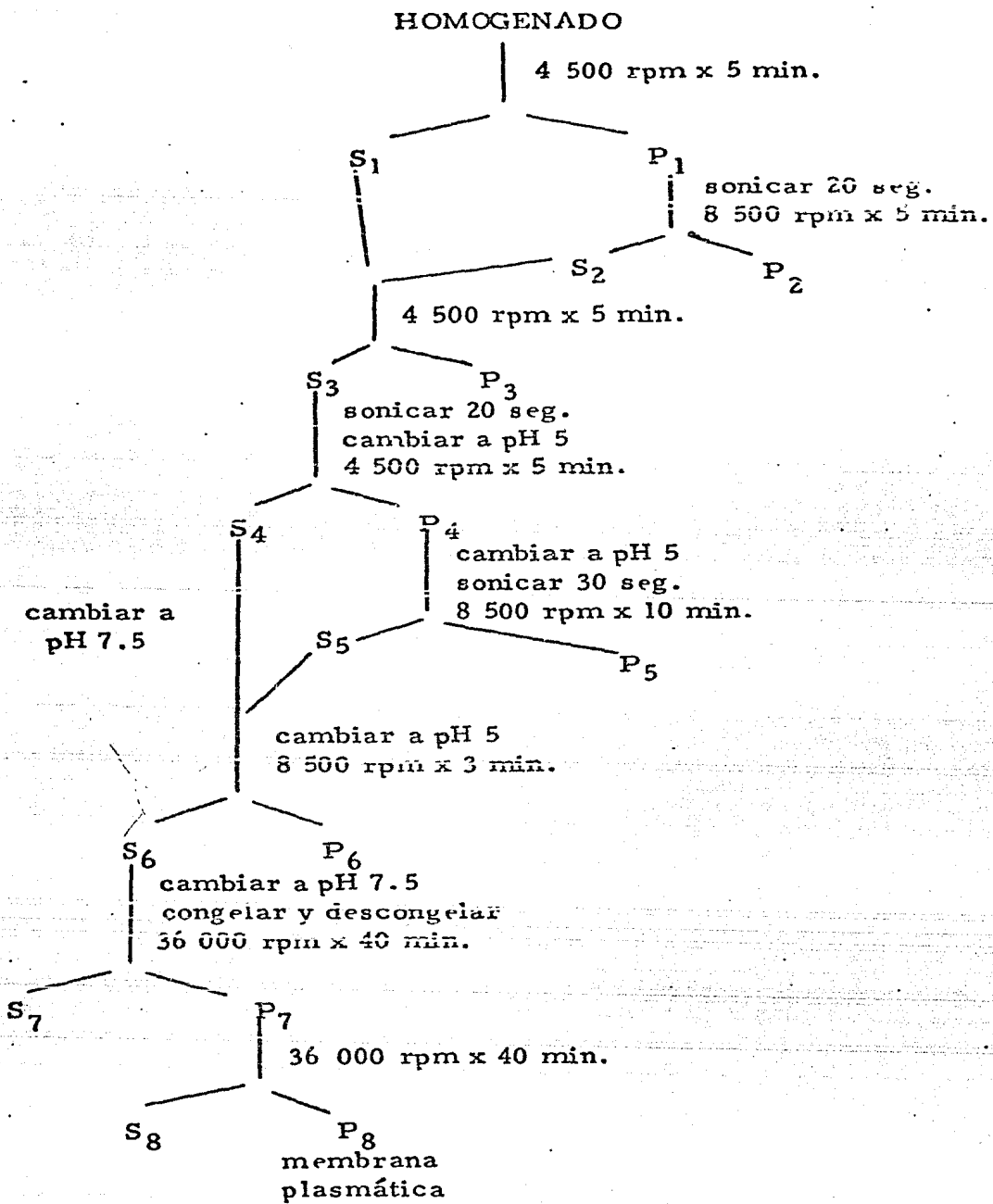


Figura 2. Aislamiento de la membrana plasmática .
Metodo utilizado por Franzusoff y Cirillo (1983).

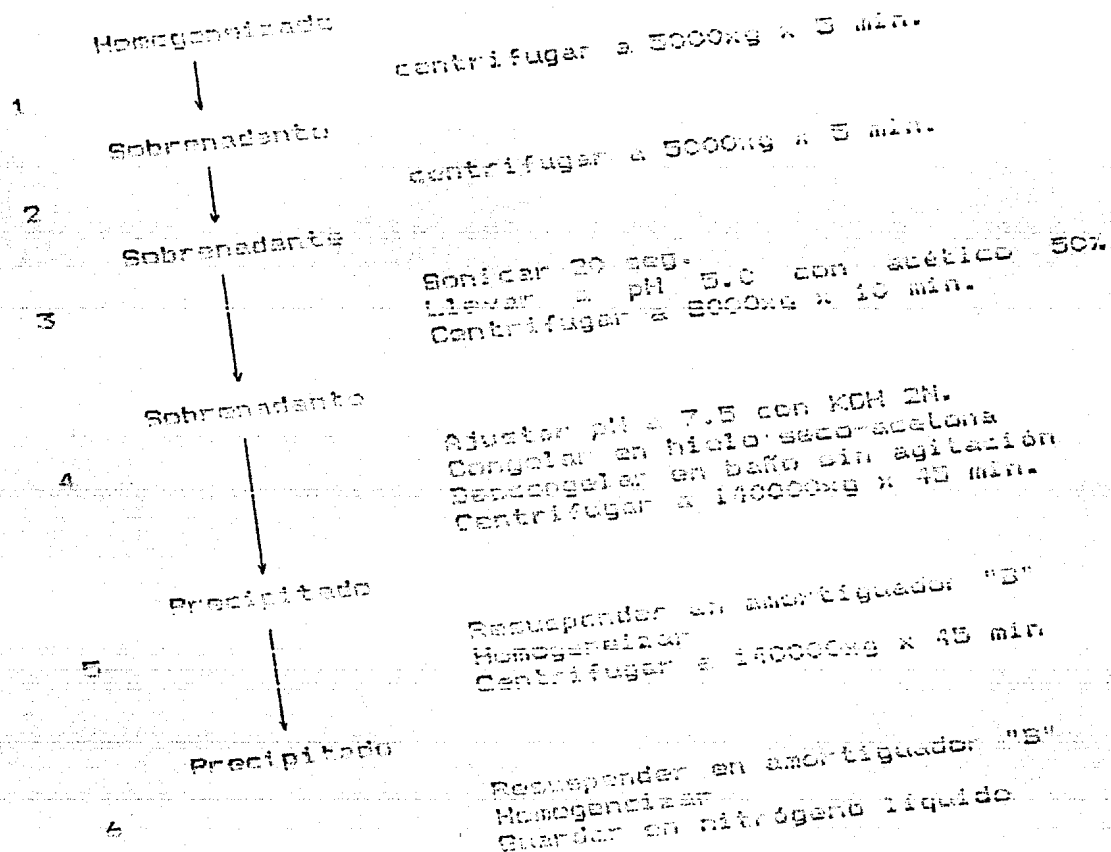


Figura 3. Método que utilizamos para el aislamiento de la Membrana plasmática.

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

Amortiguador "A".

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

Inmediatamente despues las células fueron resuspendidas en 100ml. de amortiguador "A" por cada 75gr. de células, y se procedió a romperlas, en un homogenizador B. Braun Nelsungen A. 6. enfriado con CO₂, durante 30-45 seg. con perlas de vidrio de 0.45-0.5mm.

Despues de romper, se separó el homogenado de las perlas y se lavó a estas ultimas con amortiguador "A", usando 1/5 del volumen total homogenado, para recuperar la parte del homogenado que se les queda adherida. Las dos fracciones así obtenidas se mezclan y se les sometió al procedimiento descrito a continuación e ilustrado en la figura 3.

El homogenizado se centrifugó durante 5 min. a 3000xg, se utilizó la centrifuga Servall RC-5B con el rotor SSS4 a 3500rpm.,

1. Fenil metil sulfonyl-fluoruro, un inhibidor de proteasas.

en esta centrifugación se obtiene un precipitado grande formado principalmente por nucleos y células que no se rompió en. La membrana plasmática queda en el sobrenadante el cual conservamos. Esta centrifugación se repitió para obtener un sobrenadante mas limpio.

El sobrenadante de la segunda centrifugación se sonicó durante 30seg. en fracciones de 15 ml. en un sonicador de batido Braunson modelo B-12, el resultado final de la purificación no se alteró cuando se utilizaron otros sonicadores de batido o un sonicador de baño de Laboratory Supplies Company Inc. modelo G1126PIT. Sin embargo si se omite la sonicación las membranas obtenidas al final nos dan valores de proteína muy altos y por lo mismo actividades específicas mas bajas.

Despues de sonicado, se le ajustó el pH a 5.01 con una solución de acético al 50%, este paso es sumamente critico. Si el pH se va por abajo de 5.00, la ATPasa de la membrana plasmática se inactiva rapidamente, y por otro lado, si el pH no se baja lo suficiente, la preparación final quedará contaminada con membranas mitocondriales. Es importante notar que el sobrenadante ajustado a pH 5.01 queda turbio, lo que nos indica que las membranas mitocondriales se han precipitado.

El sobrenadante turbio se le sometió a una centrifugación durante 10 min. a 8000g. Se descartó el precipitado que contiene las mitocondrias y el sobrenadante se le ajustó el pH a 7.0 con NaOH 2N. se congeló en hielo como acetona y se dejó descongelar en un baño a temperatura ambiente sin agitación. Una vez

descongelado se centrifugó durante 45 min. a 140,000xg en una ultracentrífuga Beckman L5M en el rotor 45Ti (37,500rpm). La membrana plasmática se recuperó en el precipitado, se resuspendió en amortiguador "B", y se homogenizó utilizando un pequeño homogenizador de vidrio (volumen máximo de trabajo 2.5ml).

Amortiguador "B"

Sacarosa	250 mM.
Tris	20 mM.
EDTA	1 mM.
PMSF	1 mM.
HTEA	→ pH 7.5

Las membranas se llevaron a un volumen de unos 50ml. y se centrifugaron nuevamente 45 min. a 140,000xg. Posteriormente se volvieron a resuspender y homogenizar utilizando ahora el mínimo volumen de amortiguador posible, lo cual da una concentración final de entre 10 y 25 mg. de proteína por ml., y finalmente se almacenaron en nitrógeno líquido.

Comparando los resultados obtenidos usando la modificación aquí descrita (Fig. 3), con los obtenidos con el método original para la obtención de membranas (Fig. 2), encontramos lo siguiente:

a) La modificación que utilizamos nos permite obtener las membranas en un tiempo más corto. Esto nos permite obtener una ATPasa más activa.

b) La H⁺ATPasa es muy inestable a pH 5.00, y si el pH baja un

como mas (digamos a 4.0) es inactiva rapidamente. En la modificación que utilizamos el pH se lleva a 5.0 solamente en una ocasión, lo que reduce el tiempo que la enzima debe permanecer a ese pH, y nos permite obtener al final la ATPasa en mejores condiciones.

a) Se obtiene un menor rendimiento. Esta es la desventaja de nuestro estado, y se debe a que en el método original se recupera la membrana que queda atrapada en los precipitados P1 y P4 (1, 3 de nuestra modificación) que son muy grandes. La membrana plasmática que quedó atrapada en esos precipitados fue aproximadamente un 50% del total en dos experimentos en los que la recuperamos por separado.

Debido a que el tema de la leucina es la H⁺-ATPasa, optamos por tener una mayor actividad específica aún a costa de obtener una menor cantidad de membranas por aislamiento.

2.1 Pureza de la preparación obtenida.

La pureza de la preparación obtenida se comprobó en forma muy simple. Existen tres ATPasas descritas en levaduras: la ATPasa mitocondrial, la de membrana plasmática y la vacuolar. De estas tres enzimas la única resistente a oligomicina es la de membrana plasmática, por lo tanto cuando existieron dudas de la pureza de la preparación simplemente se determinó la actividad de ATPasa resistente a oligomicina y esta fue usualmente mayor al 70% de la actividad total.

3. Determinación de proteína.

Las determinaciones de proteína se hicieron utilizando la técnica de Bradford (1976). Las reacciones se llevaron a cabo en un alj. se leyó la absorbancia a 595nm., y se utilizó una curva patrón de albúmina de suero bovino. Cuando existió incertidumbre de las determinaciones se hicieron determinaciones paralelas con la técnica de Lowry (1951), los resultados siempre fueron constantes, aunque la técnica de Bradford da un valor doble que la de Lowry. Los cálculos se realizaron tomando en cuenta los valores obtenidos con Bradford.

4. Determinación de la Actividad de la NTPasa.

La NTPasa de la membrana plasmática de levadura cataliza la siguiente reacción:



en donde el valor exacto de "n" se da por la estequiometría Nt/ATP de la reacción que no se conoce con exactitud.

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

acoplar a la reacción un sistema que reduce NAD (este método permite monitorear en forma continua la actividad) o simplemente determinar el fosfato por métodos colorimétricos. En el laboratorio decidimos utilizar esta última opción.

Las actividades de ATPasa de las diferentes preparaciones se determinaron en un volumen de 350 μ l. El ensayo normal contenía lo siguiente: 25.0 mM HEPES, 50.0 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1.0 mM EGTA, 9.07 mM ATP; Mas TEA suficiente para ajustar el pH a 7.0 (este nos da a 2500; una concentración de 2.5 mM de Mg-ATP y 100 μ M de Mg libre).

La reacción se inició agregando entre 10 y 100 μ g. de proteína de la membrana plasmática. Se incubó a 25°C de 2 a 10 minutos, y la reacción se detuvo adicionando 300 μ l. de ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm. en una centrífuga clínica durante 5 minutos, y se tomaron alícuotas del sobrenadante para determinar fosfatos por el método de Fiske y Subba-Row (1925). La actividad se expresa como μ moles de fosfato liberado por minuto por miligramo de proteína.

Para los experimentos con inhibidores y calmodulina se incubaron juntas la membrana y los inhibidores o la calmodulina durante 15 minutos a temperatura ambiente; después se determinó la actividad.

Para los experimentos en que se utilizaron concentraciones o fuerzas iónicas variables, se prepararon soluciones stock concentradas de cada uno de los componentes de la mezcla de reacción y se adicionaron para obtener las concentraciones

totales indicadas según los cálculos que se mencionan a continuación.

5. Cálculos de las concentraciones de iones metálicos libres y complejos Metal-ligando en soluciones.

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

Este juego consta de tres programas.

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

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

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

El segundo programa, dadas las concentraciones de cationes libres y complejos metal-ligando dadas, utiliza las constantes

de disociación aparentes obtenidas con el primer programa para calcular las concentraciones totales que debe llevar el ensayo. Además, dada una fuerza iónica, calcula la cantidad de NaCl que se debe agregar al ensayo para obtenerla y recalcula todas las demás concentraciones totales tomando en cuenta las posibles asociaciones At-Cligando.

El tercer programa realiza exactamente la función inversa, teniendo las concentraciones totales y las constantes de disociación, calcula las concentraciones de los complejos y de los cationes libres. Su utilidad principal es revisar los resultados obtenidos con el programa dos y probar diferentes juegos de constantes para ver que tan diferentes podrían ser las concentraciones libres si nuestras constantes fueran incorrectas. Este programa es especial, es muy lento (30 minutos para cada juego de constantes), por lo que utilizamos otro desarrollado con el mismo propósito por el doctor Mas y que se encuentra disponible en el procesador PDP 11 de este instituto.

4. Constantes de disociación.

Para los cálculos se utilizaron las constantes absolutas que se encuentran en el manual de Sillan y Martell (1971), seleccionando las que se obtuvieron en condiciones lo mas parecidas a las que nosotros usamos para medir la actividad y que estan listadas en la Tabla 2.

El uso de el programa tres con otras constantes reportadas diferentes de estas no dio diferencias significativas.

TABLA 2

CONSTANTES DE ASOCIACION METAL-LIGANDO
UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

EDTA

H ₂ Ca	9.46	H ₂ Ca	9.85	H ₂ Ca	2.68	H ₂ Ca	1.99
Ca ₂ H	10.72	Ca ₂ H	8.53				
Mg ₂ H	8.24	Mg ₂ H	3.37				
Zn ₂ H	14.34	Zn ₂ H	2.14				

EDTA

H ₂ Ca	10.26	H ₂ Ca	6.16	H ₂ Ca	1.67	H ₂ Ca	1.79
Ca ₂ H	10.70	Ca ₂ H	3.51	Ca ₂ H	1.0	Ca ₂ H	1.0
Mg ₂ H	9.39	Mg ₂ H	3.33				
Zn ₂ H	15.31	Zn ₂ H	4.22				

ATP

H ₂ Ca	6.75	H ₂ Ca	1.26	H ₂ Ca	1.79	H ₂ Ca	1.00
Ca ₂ H	3.45	Ca ₂ H	2.15				
Mg ₂ H	3.04	Mg ₂ H	2.55				
Zn ₂ H	3.2						
Zn ₂ H	4.76						

7. Método para eliminar calmodulina de las membranas.

Para eliminar la calmodulina de nuestras preparaciones de membrana plasmática utilizamos un método muy sencillo desarrollado por Caroni (1981). Este consiste simplemente en incubar las membranas durante 4 horas en hielo, en un medio con alta fuerza iónica y mínimo calcio. Este medio contiene:

KCl 600 mM
EGTA 2 mM
HEPES 20 mM
+ TEA. -> pH7.5

Se supone que en esas condiciones la calmodulina o el modulador calcio-dependiente se desliga de las membranas y queda flotando libre en el medio. Recuperamos las membranas por centrifugación a 140,000xg. durante 40 minutos (en este paso el modulador queda en el sobrenadante), las lavamos 2 veces resuspendiendo y centrifugando nuevamente en un amortiguador HEPES 20 mM pH 7.0 y las resuspendemos en el mismo para luego medir actividad a diferentes concentraciones de calcio.

RESULTADOS Y DISCUSION

1.- Inhibición por Calcio de la H⁺ATPasa.

1.1. Determinación.

A las preparaciones de membrana plasmática obtenidas de la levadura siguiendo los procedimientos 1 y 2 de de Materiales y Metodos, se les determinó actividad de ATPasa en presencia de diferentes concentraciones de calcio libre, manteniendo constantes las concentraciones de Mg²⁺, Mg-ATP y la fuerza iónica. Los experimentos se realizaron en amortiguadores Ca-EGTA y las concentraciones totales de los diferentes metales y ligandos se calcularon utilizando los programas de Fabiato (1979) y las constantes de disociación metal-ligando de la parte 6 de Materiales y Métodos.

Encontramos que la H⁺ATPasa se inhibió a medida que la concentración de calcio libre en el medio de ensayo se incrementó de 5 nanomolar a 5 micromolar (Fig. 4). La inhibición dió principio a concentraciones muy bajas de calcio libre, observandose el mayor cambio de actividad entre 5nM. y 1uM.. A concentraciones mayores la enzima se inhibió un poco más pero el cambio de actividad ya no fué tan notorio.

1.2. Variabilidad en el valor de la inhibición.

Algo importante es que el porcentaje de inhibición por calcio fué variable de una preparación a otra. En 33

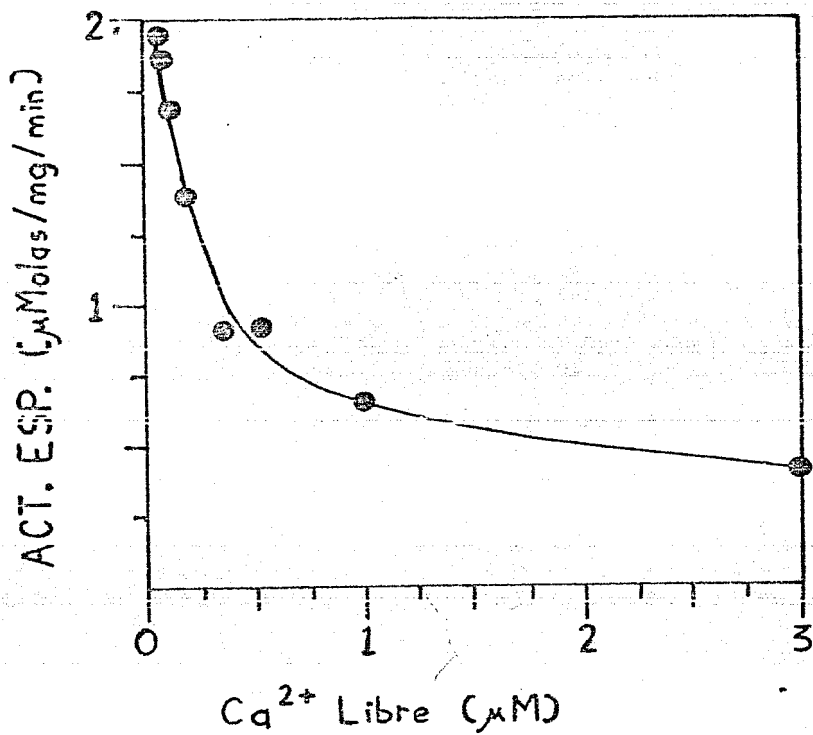


Figura 4. Efecto de la concentración de calcio sobre la actividad de la H⁺ATPasa.

Experimento realizado en amortiguador Tris-HCl 20 mM. pH 7.0 con uno mM de EGTA a 30°C. Se calcularon 1 mM. de Mg-ATP y 100uM. de Mg libre.

cciones de membrana a las cuales se les determinó actividad ATPasa en presencia de 5 nanomolar y 2.5 micromolar de calcio libre. La inhibición observada a 2.5 micromolar varió entre el 80 y el 22% promediando un 38%. De cualquier manera, nunca obtuvimos una preparación de membrana cuya actividad de ATPasa no se inhibiera por calcio.

1.3. EL EGTA no afectó a la H⁺ATPasa.

Para descartar la posibilidad de que el EGTA (utilizado en las soluciones de ensayo para abatir las concentraciones de calcio libre) tuviera efectos colaterales sobre la H⁺ATPasa, realizamos algunos experimentos variando la concentración de EGTA y manteniendo constante la concentración de calcio libre. Esto se hizo porque existe un reporte indicando que el EDTA tiene un efecto activador sobre la H⁺ATPasa de la membrana plasmática de *Neurospora crassa* (Bowman 1979).

Encontramos que hasta una concentración de 2mM. no se apreció ningún efecto (Fig. 5); a concentraciones mayores (5mM.) en algunas ocasiones hemos observado un ligero efecto inhibitorio. Con esto descartamos la posibilidad de que el EGTA fuera responsable de la inhibición que se observó en los experimentos donde se varió la concentración de calcio libre.

2. Naturaleza de la Inhibición por Calcio.

Las preparaciones de membrana plasmática que obtuvimos de las levaduras siempre mostraron inhibición por calcio de la actividad de ATPasa. Sin embargo como mencionamos en el punto 1.2

preparaciones de membrana a las cuales se les determinó actividad de ATPasa en presencia de 5 nanomolar y 2.5 micromolar de calcio libre, la inhibición observada a 2.5 micromolar varió entre el 80 y el 22% promediando un 38%. De cualquier manera, nunca obtuvimos una preparación de membrana cuya actividad de ATPasa no se inhibiera por calcio.

1.3. El EGTA no afectó a la H⁺ATPasa.

Para descartar la posibilidad de que el EGTA (utilizado en las soluciones de ensayo para abatir las concentraciones de calcio libre) tuviera efectos colaterales sobre la H⁺ATPasa, realizamos algunos experimentos variando la concentración de EGTA y manteniendo constante la concentración de calcio libre. Esto se hizo porque existe un reporte indicando que el EDTA tiene un efecto activador sobre la H⁺ATPasa de la membrana plasmática de Neurospora crassa (Bowman 1979).

Encontramos que hasta una concentración de 2mM. no se apreció ningún efecto (Fig. 5); a concentraciones mayores (5mM.) en algunas ocasiones hemos observado un ligero efecto inhibitorio. Con esto descartamos la posibilidad de que el EGTA fuera responsable de la inhibición que se observó en los experimentos donde se varió la concentración de calcio libre.

2. Naturaleza de la Inhibición por Calcio.

Las preparaciones de membrana plasmática que obtuvimos de las levaduras siempre mostraron inhibición por calcio de la actividad de ATPasa. Sin embargo como mencionamos en el punto 1.2

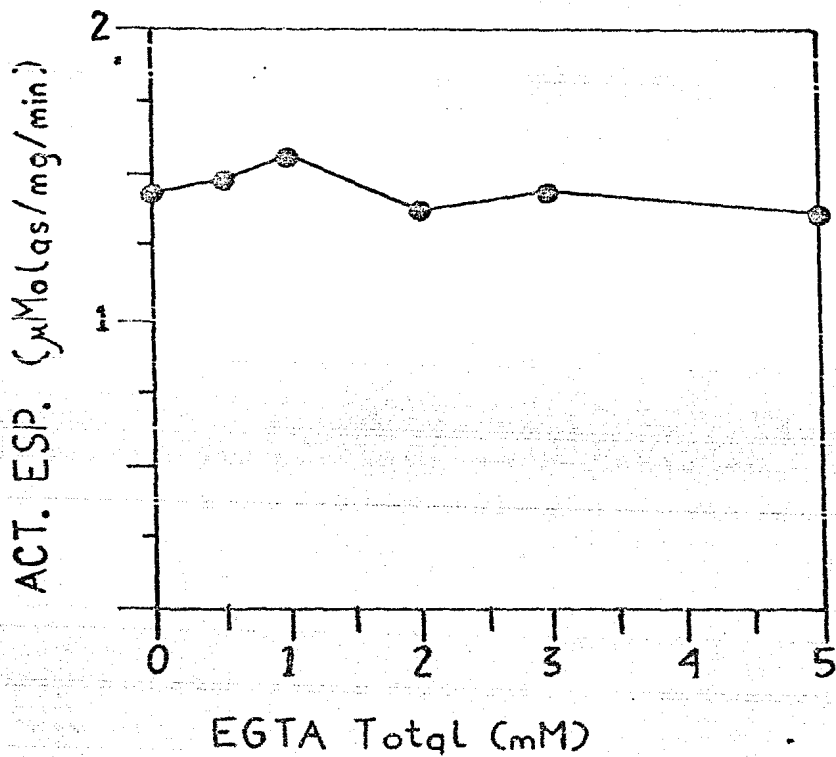


Figura 5. Efecto del EGTA en la H^+ ATPasa.

Experimento realizado a $30^{\circ}C$ en amortiguador MES-TEA 50mM. pH 7.0. Para este experimento se calcularon 1mM de Mg-ATP, 100uM. de magnesio libre y una concentración constante de calcio de 0.31 uM.

de esta sección, el porcentaje de inhibición determinado a 2.5uM. de calcio libre varió entre el 80% y el 22% promediando un 38% en 33 determinaciones. Considerando que en muchos sistemas el calcio no actúa directamente sobre las enzimas blanco sino que se fija en otras proteínas que son las que finalmente modulan la actividad de las enzimas, la variabilidad observada en el fenómeno de inhibición por calcio de la ATPasa nos llevo a suponer que dicha inhibición se producía a través de una proteína moduladora calcio-dependiente. Variaciones en la cantidad del modulador presente en nuestras preparaciones explicarían los cambios en el porcentaje de inhibición observados.

La cantidad del hipotético modulador presente en nuestras preparaciones podría variar dependiendo de las siguientes causas:

- a) Cambios en la concentración de calcio libre durante el aislamiento de las membranas. Si el modulador calcio-dependiente requiere la presencia de calcio para unirse a la H⁺ATPasa, diferentes concentraciones de calcio durante el aislamiento de las membranas resultarán en diferentes cantidades del modulador en las membranas al final del proceso.
- b) Proteolisis durante el proceso de aislamiento. Este es un problema común cuando se rompen las levaduras (Nakamura 1984).
- c) Es posible que los cambios de pH durante el aislamiento de las membranas afecten la actividad del modulador.
- d) Diferencias de estado metabólico de las células utilizadas para obtener las membranas.

2.1. Efecto de antagonistas de la calmodulina.

Como se mencionó en la introducción, uno de los moduladores dependientes de calcio más conocidos es la calmodulina. Por esa razón antes de intentar otros enfoques decidimos investigar si la calmodulina desempeñaba algún papel en la inhibición por calcio que observamos.

Como un enfoque inicial decidimos utilizar inhibidores o antagonistas de la calmodulina. Esperando que, si la inhibición de nuestra ATPasa estuviera mediada por calmodulina, al agregar al ensayo un antagonista de esta última, la inhibición debería desaparecer, esto es las actividades determinadas en presencia de 5nM. o 3uM. de calcio libre deberían ser iguales.

El uso de estos antagonistas tiene algunos inconvenientes. Al menos en el caso de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana de eritrocito, parece ser que actúan sobre la proteína blanco más que sobre la calmodulina (Carafoli 1984) y además existe un reporte indicando que la Trifluoperazina (TFP uno de los antagonistas más conocido) inactiva nuestra enzima (Eylam 1984). Tomando esto en cuenta, la esperanza que teníamos era que la TFP actuara sobre la inhibición a concentraciones más bajas que las requeridas para inactivar la enzima.

Como se esperaba la TFP inhibió la actividad de ATPasa (Fig. 6A triangulos) aproximadamente un 50% de inhibición se observa a una concentración de 30uM. Sin embargo cuando graficamos el porcentaje de inhibición (Fig. 6B), encontramos que efectivamente la trifluoperazina hace desaparecer la inhibición, en presencia

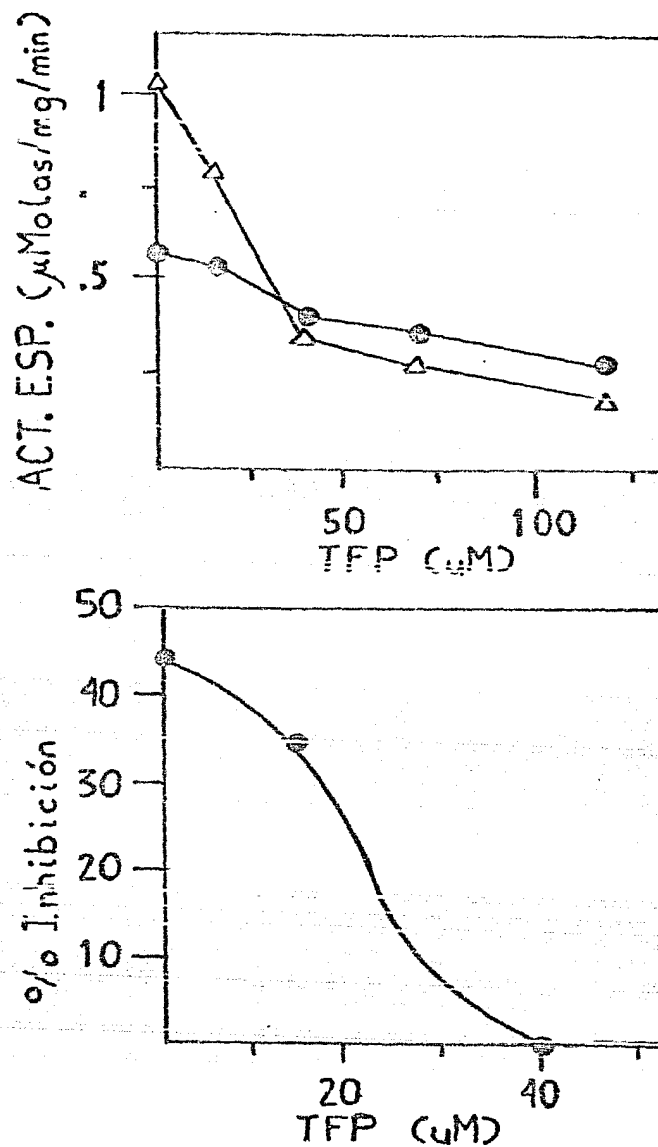


Figura 6. Efecto de la Trifluoperazina en la inhibición por calcio de la ATPasa.

A) El experimento se realizó en amortiguador HEPES-KOH 40 mM. pH 7.0 con 1 mM. de EGTA total, 2.5 mM. de Mg-ATP, 100 μM . de magnesio libre, y 10 nM (□) o 10 μM (○) de calcio libre.

B) Graficado como porcentaje de la inhibición

de 30uM. de TFP el calcio ya no tiene efecto sobre la ATPasa.

Animados por este resultado decidimos probar otro antagonista al que se considera mas específico, este es el calmidazolium. Los experimentos con este antagonista dieron resultados muy semejantes a los obtenidos con TFP (Fig. 7 A y B), nuevamente observamos que hay menos inhibición por calcio en presencia del antagonista, pero simultaneamente la enzima se inactivó.

2.2. Efecto del método para eliminar la calmodulina.

Para probar si la calmodulina es el modulador calcio-dependiente en nuestro sistema, el experimento concluyente es adicionarla y ver un aumento en la inhibición. Para esto se requería tener una preparación donde la inhibición sea mínima, para detectar aún los efectos mas pequeños, porque no conocemos las condiciones mas adecuadas para observar la reconstitución del fenómeno. Con este fin aplicamos a las preparaciones de membrana plasmática de levaduras el método desarrollado por Caroni (1981) para eliminar la calmodulina de preparaciones de membranas. Este método es muy sencillo y está descrito en la sección 7 de metodología.

La aplicación de este método nos permitió reducir la inhibición por calcio a alrededor de un 5% en nuestras preparaciones sin importar el porcentaje de inhibición inicial de las mismas. A estas preparaciones las llamaremos "membranas insensibles" y son las que utilizamos en nuestros experimentos con calmodulina. En experimentos control que se realizaron

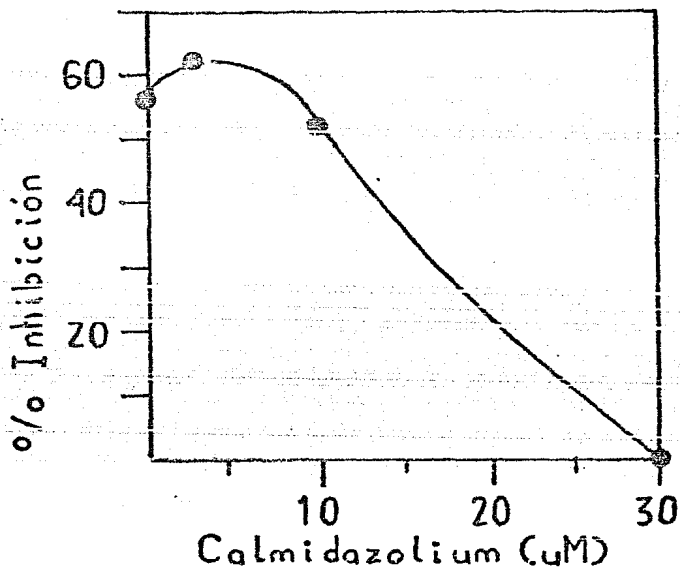
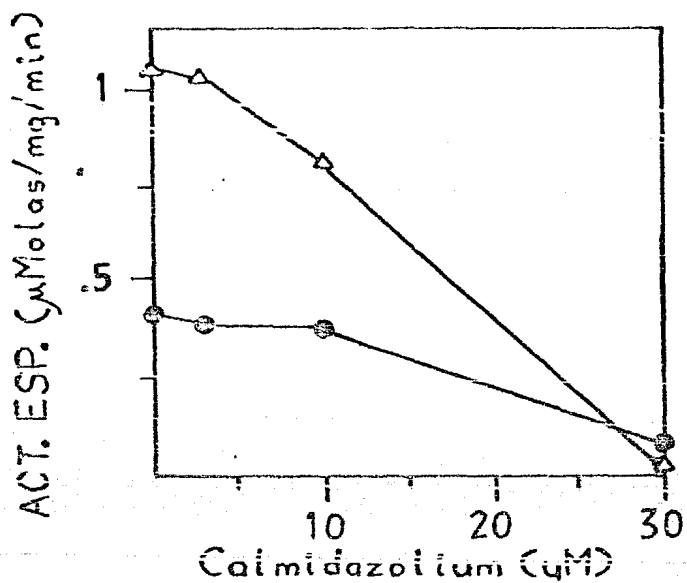


Figura 7. Efecto del calmidazolium en la inhibición por calcio de la ATPasa.

Experimento realizado en las mismas condiciones que el de la fig.6. El antagonista se mezcló con la enzima y se incubó 15 min. en hielo antes de iniciar la reacción.

sometiendo las membranas al mismo proceso excepto que el medio contenía 500µM de calcio en lugar de 2µM. de ESTA no se redujo el porcentaje de inhibición.

El hecho de que esta metodología nos redujo a un mínimo la sensibilidad de nuestras membranas a la inhibición por calcio, nos indica que efectivamente esta requiere la presencia de alguna molécula que está desapareciendo durante el proceso, como propusimos en el punto 2.1.

2.3. Efecto de la calmodulina.

Las preparaciones resultantes del procedimiento anterior fueron utilizadas para los experimentos en los que tratamos de reconstituir la sensibilidad al calcio agregando calmodulina a las membranas. El resultado de un experimento típico se puede ver en la Figura 8 A y B. La escala de las actividades y porcentajes de inhibición se ampliaron para magnificar los efectos y la curva de la figura 8B se trazó siguiendo la tendencia general comprobada en varios experimentos aunque se dejó fuera uno de los puntos.

El efecto de la calmodulina añadida no fué el esperado, porque aunque si se observó un aumento en el porcentaje de inhibición, el valor máximo logrado no se puede comparar con los valores que vimos en la parte 1.1 de esta sección. La ligera activación que se observa en los puntos de uno y 10 ngr./ensy. parece ser un efecto hidrofóbico de la calmodulina, porque activaciones semejantes se observan al agregar pequeñas

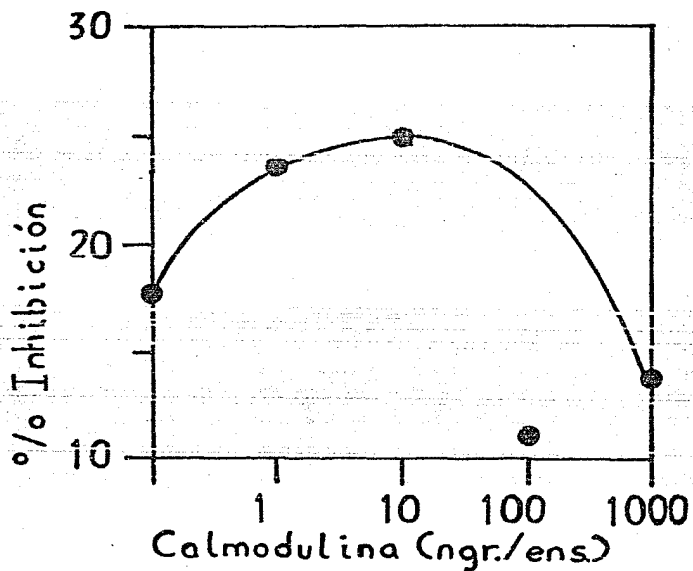
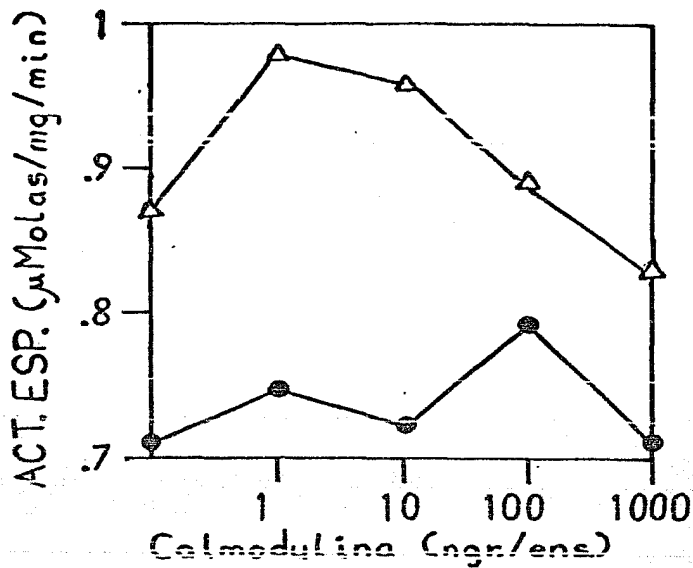


Figura 8. Efecto de la calmodulina en la inhibición por calcio de la ATPasa.

Experimento similar a los de las figuras 6 y 7. excepto que la calmodulina se incubó con la enzima en presencia de 100 μ M de calcio libre para incrementar la interacción.

cantidades de detergentes como Tritón X-100 (0.05%) a las membranas.

2.4. Significado de la inhibición.

Vimos en el parrafo 5. de la introducción que, a través de cambios en la concentración de calcio en el citosol, las células regulan un numero muy grande de procesos, incluyendo la mitosis y la respuesta a hormonas, por eso nos ha parecido sumamente importante encontrar que esos mismos cambios de concentración modularon negativamente la actividad in vitro del único translocador primario descrito en la membrana plasmática de la levadura.

No es facil por el momento pensar en el significado fisiológico de un mecanismo de regulación por calcio en la protón ATPasa, porque no se dispone de ningun método para determinar las concentraciones de calcio libre en el citosol de la levadura. Esto se debe a que su membrana plasmática tiene características muy peculiares de permeabilidad y resistencia a desacoplantes, y a que la pared celular restringe físicamente el uso de ionóforos y detectores metalocrómicos que en otro tipo de células han dado buenos resultados.

De cualquier manera, a continuación mencionaremos algunos reportes que aunque en forma indirecta, nos dan indicios de la concentración de calcio citosólico en la levadura, y que además relacionan cambios en su concentración con el ciclo celular.

Yael Eilam en 1982 (A y B), estudió el efecto de la nistatina

en células de levadura y encuentra que en los primeros minutos después de la adición de este antimicótico la levadura deja salir potasio y magnesio, pero no puede detectar salida de calcio, y encuentra que hasta concentraciones externas tan bajas como 1 μM , el calcio entra fácilmente a la levadura a través de los poros de la nistatina.

Explica estos resultados indicando que la concentración de calcio libre en el citosol de la levadura probablemente sea menor de 1 μM , por lo tanto el calcio externo simplemente entra a favor del gradiente de concentración. Experimentos de este tipo combinados con el método de titulación de punto-nulo (Coll 1982), probablemente nos den una estimación un valor confiable de la concentración intracelular de calcio en las levaduras.

Por el lado del ciclo celular Saavedra-Molina y cols. (1983), estudiaron el transporte de calcio en cultivos sincronizados de S. cerevisiae. Y encontraron que este transporte no es homogéneo a lo largo del ciclo celular, sino que es muy bajo en las fases G_1 , S y G_2 , y aumenta considerablemente durante la mitosis.

Ohya en 1984 al buscar mutantes termosensibles que no crecieran en medios con muy bajas concentraciones de calcio, ha encontrado que están afectadas en el ciclo celular pues su crecimiento se detiene al comenzar la mitosis. Y clones de un gene cuya mutación da como resultado incapacidad de formar el cuerpo polar (responsable de la migración de los cromosomas a la célula hija) tienen homología con proteínas que fijan calcio (Baum 1984).

Ya anteriormente Duffus y col. (1974), habían observado que adicionando el ionóforo de calcio A23187 a un cultivo de levaduras, éstas se detienen al llegar a la mitosis (este dato tuvo que ser tomado con cautela porque a otros grupos, entre ellos el nuestro, que han trabajado con levaduras enteras, el A23187 no les da resultado, presumiblemente debido a la restricción física de la pared celular).

Existe también evidencia indicando que hay cambios en las concentraciones de calcio y proteínas fijadoras de calcio involucradas en la respuesta a feromonas (Miyakawa 1986).

La respuesta a feromonas y la mitosis tienen en común que implican eventos en la membrana (la fusión entre células de diferentes "mating type" y la emisión de la yema), por lo tanto en estos casos puede ser que la ATPasa se inactive y la membrana se despolarice como preparación para que ocurran los eventos mencionados.

Otra posibilidad es que la inhibición de la enzima ocurra para canalizar en otros procesos la energía que consume, porque como vimos en la introducción (parte I.), la ATPasa arrancando a su máxima velocidad consume tanta energía que provoca cambios en la relación $ATP/(ADP+AMP)$ de la célula y una aceleración de la glucólisis (Peña 1972)

Encontrar que la sensibilidad de la H^+ ATPasa al calcio varió de una preparación a otra, y que existe una metodología que nos permitió reducirla a un mínimo no fué tan sorprendente, y si nos permitió conocer un poco de la naturaleza de la inhibición,

porque se sabe que en muchos casos el calcio actúa sobre los sitios blanco a través de otras moléculas llamadas proteínas moduladoras dependientes de calcio. Lo que si ha complicado la parte experimental del proyecto es la falta de un método que nos permita obtener la H⁺ATPasa siempre con la máxima sensibilidad.

Hemos pensado en dos explicaciones alternativas para esta dificultad. La primera era que el modulador se perdía durante la obtención de las membranas, sin embargo, cuando determinamos la sensibilidad al calcio de la actividad de ATPasa sensible a vanadato en extractos crudos de levadura, encontramos nuevamente que hay variabilidad. La segunda explicación es que la sensibilidad al calcio de la H⁺ATPasa cambia con el estado metabólico de las levaduras o durante el ciclo celular. Esta segunda posibilidad es mas interesante dado que existen reportes indicando que el calcio tiene un papel importante en el ciclo celular de la levadura. Para probar esta hipótesis será necesario realizar experimentos utilizando cultivos sincronizados.

El hecho de que la calmodulina no devuelva la sensibilidad a nuestras preparaciones depletadas de sensibilidad (fig. 8 A y B) practicamente descarta la posibilidad de que sea el modulador de nuestro sistema, ademas Yingst y cols. (1984) han reportado un fenomeno parecido de inhibición por calcio en la ATPasa de sodio y potasio de membrana de eritrocito, que se encuentra mediado por una proteina diferente de calmodulina (esta Na⁺/K⁺ATPasa cumple en el eritrocito la misma función que la H⁺ATPasa de la levadura).

En este sentido lo que queda por hacer es buscar las condiciones en las que este modulador se encuentre en mayor cantidad, y tratar de recuperarlo a partir de extractos de la levadura.

3. Efecto del pH y la Fuerza Iónica.

3.1. Efecto del pH.

Cuando se utilizan ligandos (como el EGTA) para quelar iones metálicos, es necesario realizar los experimentos a un pH relativamente alto (mayor que 6.5); la razón es la siguiente: el ligando fija los iones metálicos por medio de cargas negativas, pero estas cargas también pueden fijar H^+ . Entonces a un pH bajo los sitios de unión estarán ocupados por iones H^+ y el ligando mostrará una afinidad mucho más baja por los metales. Por eso todos los experimentos con EGTA presentados en éste trabajo fueron realizados a pH 7.0.

Si se considera que existen reportes indicando un pH óptimo de 5.0 (ver 4.1. en la introducción), para comprobar la validez de los datos obtenidos a pH 7.0 es necesario realizar un análisis de la actividad de la enzima contra pH en las condiciones en que nosotros trabajamos, manteniendo constantes las concentraciones de Mg, de Mg-ATP y la fuerza iónica (la carga del ATP y su afinidad por el Mg^{2+} también varían con el pH).

Los resultados muestran que la actividad tiene una forma clásica de campana con un máximo a pH 6.5 y que a pH 7.0 la

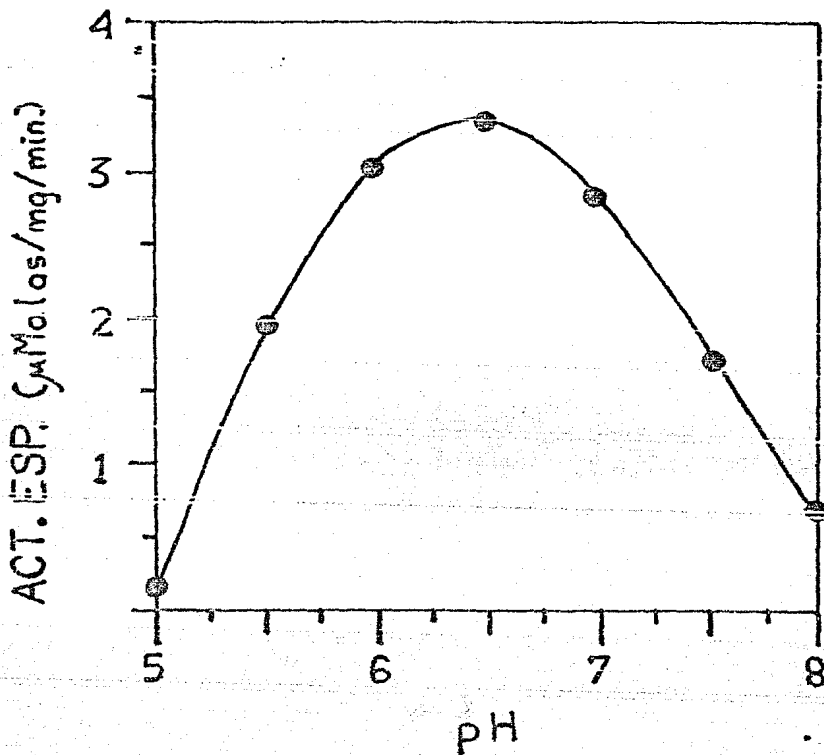


Figura 9. Actividad de la ATPasa v.s. pH.

Actividades determinadas a diferentes valores de pH obtenidos con diferentes proporciones MES/TEA totalizando la suma de las concentraciones 50 mM. Se utilizaron 5 mM. de Mg-ATP, 2 mM. de magnesio libre y 50 nM. de calcio libre. La fuerza iónica se mantuvo cte. a 140 mM.

enzima todavía tiene buena actividad (fig. 9). Este resultado es importante, principalmente porque pudimos reproducir algunas de las curvas encontradas en la literatura presentando diferentes valores de pH óptimo simplemente haciendo caso omiso de los cambios en fuerza iónica y en la formación del complejo Mg-ATP.

3.2. Efecto de la fuerza iónica.

Los primeros estudios cinéticos que realizamos de actividad contra concentración de Mg-ATP, manteniendo constante el calcio libre, dieron líneas curvas en las gráficas de dobles recíprocas. Buscando las causas, observamos que para alcanzar diferentes concentraciones de Mg-ATP se producen cambios muy grandes en la fuerza iónica del medio. Ver Tabla 3.

La solución más común a este tipo de problema es adicionar al medio alguna sal, usualmente cloruro de sodio ó de potasio, en cantidad adecuada para mantener constante la fuerza iónica; sin embargo, el sodio y el potasio compiten con el Mg^{2+} formando complejos Na-ATP y K-ATP y además existen varios reportes que indican efectos específicos de éstas y otras sales sobre la actividad de la ATPasa (tabla 1).

Por estas razones decidimos estudiar el efecto de la fuerza iónica y buscar condiciones donde los cambios de esta, tuvieran el mínimo efecto sobre la actividad de nuestra enzima.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

TABLA 3

Contribucion del $MgCl_2$ y el Na_2ATP a la Fuerza Iónica en Valores Típicos de un experimento de Cinética

Mg libre	Mg-ATP	$MgCl_2$	Na_2ATP	Fuerza iónica
10 μM .	63.0 μM .	73.00 μM .	0.946 mM.	7.5 mM.
10 μM .	1.0 mM.	1.01 mM.	15.0 mM.	119.0 mM.
100 μM .	63.0 μM .	163.00 μM .	0.151 mM.	1.0 mM.
100 μM .	1.0 mM.	1.10 mM.	2.4 mM.	14.0 mM.
1 mM.	63.0 μM .	1.06 mM.	71.0 μM .	3.7 mM.
1 mM.	1.0 mM.	2.00 mM.	1.14 mM.	6.0 mM.

Los valores utilizados para las concentraciones de Mg^{2+} y Mg-ATP son utilizados por los tres autores mencionados en el texto para los experimentos de cinética. Los valores de $MgCl_2$ y Na_2ATP fueron calculados utilizando los programas de Fabiato (1979). Los valores dados para la fuerza iónica están calculados utilizando la formula dada en la sección 5 de materiales y métodos, no se tomaron en cuenta las contribuciones de los amortiguadores ni de la base utilizada para neutralizar el Na_2ATP la cual será mayor a mayores concentraciones de ATP total.

La fuerza iónica tiene un efecto característico de activación e inhibición sobre la ATPasa, con un punto óptimo a 140 mM (ver figura 10).

Ni la forma de la curva ni el valor máximo se alteran si se utilizan diferentes amortiguadores como MES-TEA, HEPES-TEA o Tris-HCl ni diferentes proporciones del amortiguador y KCl o NaCl, siempre que se compense la formación de los complejos K-ATP y Na-ATP.

Estos resultados nos decidieron a estudiar los efectos de algunas otras sales que se encuentran reportadas con efecto activador, pero ahora manteniendo constantes la fuerza iónica y las concentraciones de Mg^{2+} libre y Mg-ATP. Los resultados muestran que solo el Zn^{2+} y el Ca^{2+} tienen un efecto específico sobre la ATPasa y éste es inhibitorio. Todas las demás sales solo tienen el efecto cooperado correspondiente a la fuerza iónica que generan y a la forma como alteran la formación del complejo Mg-ATP (Tabla 4).

3.3. Efecto del potasio.

Se ha realizado bastante trabajo indicando que la ATPasa en realidad puede funcionar como un sistema de antiport H^+/K^+ (Villalobo 1981, 1982 y 1984).

La primera evidencia que se ha manejado en favor de esta hipótesis, es la activación en la hidrólisis de ATP que se observa cuando se adiciona KCl al medio de ensayo. En este sentido los resultados obtenidos en este trabajo son muy

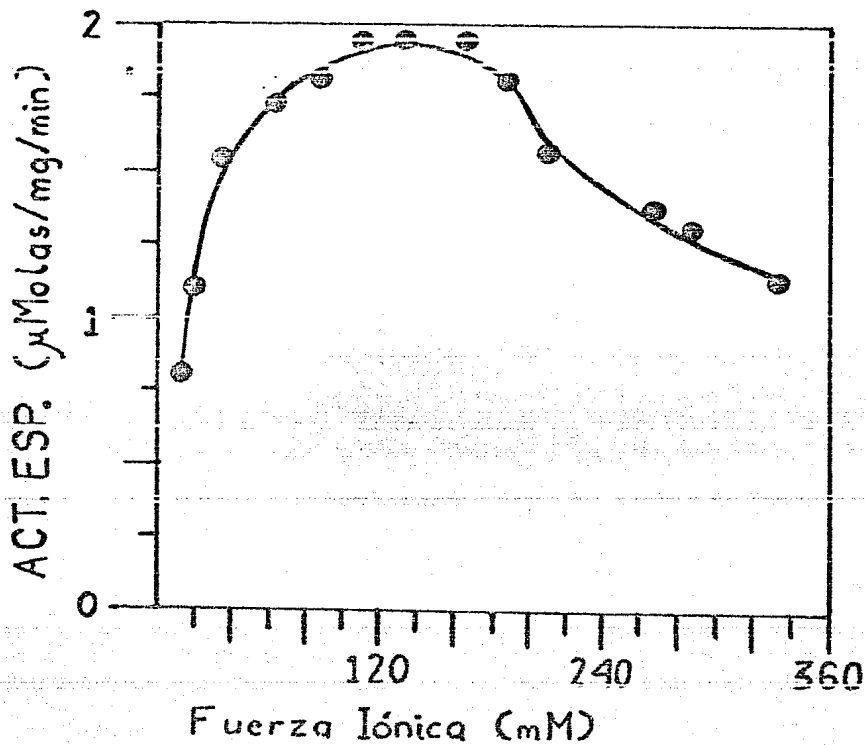


Figura 10. Actividad de ATPasa contra fuerza iónica.

Actividades determinadas en amortiguador MBS-TEA 50 mM. a pH 7.0 y 30°C. se utilizaron 1 mM. de Mg-ATP, 250 μM. de magnesio libre, 1 mM. de EGTA total y 10 nM. de calcio libre. La fuerza iónica indicada se obtuvo adicionando KCl, pero resultados similares se obtuvieron agregando mas amortiguador u otras sales como LiCl o Na₂SO₄.

TABLA 4.
EFECTO DE DIFERENTES IONES
SOBRE LA PROTON ATPasa.

Sal Utilizada	Concentración	Actividad	
	(mM)	(μ Molas/mg/min)	%
-----	-----	1.67	100.0
Na ₂ SO ₄	50.0	1.51	90.0
RbCl	50.0	1.57	94.0
NH ₄ NO ₃	50.0	1.52	91.0
CH ₃ COO-Li ⁺	50.0	1.63	97.0
SrCl ₂	* 0.25	1.52	91.0
ZnCl ₂	* 1.0	0.82	49.0
MnCl ₂	* 5.0	1.68	100.7

Experimento realizado en amortiguador MES-TEA 50mM, con Mg²⁺ 100 μ M, Mg-ATP 1mM y 140mM de fuerza iónica.

* Fue necesario utilizar concentraciones mas bajas de los cationes divalentes para evitar interferencias en la formación del complejo Mg-ATP.

importantes, pues cuando se controla la fuerza iónica y se corrigen las concentraciones totales de Mg y ATP para compensar la formación de complejos K-ATP, no se observa ningún efecto específico del K^+ (ver tabla 4). Hay que notar que esto no descarta la posibilidad de que la ATPasa funcione como H^+/K^+ ATPasa, ya que también existe evidencia derivada de otro tipo de estudios.

Malpartida y Serrano en 1981 (B) analizaron la reacción de recambio ATP- ^{32}P i con la enzima reconstituida en liposomas. Esta reacción depende del gradiente transmembranal y ocurre de la siguiente manera. Se incuba la enzima reconstituida en condiciones de actividad en presencia de ATP y ^{32}P i. La enzima hidrolisa el ATP generando ATP y P_i , y translocando a través de la membrana un cierto número de iones. Los iones se acumulan en el interior del liposoma y llega un momento en el que, por el gradiente de concentración vencen la barrera energética y regresan al exterior a través de la ATPasa. Esto provoca la síntesis de un ATP, pero ahora el fosfato de que dispone la enzima tiene una proporción de ^{32}P i y es probable que el ATP recién sintetizado esté marcado con ^{32}P . Se puede tener un valor cuantitativo del recambio contando el ^{32}P -ATP en un contador de centelleo después de separarlo del fósforo inorgánico..

Esta reacción depende totalmente del gradiente, y lo esperado, en el caso de una H^+ ATPasa es que al adicionar desacoplantes (moléculas que permiten el equilibrio de H^+ en ambos lados de la membrana) el recambio desaparezca. Lo que ellos encontraron fué diferente: el recambio fue parcialmente

resistente a desacoplantes (40%) y esa resistencia desaparece al agregar valinomicina, la cual permite el equilibrio de iones K^+ . Estos resultados indican que la enzima fué capaz de formar un gradiente de K^+ , sin embargo deben tomarse con cautela porque en realidad todavía no existe una preparación de la $H^+ATPasa$ que muestre una sola banda en geles de poliacrilamida-SDS, que es el criterio de pureza más aceptado, y las otras bandas que se observan bien podrían estar relacionadas con el transporte de iones K^+ en la levadura, lo cual explicaría los mismos resultados en forma diferente.

4. Efecto del Magnesio en la Actividad de la ATPasa.

4.1. Antecedentes.

Diferentes grupos han estudiado la actividad de la protón ATPasa en presencia de concentraciones variables de magnesio libre (Serrano 1980, Ahlers 1981 y Borst-Pauwels 1981). Una gráfica de actividad de ATPasa contra concentración de magnesio libre presenta dos fases como muestra en la figura 11. A bajas concentraciones el magnesio activa a la enzima, y a concentraciones mayores tiene un efecto inhibitorio. Para explicar este comportamiento se ha sugerido la existencia de dos sitios en la enzima donde el Mg^{2+} se fija y regula la actividad. La evidencia a favor de esta hipótesis proviene principalmente de estudios cinéticos (Serrano 1978 y Ahlers 1981), y de un estudio de los efectos del vanadato sobre los parámetros cinéticos K_m y V_{max} de la enzima (Borst-Pauwels).

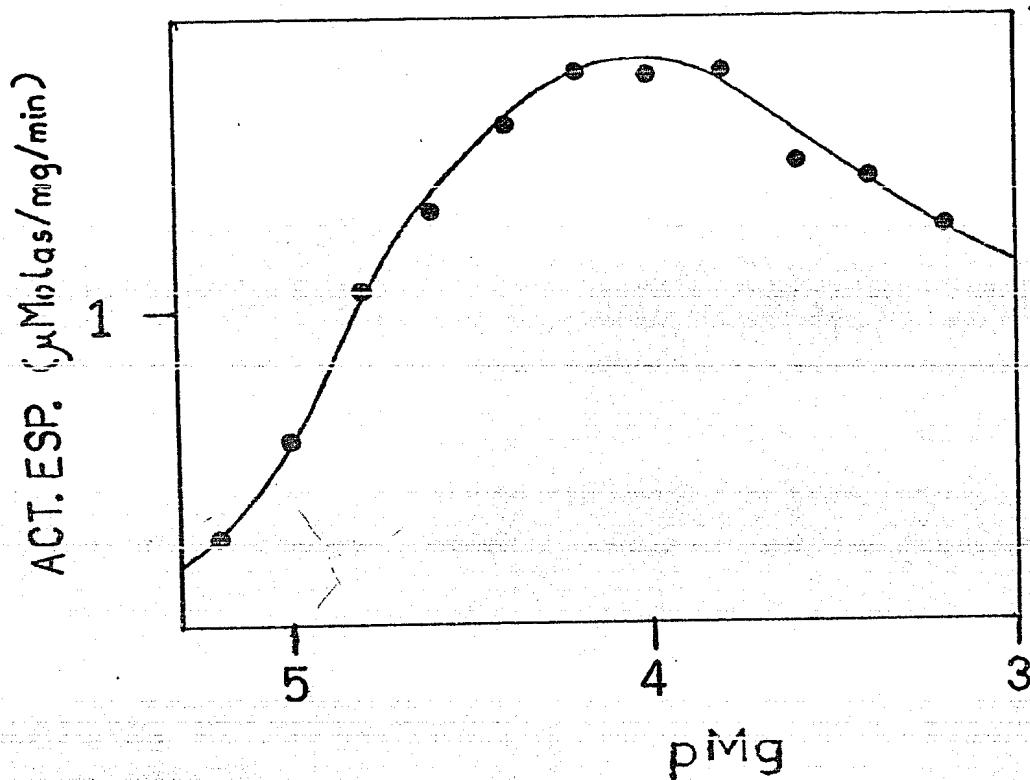


Figura 11. Actividad de la enzima a diferentes con centraciones de magnesio libre.

Actividades determinadas en amortiguador HEPES TEA a pH 7.0 y 30°C en presencia de 5nM de calcio libre. El valor pMg significa $\log(1/[Mg])$ en molar. Se utilizó 1 mM. de Mg-ATP.

Ahlens (1981) analizó las modificaciones en los parámetros K_{MgATP} y $V_{maxMgATP}$ que se producen cuando se varía la concentración de Mg^{2+} en el ensayo, sus resultados indicaron que la ATPasa tiene dos sitios. Uno fija magnesio con alta afinidad aumentando la $V_{maxMgATP}$, mientras que el otro lo fija con menor afinidad. En presencia de altas concentraciones de magnesio, este último sitio reduce la afinidad de la enzima por su sustrato o sea aumenta la K_{MgATP} .

Durante el trabajo experimental; de esta tesis decidimos repetir los estudios cinéticos de Mg^{2+} y Mg-ATP por las siguientes razones:

4.1.1. Efecto de la fuerza iónica en las cinéticas.

En la parte 3.2. de esta sección se vió el efecto de la fuerza iónica sobre la ATPasa. Ahora bien, cuando se realizan experimentos variando las concentraciones de Mg-ATP y Mg^{2+} ocurren grandes variaciones en la fuerza iónica. El rango en que estas variaciones ocurren está ilustrado en la Tabla 4. Las concentraciones mostradas serían típicas en un experimento de cinética Mg-ATP a diferentes concentraciones de Mg^{2+} y puede verse que entre diferentes puntos del experimento van a existir diferencias significativas para el valor de fuerza iónica, que dependiendo de las contribuciones de los otros componentes del medio de ensayo (el amortiguador, la concentración de las membranas y la TEA utilizada para ajustar el pH) se pueden traducir en diferencias de actividad que no tienen que ver con el

Mg^{2+} ni el sustrato (ver figura 10). Errores de esa magnitud y además no aleatorios pueden conducirnos fácilmente a resultados e interpretaciones erróneos.

4.1.2. Efecto del calcio en las cinéticas.

En condiciones de laboratorio las soluciones que se utilizan siempre se encuentran contaminadas por calcio en concentraciones micromolares. Ahora bien, En la sección 1.1. de esta parte vimos que el calcio, en esas concentraciones, inhibe la actividad de la ATPasa, por lo tanto las actividades de ATPasa que se determinan sin tomar en cuenta la presencia del calcio se van a ver afectadas en mayor o menor grado por el calcio contaminante.

Para el caso de estudios cinéticos de la protón ATPasa, esta contaminación por calcio puede tener las siguientes consecuencias: si la concentración de calcio libre quedara siempre por arriba de unos $3\mu M$, los resultados obtenidos van a corresponder a una ATPasa inhibida; si la concentración contaminante fuera menor, será imposible determinar de que manera ha contribuido la inhibición por calcio en los resultados finales, porque la concentración de calcio libre va ser distinta para los diferentes puntos del experimento. En la figura 12 podemos ver una simulación de computadora de como podría variar dicha concentración dependiendo de las concentraciones de Mg libre y Mg-ATP, y si vemos donde caen esos valores en la figura 4 tendremos una idea exacta de la magnitud que podría alcanzar el problema.

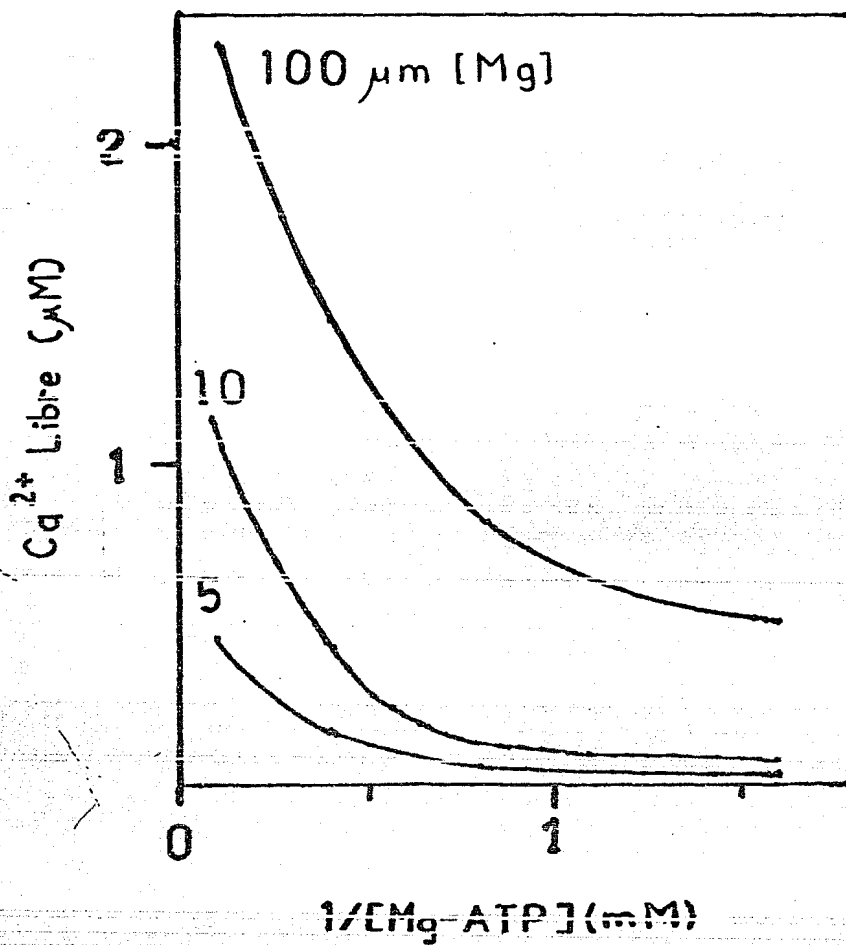


Figura 12. Variación de la concentración de calcio libre en cinéticas Mg-ATP a diferentes concentraciones de magnesio libre. Calculadas utilizando los programas de Fabiato (1979).

4.2. Resultados de las cinéticas.

4.2.1. La H⁺ATPasa tiene un solo sitio para Mg²⁺.

En el laboratorio realizamos los experimentos de cinética Mg-ATP a diferentes concentraciones de Mg²⁺ manteniendo constantes la concentración de calcio libre y la fuerza iónica. Los resultados de un experimento típico se pueden ver en la figura 13. En estos experimentos se utilizaron triplicados aleatorios según recomienda Storer (1975), este sistema de duplicados nos permite conocer la magnitud del error en nuestros experimentos sin aumentar el ruido por fatiga. En nuestros experimentos a todas las concentraciones utilizadas el magnesio libre afecta simultáneamente la K_{Mg-ATP} y la $V_{maxMg-ATP}$, y regraficando $1/K_m$ y $1/V_{max}$ contra $1/Mg^{2+}$ (Fig.14) encontramos una sola tendencia lo que sugiere la existencia de un solo sitio para el magnesio libre.

La discrepancia entre este resultado y el publicado anteriormente por Ahlers (1981), puede tener las siguientes explicaciones:

a) Que en nuestra enzima existan los dos sitios, pero estos tengan afinidades muy parecidas. Esto hará que, a medida que se aumente la concentración de Mg²⁺, los dos sitios se vean afectados simultáneamente. De ser así, en nuestra enzima los estudios cinéticos no nos permitirán determinar el efecto de un solo sitio sobre los parámetros K_{Mg-ATP} y $V_{maxPqMg-ATP}$ de la enzima. Consideramos esto poco probable porque en cambio vemos muy bien definidas una fase de activación y una de inhibición,

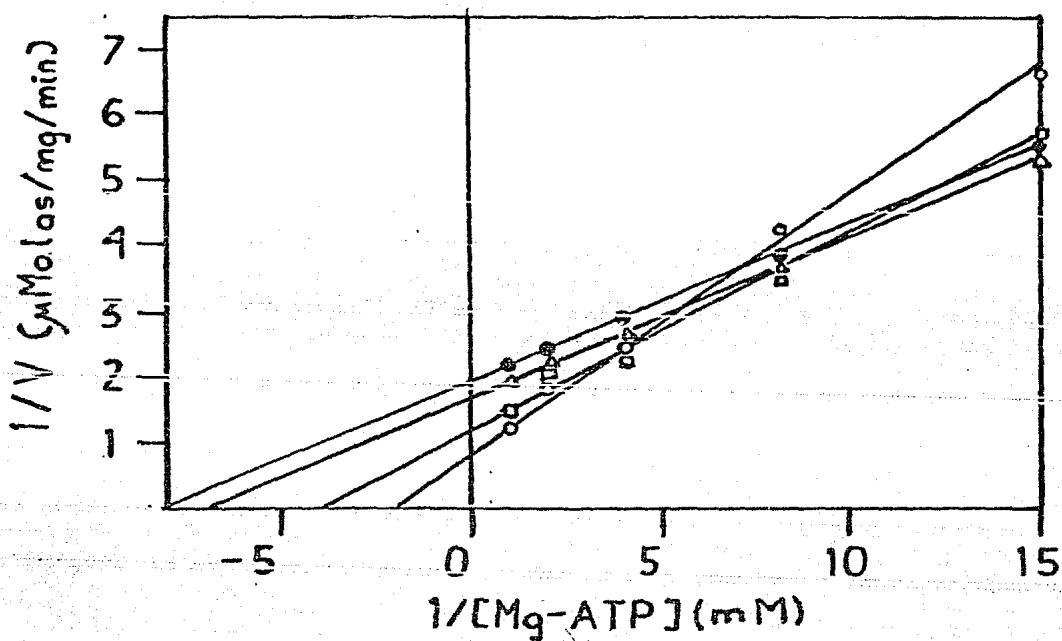


Figura 13. Dobles reciprocas de las cinéticas Mg-ATP para varias concentraciones de Mg libre.

El experimento se realizó en HEPES-TEA a 25°C y pH 7.0, la concentración de calcio libre fue de 10 nM, y las concentraciones de magnesio fueron (○) 80, (□) 40, (Δ) 25 y (●) 20 uM.

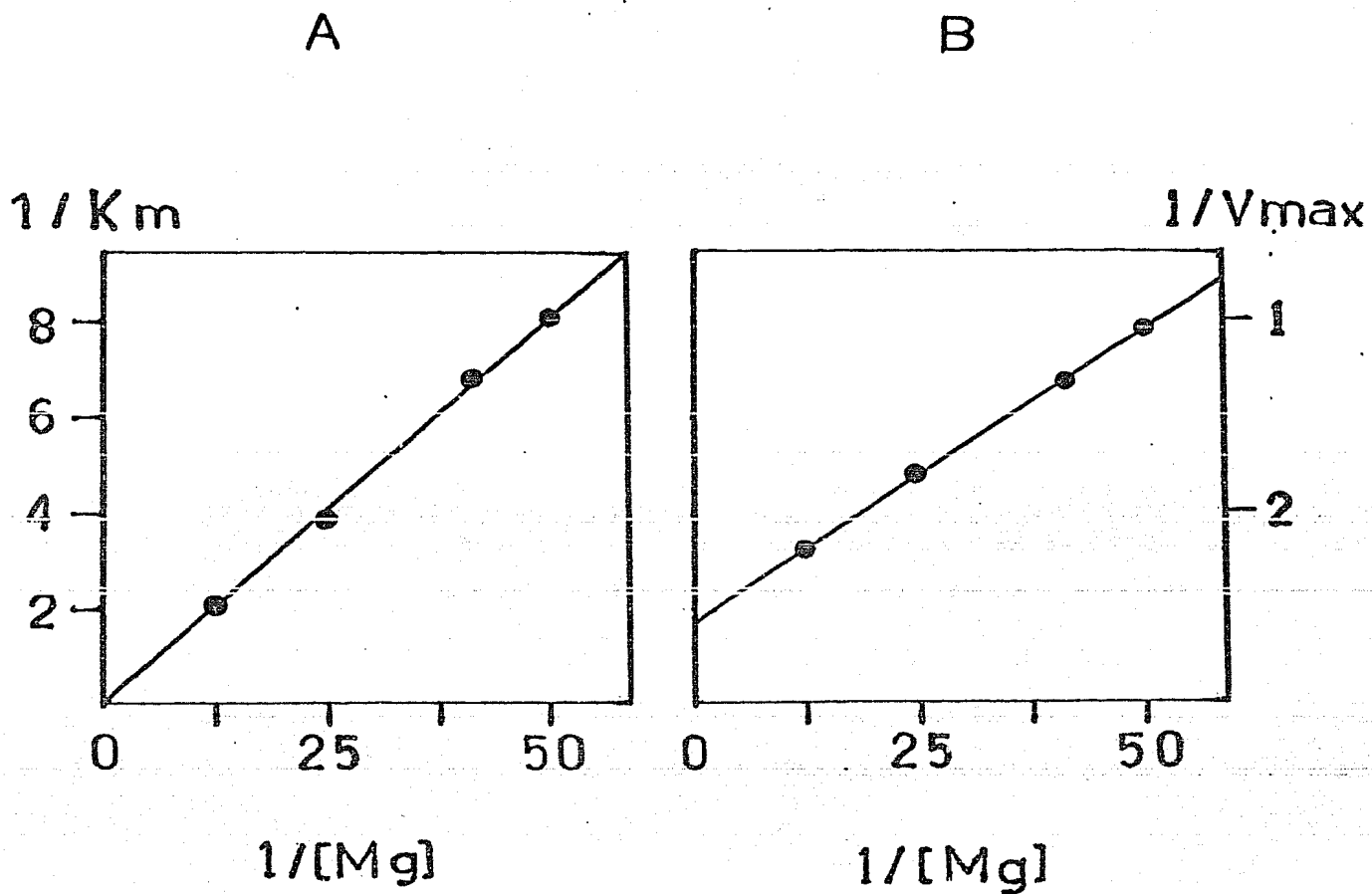


Figura 14. Regraficaciones de las cinéticas.

A) $1/K_m$ v.s. $1/ Mg$.

B) $1/V_{max}$ v.s. $1/ Mg$.

Las unidades usadas son: $K_m=mM$, $[Mg]=mM$ y $V_{max}=uM/mg/min$.

que es lo primero que se trata de explicar al hablar de dos sitios.

b) Que tanto nuestra enzima como la de Ahlers tengan un solo sitio. En este caso los resultados obtenidos por el, se podrían explicar porque los cambios en la concentración de calcio libre y en la fuerza iónica que ocurren al modificar las concentraciones de Mg^{2+} y Mg-ATP en las cinéticas, afectan la actividad de la enzima. Estos efectos serán mas críticos justamente cuando se utilicen las concentraciones mas bajas de magnesio libre (Fig. 12), y podrían provocar cambios en la tendencia de las curvas que dieran la impresión de otro sitio.

c) Que la enzima utilizada por Ahlers tenga dos sitios y la que utilizamos nosotros solo uno. Esto no sería demasiado extraño, porque bajo el nombre de Saccharomyces cerevisiae, se agrupan muchas cepas que presentan enzimas con características diferentes. Esta ultima posibilidad suena interesante porque nos invita a pensar en los requerimientos especiales podría satisfacer una H⁺ATPasa con dos sitios donde el magnesio tiene efectos regulatorios, para que encontremos levaduras que la tengan, pero tambien levaduras que se las arreglan con un solo sitio.

4.2.2. La afinidad por Mg-ATP en ausencia de Mg^{2+} es enorme.

Las regraficaciones de la cinética tienen otras implicaciones. La primera de ellas era esperada y es que en ausencia de iones magnesio libres, la V_{max} tiende a ser cero. La segunda no es tan esperada ni tan facil de explicar. En ausencia

de magnesio libre la $K_{m\text{ATP}}$ tiende a cero, esto significa que la afinidad de la enzima por el sustrato se puede considerar infinita para los rangos de concentraciones que utilizamos en la cinética. Hablar de afinidades infinitas carece de sentido, sin embargo a continuación daremos alguna información que nos aclarará este punto.

Grubmeyer, Cross y Penefsky estudiaron la catálisis de un solo sitio de la F_1 -ATPasa de corazón de res, y encontraron que, en las condiciones en que esta catálisis ocurre, la enzima muestra una afinidad enorme por el ATP, con valores del orden de 10^{-12} Molar, y casi no se puede detectar actividad de hidrólisis (Grubmeyer 1982) (ver donde se localizan esos valores en las regraficaciones K_m y V_{max}). Cuando se permite que el ATP interactúe con el segundo sitio, la afinidad de la enzima se reduce drásticamente, hasta alrededor de $30\mu\text{M}$, y la velocidad de hidrólisis en el primer sitio aumenta mas de un millón de veces.

Para explicar los resultados obtenidos en nuestro sistema pensamos que el Mg^{2+} uniéndose al sitio regulador de la enzima juega un papel semejante al del segundo sitio de la F_1 , disminuyendo la afinidad de la enzima por el sustrato y aumentando la velocidad. Los paralelos terminan allí, porque en la H^+ -ATPasa de membrana plasmática el sitio donde se une el Mg^{2+} no tiene actividad, por lo tanto veremos resultados diferentes en cuanto a la contribución del segundo sitio a la hidrólisis.

4.3. Como explicar con un solo sitio los dos comportamientos del Mg^{2+} ?

Esto no es tan complicado si pensamos que el magnesio altera simultaneamente ambos parametros cinéticos. En la figura 15 vemos una serie de curvas trazadas usando la ecuación de Michaelis con los dos parametros (K_m y V_{max}) creciendo simultaneamente. Si nos paramos en el punto "A" de concentración de MgATP y recorremos las líneas en orden creciente de concentración de Mg^{2+} veremos primero un aumento de actividad y despues una inhibición, mientras que el efecto en los parametros cinéticos fué siempre el mismo. Suponemos que en la $H^+ATPasa$ sucede exactamente eso.

4.4. Afinidad de la enzima por magnesio.

Cuando tratamos de calcular la afinidad de la $H^+ATPasa$ por el magnesio libre nos encontramos con una dificultad. Cuando se utiliza un rango amplio de concentraciones, las líneas de las dobles reciprocas se curvan como era de esperarse por el efecto inhibitorio del Mg^{2+} a altas concentraciones. Eso es lo que ha obligado a separar los resultados de las cinéticas en dos partes. La parte activadora y la inhibidora. Por otro lado los resultados de Ahlers para altas concentraciones de Mg^{2+} (el sitio inhibitorio) indican que existe un efecto reciproco entre el sitio de Mg^{2+} y el sitio activo, esto es que tambien el $Mg-ATP$ al unirse a la enzima tiene un efecto disminuyendo la afinidad por el Mg^{2+} , y nos impide calcular un valor de la $K_{m_{Mg}}$ libre. Este efecto reciproco tambien lo hemos observado nosotros y de manera semejante a lo que se dió para el sustrato parece ser que la afinidad de la enzima por el metal en ausencia de sustrato es muy alta.

Simulacion curvas de Actividad

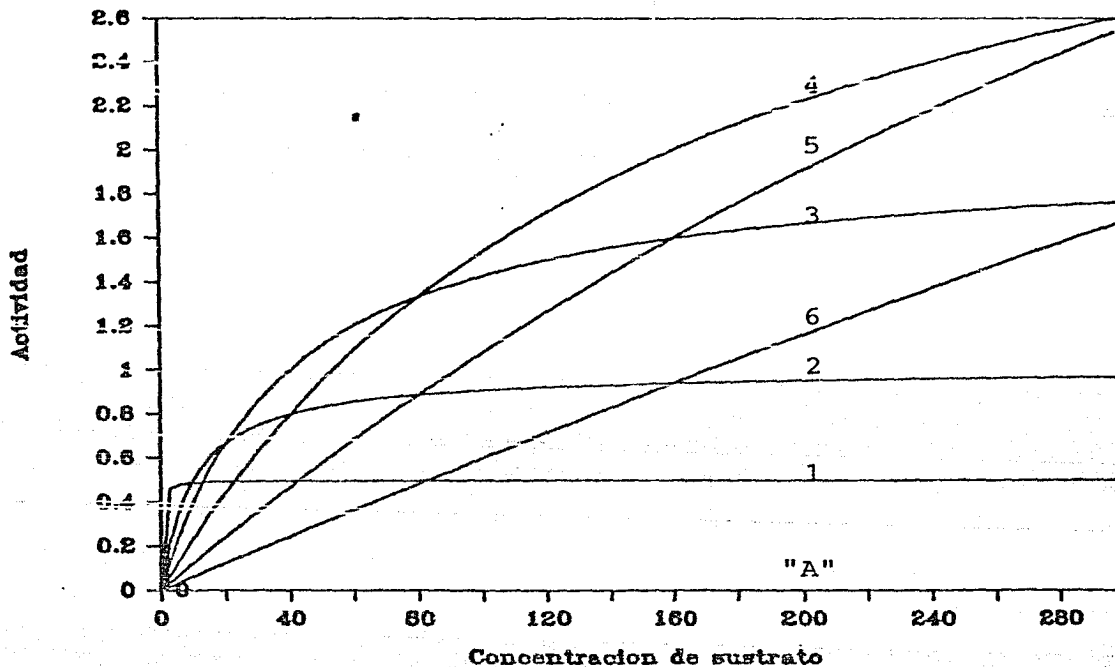


Figura 15. Curvas obtenidas aumentando simultaneamente la K_m y la V_{max} en la ecuación de Michaelis-Menten.

Efecto simulado de concentraciones crecientes de magnesio en cinéticas de la ATPasa. Las curvas están numeradas en orden de concentración. Se puede observar que a partir de la curva 4, hay una disminución de la actividad cuando se aumentan los parámetros K_m y V_{max} , cuando se utiliza una concentración fija de sustrato (pongamos 200). Algo semejante proponemos que pasa con el magnesio en la ATPasa. Su efecto en los parámetros cinéticos es siempre el mismo, pero como se usa una sola concentración de sustrato parece que al pasar de cierta concentración se convirtiera en inhibidor.

4.5. Perspectivas.

En lo referente al magnesio libre pensamos que los estudios de tipo cinético han dado casi toda la información que podían dar. Es necesario ahora iniciar un tipo diferente de estudios, para lo cual es necesario primero purificar la enzima. A eso nos hemos avocado en los últimos meses. Con respecto a los estudios por hacer pienso que estos tendrán que ser estequiométricos muy cuidadosas con la enzima purificada y en su forma más activa. Por el momento hemos pensado en estudios con EPR.

En estos estudios pensamos aprovechar que la enzima tiene buena actividad utilizando manganeso como cofactor (ver introducción 3.5.), y el manganeso es un metal que da muy buena señal en EPR. Lo que aún no hemos comprobado es si el manganeso muestra también un comportamiento de dos fases activación-inhibición como el magnesio, pero es lo más probable, considerando que los datos de la tesis indicaron que los dos efectos (activación e inhibición) son producto de un solo sitio.

CONCLUSIONES

1. El calcio en el rango micromolar inhibe a la H⁺ATPasa de membrana plasmática.
2. La inhibición por calcio no es una propiedad intrínseca de la enzima sino que le es conferida por un modificador al cual no hemos identificado.
3. Cambios en la fuerza iónica afectan la actividad de la ATPasa.
4. Cuando se controlan tanto la fuerza iónica como la formación del complejo Mg-ATP, el pH óptimo de la enzima es de 6.5.
5. El potasio no tuvo efecto específico sobre la actividad. Los efectos observados corresponden a fenómenos más generales como cambios en la fuerza iónica o alteraciones en la formación del complejo Mg-ATP.
6. La ATPasa mostró en las cinéticas un solo sitio para magnesio.
7. Regraficaciones de las cinéticas indicaron que en ausencia de magnesio la afinidad de la enzima por el sustrato es muy alta, probablemente en el rango picomolar.

B I B L I O G R A F I A

1. Addison R. y Scarborough G. A. Solubilization and purification of the Neurospora plasma membrane H^+ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 256, 24, 13165-13171. 1981.
2. Ahlers J. Temperature effects of kinetic properties of plasma membrane ATPase from the Yeast Saccharomyces cerevisiae; *B. B. Acta*, 649, 550-556. 1981.
3. Ahlers J. Effects of different salts on the plasma membrane ATPase and on proton transport in yeast; *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 998-1005, 1984.
4. Baum P., Furlong C. and Byers B.. Yeast gene required for spindle pole-body duplication: Homology of its product with Ca^{2+} -binding proteins; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 5512-5516. 1986.
5. Becker G. L. Regulation of free Ca^{2+} by liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 255, 19, 9009-9012. 1980.
6. Benedetti A., Fulceri R. and Comporti M.. Calcium sequestration activity in rat liver microsomes. Evidence for a cooperation of calcium transport with glucose-6-phosphatase; *B. B. Acta* 816, 267277. 1985.
7. Blasco F., Chapuis J. P. and Giordani R.. Characterization of the plasma membrane ATPase of Candida tropicalis; *Biochimie.* 63, 507-514. 1981.
8. Borst-Pauwels G. W. F. H. and Peters P. H. J.. Factors affecting the inhibition of yeast plasma membrane ATPase by vanadate. *B. B. Acta* 642, 173-181. 1981.
9. Bowman B. J. and Slayman C. W.. The effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of Neurospora crassa; *J. Biol. Chem.* 254, 8, 2928-2934. 1979.
10. Bowman B. J.. Comparison of the vacuolar membrane ATPase of Neurospora crassa with the mitochondrial and plasma membrane ATPases; *J. Biol. Chem.* 258, 24, 15238-15244. 1983.
11. Bradford M. M.. A rapid and sensitive method for the determination of microgram quantities of protein by the principle of protein dye binding; *Anal. Biochem.* 72, 248-254. 1976.
12. Calahorra F. M.. Generación de , pH y transporte de K^+ y Ca^{2+} en vesículas de membrana plasmática de Saccharomyces cerevisiae; Tesis de Maestría. UNAM. México. 1986.

13. Carafoli E.. Mitochondrial uptake of calcium ions and the regulation of cell function; Biochem. Soc. Symp. 39, 87-109. 1974
14. Carafoli E.. Calmodulin-sensitive calcium-pumping ATPase of plasma membranes: isolation, reconstitution and regulation; Fed. Proc. 43, 15, 3005-3010, 1982.
15. Caroni P. and Carafoli E.. Regulation of Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma by a phosphorylation-dephosphorylation process; J. Biol. Chem. 256, , 3263-3270. 1981.
16. Coll K. E., Joseph S. K., Corkey B. E. and Williamson J. R.. Determination of the matrix free Ca^{2+} concentration and kinetics of Ca^{2+} efflux in liver and heart mitochondria; J. Biol. Chem.. 257, 15, 8696-8704. 1982.
17. Conway E. J. and Brady T. G. Biochem. J. 47, 360-369. 1950.
18. Cross R. L., Grubmeyer Ch. and Penefsky H. S.. Mechanism of ATP hydrolysis by beef heart mitochondrial ATPase: Rate enhancement resulting from cooperative interactions between multiple catalytic sites; J. Biol. Chem. 257, 20, 12101-12105. 1982.
19. Delhez J., Dufour J. P., Thines D. and Goffeau A.. Comparison of the properties of Plasma membrane-bound and mitochondria-bound ATPases; Eur. J. Biochem., 79, 319-328. 1977.
20. Dufour J. P. and Goffeau A. Solubilization by lysolecitin and purification of the Yeast Schizosaccharomyces pombe; J. Biol. Chem. 253, 19, 7026-7032. 1978.
21. Dufour J. P., Boutry M. and Gouffeau A.. Plasma membrane ATPase of yeast; J. Biol. Chem.. 255, 12, 5735-5741. 1980.
22. Dufour J. and Tsong T. Y.. ATP-dependent proton pumping catalyzed by the purified yeast plasma membrane ATPase reconstituted into phospholipid vesicles; Biophys. J. 37, 96-97. 1982.
23. Dufour J. Goffeau A. and Tsong T. Y.. Active proton uptake in lipid vesicles reconstituted with the purified yeast plasma membrane ATPase; J. Biol. Chem.. 257, 16, 9365-9371. 1982.
24. Duffus J. H. and Patterson L. J.. Control of cell division in yeast using the ionophore, A23187 with calcium and magnesium; Nature 251, 626-627. 1974.
25. Eddy A. A. and Indge K. J.. The dependence of aminoacid transport in yeast on both, energy supply and intracellular potassium ions; Biochem J. 82, 15-17. 1962.

26. Eilam Y. and Grossowicz N.. Nystatin effects on cellular calcium in Saccharomyces cerevisiae; B. B. Acta 692, 238-243. 1982.
27. Eilam Y.. The effect of monovalent cations on calcium efflux in yeast; B. B. Acta 687, 8-16. 1982.
28. Eilam Y. Effects of phenothiazines on inhibition of plasma membrane ATPase and hiperpolarization of cell membranes in the yeast Saccharomyces cerevisiae; B. B. Acta 739, 601-610. 1984.
29. Fabiato A. and Fabiato F.. Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells; J. Physiol., Paris 75, 443-505. 1979.
30. Fiske C. A. and Subba-Rao Y.. The colorimetric determination of phosphorous. J. Biol. Chem. 177, 751-756. 1925.
31. Foury A., Amory A. and Gouffeau A.. Large scale purification and phosphorylation of a detergent- treated Adenosin Triphosphatase complex from plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae. J. Biochem. 119, 395-400. 1981.
32. Franzusoff A. J. and Cirillo V. P.. Glucose transport activity in isolated plasma membrane vesicles from Saccharomyces cerevisiae; J. Biol. Chem. 258, 6, 3608-3614. 1983.
33. Fuhrmann G. F. Preparation and identification of yeast plasma membrane vesicles; B. B. Acta 363, 295-310. 1974.
34. Goffeau A. and Slayman C. W.. The proton translocating ATPase of the fungal plasma membrane; B. B. Acta. 639, 197-223. 1981.
35. Greer Ch. and Schekman R.. Calcium control of Saccharomyces cerevisiae actin assembly; Mol. and Cell Biol. 2, 10, 1279-1286. 1982.
36. Grubmeyer Ch., Cross R. and Penefsky H. S.. Mechanism of ATP hydrolysis by beef heart mitochondrial ATPase: Rate constants for elementary steps in catalysis at a single site; J. Biol. Chem. 257, 20, 12092-12100. 1982.
37. Hubbard M., Bradley M., Sullivan F., Shepherd N. and Forrester J.. Evidence for the occurrence of calmodulin in the yeast Candida albicans and Saccharomyces cerevisiae; FEBS letters. 137, 85-88. 1982.
38. Makinuma Y., Ohsumi Y. and Annaku Y.. Properties of H⁺-translocating Adenosine Triphosphatase in vacuolar membranes of Saccharomyces cerevisiae; J. Biol. Chem. 256, 21, 10859-10863. 1981.
39. Kretsinger R. H.. The informational role of calcium in the cytosol; Adv. in Cyc. Nuclt. Res. 11, 2-26, 1979.

40. Lowry O. H. Protein measurements with the folin phenol reagent; *J. Biol. Chem.* 193, 265-275. 1951.
41. Malpartida F. and Serrano R.. Purification of the yeast plasma membrane ATPase solubilized with a novel zwitterionic detergent; *FEBS letters* 111, 69-72. 1980.
42. Malpartida F. and Serrano R.. Phosphorylated intermediate of the ATPase from plasma membrane of yeast; *Eur. J. Biochem.* 116, 2, 413-417. 1981 A.
43. Malpartida F. and Serrano R.. Reconstitution of the proton-translocating Adenosine Triphosphatase of Yeast plasma membranes; *J. Biol. Chem.* 256, 9, 4175-4177. 1981 E.
44. Matile P., Moor M. and Muhlethaler K.. Isolation and properties of the plasmalemma in yeast; *Arch. Mikrobiol.* 58, 201-211. 1967.
45. Matile P.. Properties of the purified cytoplasmic membrane of yeast *Rhodotorula gracilis*; in *Membranes structure and function*, *FEBS Symp.* vol. 20, pp. 39-49. Academic Press. London and N. Y. 1970.
46. Means A. R. and Chafouleas J. G.. Calmodulin in endocrine cells; *Ann. Rev. Physiol.* 44, 647-682. 1982.
47. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism; *Nature* 191, 144-148. 1967
48. Miyakawa T., Tachikawa T., Akada R., Tsuchiya E. and Fukui S.. Involvement of Ca^{2+} /calmodulin in sexual differentiation induced by mating pheromone rhodotorucine A in *Rhodosporeidium toruloides*; *J. Gen. Microbiol.* 132, 1453-1457. 1986.
49. Nakamura T., Fujita K., Eguchi Y. and Yazawa M.. Properties of Calcium dependent regulatory proteins from fungi and yeast. *J. Biochem.* 95, 1551-1557. 1984.
50. Nurminen T., Oura F. and Suolomainen H.. The enzymic composition of the isolated cell wall and plasmamembrane of bakers yeast; *Biochem J.* 116, 61-69. 1970.
51. Nurminen T., Taskinen L. and Suolomainen H.. Distribution of membranes especially the plasmamembrane fragments during zonal centrifugation of homogenates from glucose repressed *Saccharomyces cerevisiae*; *Biochem. J.* 134, 751-763. 1974.
52. Ohya Y., Ohsumi Y. and Anraku Y.. Genetic study of the role of Calcium ions in the cell division cycle of *Saccharomyces cerevisiae*: A calcium dependent mutant and its trifluoperazine-dependent pseudorevertants; *Mol. Gen. Genet.* 193, 389-394. 1984.

53. Peña A., Cinco G., García A., Gomez-Puyou A. and Tuena M.. Effects of externally added sodium and potassium ions on the glycolytic sequence of Saccharomyces cerevisiae; B. B. Acta. 148, 673- . 1967.
54. Peña A., Cinco G., Gomez-puyou A. and Tuena M.. Studies on the mechanism of the stimulation of glycolysis and respiration by K⁺ in Saccharomyces cerevisiae; B. B. Acta. 189, 1- . 1969.
55. Peña A., Cinco G., Gomez-Puyou A. and Tuena M.. Effect of the pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in Saccharomyces cerevisiae; Arch. Biochem. Biophys. 153, 413-425. 1972.
56. Perlin D. S., Kasano K., Brooker R. J. and Blayman C. W.. Electrogenic H⁺ Translocation by the plasma membrane ATPase of Neurospora; J. Biol. Chem. 259,12, 7684-7692. 1984.
57. Peters P. H. J. and Borst-Pauwels G. W. F. H.. Properties of plasmemembrane ATPase and mitochondrial ATPase of Saccharomyces cerevisiae; Physiol. Plant. 46, 330-337. 1979.
58. Rasmussen H., Kojima I., Kojima K., Zawulich W. and Appfeldorf W.. Calcium as intracellular messenger: sensitivity modulation, C-kinase pathway, and sustained cellular response; Adv. Cyt. Nucl. Prot. Phosph. Res. 18, 159-193. 1984.
59. Rebhun L. R.. Cyclic nucleotides, calcium and cell division; 1976.
60. Scarborough G. A.. The Neurospora plasma membrane ATPase is an electrogenic pump; Proc. Natl. Acad. Sci. 73, 5, 1485-1488. 1976.
61. Saavedra-Molina A., Villalobos R. and Borbulla M.. Calcium uptake during the cell cycle of Saccharomyces cerevisiae; FEBS letters 160, 195-197. 1983.
62. Serrano R.. Effect of ATPase inhibitors on the proton pump of respiratory-deficient yeast; Eur. J. Biochem. 105, 417-424. 1980.
63. Serrano R.. In vivo glucose activation of the yeast plasma membrane ATPase; 156, 11-14. 1983.
64. Serrano R.. Mol. Cell. Biochem. 22, 51-63. 1978.
65. Storer A. C., Darlison M. G. and Cornish-Bowden A.. The nature of experimental error in enzyme kinetic measurements; Biochem. J. 151, 361-367. 1975.
66. Stroobant P. and Scarborough G.. Active transport of calcium in Neurospora plasma membrane vesicles; Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 7, 3102-3106. 1979.

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

68. Suomalainen H. and Oura E.. Yeast nutrition and solute uptake in The Yeast Vol. 2 Physiology and Biochemistry of yeasts. Rose and Harrison editors. Academic Press. London and N. Y. 1971

69. Uchida E., Ohsumi Y. and Anraku Y.. Purification and properties of the H⁺-translocating, Mg²⁺-Adenosine Triphosphatase from vacuolar membranes of Saccharomyces cerevisiae; J. Biol. Chem. 260, 2, 1090-1095. 1985.

70. Villalobo A., Boutry M. and Coffeau A.. Electrogenic proton translocation coupled to ATP hidrolisis by the plasma membrane Mg²⁺-dependent ATPase of yeast in reconstituted proteoliposomes; J. Biol. Chem. 250, 23, 12081-12087. 1981.

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

72. Villalobo A. Energy dependant H⁺ and K⁺ translocation by the reconstituted yeast plasma membrane ATPase. Can. J. Biochem. Cell Biol. 62, 865-877. 1984.

73. Whitfield J. F., Boyton A. L., MacManus J. P., Rixon R. H., Sikorska M., Tsang B. and Walker P. R.. The roles of calcium and cyclic AMP in cell proliferation; Annals N. Y. Acad. Sci. 216-240 1980.

74. Willsky G. R.. Characterization of the plasma membrane Mg²⁺-ATPase from the yeast Saccharomyces cerevisiae; J. Biol. Chem. 254, 9, 3326-3332. 1979.

75. Yingst D. R. and Polasek P. M.. Sensitivity and reversibility of Ca-dependent inhibition of the (Na⁺/K⁺)-ATPase of human red blood cells; B. B. Acta 813, 282-286. 1985.