

ATPasa-(Na⁺,K⁺). ESTUDIO CINETICO DE LOS SITIOS
CATALITICOS DE LA ENZIMA.

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN BIOQUIMICA
PRESENTA:

Q.F.B. MARGARITA DEL CARMEN RAMIREZ ORTEGA.

M. Ramirez Ortega

ASESOR: DR. EDMUNDO CHAVEZ COSSIO.

Edmundo Chavez Cossio

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

En el estudio hecho con ATPasa-(Na⁺,K⁺) (EC 3.6.1.3.) de médula externa de riñón de perro se encontró que el K⁺ activa la reacción de fosfatasa que muestra esta enzima con una $[K]_{0.5}=4.9\text{mM}$. En este efecto existen interacciones de tipo cooperativo positivas entre los sitios del K⁺ $n_H=1.78$. En presencia de Na⁺ a una concentración fija de 30mM se titulan dos sitios para el K⁺ uno de alta afinidad $K_{0.5}=0.65\text{mM}$ con efectos cooperativos negativos $n_H=0.63$ y otro con menor afinidad $[K]_{0.5}=12.6\text{mM}$ con interacciones cooperativas positivas $n_H=2.2$. Durante la activación de la reacción de fosfatasa por efectos del ATP a concentraciones que saturan el sitio de alta afinidad en presencia de Na⁺ y K⁺ se observó: a) Se requiere de hidrólisis de ATP en el sitio de alta afinidad. b) Hay hidrólisis simultánea de ATP y pNFP. c) La relación de hidrólisis pNFP/ATP es dependiente de la concentración de Na⁺, hasta concentraciones de Na⁺ 20mM la relación pNFP/ATP es de 4 y a concentraciones de Na⁺ de 100mM esta relación disminuye a 2. En la cinética de activación de la fosfatasa dependiente de K⁺ por ATP (μM) en presencia de Na⁺, existen interacciones cooperativas positivas a concentraciones de ATP menores a 1 μM el n_H obtenido es de 3; mientras que a concentraciones mayores a 1 μM no hay interacciones cooperativas entre los sitios del ATP $n_H=1$. Por primera vez se observan en representación de Hill dos componentes de afinidad elevada para el ATP y se obtiene un n_H mayor a 1 para los sitios del sustrato. El pNFP modifica la afinidad del ATP en los sitios de alta afinidad y el ATP a concentraciones mM modifica la afinidad del pNFP por la enzima, esto se puede explicar en función de dos sitios para el ATP los cuales interaccionan entre sí, uno se fosforila activando la hidrólisis en el otro.

SUMMARY

In kinetic studies made with $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -dependent ATPase (EC 3.6.1.3) obtained from outer medulla of canine kidney the phosphatase reaction, also catalyzed by the enzyme was activated by K^+ with a $[\text{K}^+]_{0.5} = 4.9$ mM. In this activation there are interactions with positive cooperativity between K^+ sites $n_H = 1.78$. In the presence of Na^+ at a fixed concentration (30 mM) two sites for K^+ are determined, the high affinity site $K_{0.5} = 0.65$ mM with negative cooperativity $n_H = 0.63$ and the site with less affinity $[\text{K}^+]_{0.5} = 12.6$ mM with positive cooperative interactions $n_H = 2.2$. In the stimulation of phosphatase reaction by ATP at concentration which saturate the high affinity site in the presence of Na^+ - plus K^+ it was observed that: a) ATP hydrolysis is required in the high affinity site. b) simultaneous hydrolysis exists of ATP and pNFP. c) The hydrolysis ratio pNFP/ATP is dependent on the Na^+ concentration. Up to Na^+ concentrations of 20 mM the pNFP/ATP ratio is 4 and at concentrations of 100 mM this ratio is reduced to 2. In the activation kinetics of K^+ -dependent phosphatase by ATP (μM) in the presence of Na^+ , there are positive cooperativity at ATP concentrations less than 1 μM and the n_H obtained is 3, meanwhile at concentrations greater than 1 μM there are not cooperative interactions between ATP sites - $n_H = 1$. This is the first time that two components with high affinity are observed in the Hill plot for ATP in $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase and an n_H greater than 1 is obtained for the substrate sites. pNFP modifies the ATP affinity in the high affinity sites and at mM concentrations ATP modifies the pNFP affinity for the enzyme, this can be explained by the hypothesis of two ATP sites with close interactions between them.

I N D I C E

	Páginas
INTRODUCCION	
Generalidades	1
Localización y Purificación	1
Composición	2
Lípidos	4
Funciones de Transporte	4
Especificidad de Sustrato	6
Actividad de Fosfatasa	8
Inhibidores	10
Formas Conformacionales	11
Intermediarios Fosforilados	16
OBJETIVOS	16
HIPOTESIS DE TRABAJO	16
MATERIAL	17
METODOS	17
RESULTADOS	
I. Electroforésis en Geles de Poliacrilamida-SDS	22
II. Actividad de Fosfatasa Dependiente de K^+	22
III. Relación de Hidrólisis pNFP/ATP	27
IV. Activación de la Fosfatasa de K^+ por ATP(μ M) y Na^+ 20mM	39
DISCUSION	48
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA	56

INTRODUCCION :

GENERALIDADES

En 1957 Skou (1) describi6 que un extracto obtenido a partir de nervio de cangrejo poseia actividad enzimatica de ATPasa estimulada por la adici6n de Na^+ y K^+ .

Las c6lulas animales para mantener concentraciones citoplasmaticas bajas de Na^+ y altas de K^+ con respecto a las concentraciones existentes en el fluido extracelular, requieren de un transporte activo dependiente de energia metab6lica. Actualmente est6 ampliamente demostrado que la Adenosintrifosfatasa dependiente de Na^+ y de K^+ (ATP-Fosfohidrolasa EC - 3.6.1.3) (ATPasa-(Na^+ , K^+)) es la enzima responsable del transporte de Na^+ y K^+ a trav6s de la membrana celular (2-5).

En condiciones no fisiol6gicas la enzima puede llevar a cabo la reacci6n en sentido inverso y acoplar el flujo de cationes en direcci6n de sus gradientes (disipaci6n de energia del gradiente) a la sntesis de ATP. Por lo tanto la ATPasa -(Na^+ , K^+) es un sistema transductor de energia que transforma reversiblemente energia quimica en gradiente electroquimico (6).

En experimentos realizados utilizando un sistema reconstituido de vesiculas cerradas de fosfolipidos con la enzima altamente purificada (7-9), y adem6s estudios hechos en fantasmas de eritrocitos (10, 11) se ha encontrado que la relaci6n de Na^+ transportado al exterior y de K^+ al interior de la c6lula es de 3:2 y para que se realice este transporte se requiere de la hidr6lisis de una mol6cula de ATP, as6 pues la estequiometria es — $\text{Na}^+ : \text{K}^+ : \text{ATP}$ 3:2:1.

El flujo de iones a trav6s de la ATPasa-(Na^+ , K^+) es sensible a esteroides cardioactivos y digit6licos como la Ouaba6na, de tal forma que los flujos de iones sensibles a Ouaba6na se consideran flujos a trav6s de la tambi6n llamada bomba de Na^+ (12).

LOCALIZACION Y PURIFICACION

La ATPasa-(Na^+ , K^+) se localiza en la membrana plasmatica celular y se ha purificado de las siguientes fuentes: m6dula externa de ri6n de cone

jo, carnero y cerdo (13), órgano eléctrico de Electrophorus electricus – (14), glándula salina rectal de tiburón (15) y parcialmente pura de corteza cerebral de bovino (16), corazón de: rata (17), perro y ternera (18); en humanos se ha purificado parcialmente de leucocitos y eritrocitos (12).

Para la purificación de la enzima se han seguido principalmente dos es – trategias, ambas parten de material microsomal. La primera involucra la eliminación de proteínas extrañas de la membrana, utilizando agentes ca – trópicos como el NaI (19, 20) y de detergentes como dodecil sulfato de so – dio (SDS) (13). Las membranas que retuvieron la ATPasa-(Na⁺, K⁺) se se – paran usualmente por centrifugación sobre gradientes de densidad (13). – La segunda estrategia consiste en disolver la membrana con detergentes no iónicos como el Lubrol (14, 15) o iónicos como el desoxicolato (20) y – posteriormente fraccionar la mezcla por precipitación selectiva (20) o – técnicas cromatográficas (21); la ATPasa-(Na⁺, K⁺) se obtiene asociada a lípidos (13).

COMPOSICION.

Independientemente de la fuente de donde se obtenga y la metodología utilizada para su purificación, todas la preparaciones de ATPasa-(Na⁺, K⁺) – que se han descrito son semejantes, contienen dos subunidades polipeptídi – cas, una de PM 90-100 KD denominada subunidad α y otra de PM alrededor de 45 KD nombrada subunidad β (2-4).

Se ha descrito un tercer componente de la ATPasa-(Na⁺, K⁺) que es un poli – péptido de PM de 12 KD el cual se marca por fotoafinidad con un derivado de Ouabaína (22).

Utilizando (γ -³²P)-ATP se ha demostrado que la subunidad α se fosforila y por lo tanto es la subunidad catalítica (16); también se ha localizado en ella el sitio de unión para la Ouabaína (19). La subunidad α es una proteína que atraviesa la membrana celular, ya que la Ouabaína se une a la ATPasa por el lado orientado hacia el exterior de la célula (16) y la hidrólisis de ATP se realiza en el interior (23). También se ha demos – trado que esta subunidad atraviesa la membrana con anticuerpos preparados contra la subunidad α , en células integras (eritrocitos) se obser

va que el anticuerpo reacciona con determinantes antigénicos de la enzima localizados en la superficie extracelular, cuando se absorben cuantitativamente estos anticuerpos con eritrocitos, los anticuerpos restantes reaccionan con microsomas de riñón tratados con detergente, indicando la existencia de sitios antigénicos citoplasmáticos (24) de la misma forma se ha demostrado con anticuerpos preparados contra la subunidad β , que ésta también atraviesa la membrana celular (24).

Ambas subunidades son glicoproteínas, se ha probado purificando y aislando cada una de las subunidades y haciendo el análisis del contenido de aminoácidos y carbohidratos (25), los carbohidratos reportados son: amino azúcares, azúcares neutros y ácido siálico (26). También se han hecho estudios en los cuales se somete la enzima a electroforesis en geles de poliacrilamida SDS, la tinción de los geles se realiza con el reactivo de Schiff-periodato el cual reacciona con polisacáridos y se observa que las bandas que se tiñen corresponden a los PM de la subunidad α y la β (26-28).

Hasta el momento no se ha identificado en la subunidad β ningún sitio catalítico, ni sitios de unión para cationes que estén relacionados con el funcionamiento de la ATPasa-(Na^+ , K^+), las evidencias de que es parte integral de la enzima se basan en las observaciones siguientes: 1) Copurifica junto con la cadena polipeptídica α (16). 2) Tiene la capacidad de entrecruzarse con la subunidad α al emplear reactivos cortos bifuncionales (27). 3) Al utilizar anticuerpos contra la subunidad β hay una inhibición de la actividad de la ATPasa-(Na^+ , K^+) (29, 30). 4) Cuando se emplea un glucósido cardíaco que posee una cadena larga de carbohidratos y un grupo reactivo, se une a la subunidad β (31).

El PM para el complejo funcional se ha estimado que es de 250 a 300 KD en estudios realizados por inactivación por radiación (32) y filtración en gel (27). Existe controversia en cuanto a la relación estequiométrica de las dos subunidades en el complejo funcional, hay reportes donde las relaciones α : β son de 2:1 (PM 250 KD), 1:1 (PM 170 ± 9 KD) y 1:2 (PM 158 KD) (19, 20, 28, 33-35), en investigaciones en donde emplean reactivos entrecruzadores, señalan que se requiere de 2 subunidades α en el complejo enzimático funcional (36).

LIPIDOS.

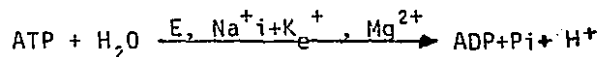
La ATPasa-(Na⁺,K⁺) como la mayoría de las enzimas localizadas en membrana, requiere fosfolípidos para su actividad. La eliminación de lípidos de preparaciones microsomales por medio de detergentes (37-39), solventes orgánicos (40-42) o tratamiento con fosfolipasa (43-46) conducen a la inactivación parcial o total de la enzima. En microsomas y en la ATPasa (Na⁺, K⁺) purificada de médula externa de riñón de conejo, los 5 principales fosfolípidos presentes son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanol - amina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y esfingomiélin (47). Existen estudios (37, 44, 46, 48) para averiguar si la pérdida de la actividad se debe a la eliminación de algún fosfolípido específico, que pudiera ser esencial para la función enzimática o si se debe al rompimiento de la estructura membranal como resultado de la eliminación de los lípidos. De experimentos hechos por Wheeler y Whittan (39) parece ser que la fosfatidilserina es esencial para el funcionamiento de la ATPasa (Na⁺, K⁺).

FUNCIONES DE TRANSPORTE

Intercambio Na⁺/K⁺ acoplado.

Tanto la actividad de ATPasa como el transporte de Na⁺ y K⁺ a través de la membrana celular se activan por la presencia simultánea de ATP, Mg²⁺ y Na⁺ en el interior de la célula y de K⁺ en el exterior y ambas funciones son inhibidas por digitálicos como ouabaína (3, 49, 50).

En condiciones fisiológicas la bomba de sodio acopla la salida de Na⁺ a través de la membrana plasmática a la entrada de K⁺, el transporte es activo pues requiere la hidrólisis intracelular de ATP y Pi, ésta es la función de ATPasa dependiente de Na⁺ y K⁺.



Como ya se mencionó anteriormente, la relación de Na⁺ transportado hacia el exterior de la célula y K⁺ hacia el interior por molécula de ATP hidrolizada es de 3Na⁺: 2K⁺: 1ATP (10,51). La salida neta de una carga positiva indica que la bomba de Na⁺ es electrogénica. Esto se demuestra

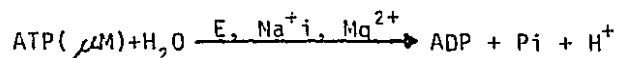
en estudios realizados con la enzima reconstituida en liposomas y el uso del anión permeante (^{14}C) SCN^- , donde se mide la captación del anión en estas — membranas durante el funcionamiento de la bomba en presencia y ausencia de — ATP-Mg en el exterior, el bombeo de Na^+ es hacia el interior y el K^+ hacia — el exterior de las vesículas, la captación del anión es 3 veces mayor en pre — sencia de ATP-Mg que el valor respectivo en su ausencia, esto es debido al — potencial positivo intraliposomal resultado del bombeo electrogénico de Na^+ — y K^+ , lo que indica que la bomba funciona contribuyendo el establecimiento — del potencial de membrana (11, 52, 53).

SINTESIS DE ATP

En vesículas cerradas o en fantasmas de eritrocitos se pueden invertir las concentraciones de Na^+ y K^+ y en presencia de ADP y Pi el funcionamiento de la bomba de sodio es contrario al normal, bajo estas condiciones la enzima sintetiza ATP (54, 55) conservandose la estequiometría del transporte des — crita anteriormente.

SALIDA DESACOPLADA DE Na^+

En la ausencia Na^+ y K^+ extracelular y en presencia de Na^+ intracelular, la bomba produce la salida de Na^+ "desacoplada" (56, 57). Se requiere de ATP intracelular y por cada molécula de ATP hidrolizada salen de 2 a 3 Na^+ (57). Esta salida no es contra un gradiente de concentración; es sensible a ouabaina y a las concentraciones de Na^+ intracelulares, por lo cual se identifica con la bomba de Na^+ . A diferencia del intercambio Na^+/K^+ (ATPasa-(Na^+ , K^+)), el — cual funciona mejor a concentraciones mM de ATP, la salida de Na^+ desacopla — da alcanza su máximo con ATP 1 μM (57). Esta diferencia puede ser explica — da por estudios cinéticos de la ATPasa (Na^+ , K^+) que muestran dos clases de sitios para el sustrato (57, 58) uno de alta afinidad, Km 0.1 a 3 μM y otro de baja afinidad, Km 480 μM . Esta salida desacoplada de Na^+ corresponde a la reacción de ATPasa dependiente de Na^+ que lleva a cabo la ATPasa-(Na^+ , K^+).



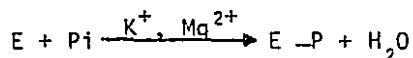
INTERCAMBIO Na^+/Na^+

En ausencia de K^+ extracelular y en presencia de Na^+ extra e intracelular, la

bomba efectúa un intercambio de Na^+ a través de la membrana en relación de 1:1, no hay transporte neto de Na^+ (56, 59) y se requiere la presencia de ATP y ADP (56, 60) y la velocidad se incrementa linealmente con la concentración de ADP (61). No hay hidrólisis neta de ATP aunque análogos no hidrolizables no lo pueden sustituir (60). Esta es una reacción de intercambio $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{ADP}$, dependiente de Na^+ . Con Na^+ , Mg^{2+} , ^{14}C -ADP y ATP no marcado se puede detectar la formación de ATP radioactivo (62).

INTERCAMBIO K^+/K^+

En ausencia de Na^+ intracelular y en presencia de K^+ en ambos lados de la membrana, la bomba lleva a cabo un intercambio de K^+ a través de la membrana en relación 1:1, sin que haya transporte neto (63, 64). Se requiere P_i y ATP en el interior de la célula, análogos del ATP no hidrolizables (adenil-5'-il imidodifosfato = AMP-PNP) pueden sustituir al ATP (64); no se requiere ADP. Esta forma de transporte parece corresponder a la fosforilación de la enzima dependiente de K^+ llevada a cabo por P_i , con la diferencia de que para esta reacción no se requiere ATP. Con K^+ , Mg^{2+} , y P_i radiactivo, la enzima se fosforila sobre el grupo β -carboxil del mismo residuo aspartil en el que se fosforila por el ATP durante el transporte acoplado de Na^+/K^+ (65).



ESPECIFICIDAD DE SUSTRATO

el sustrato primario para la ATPasa-(Na^+ , K^+) es el complejo ATP-Mg. Otros nucleótidos son hidrolizados a velocidades menores (del 15 al 0.5% de la actividad obtenida con el ATP), en el siguiente orden decreciente de actividad: $\text{ADP} > \text{dATP} > \text{CTP} > \text{GTP} > \text{ITP}$ y UTP (18, 50, 66). La unión del sustrato ocurre en ausencia de Mg^{2+} aunque se hidroliza (50) y el sustrato verdadero para la enzima es el complejo ATP-Mg. En estudios de cinética de sustrato con ATPasa-(Na^+ , K^+) se han encontrado 2 valores de K_m aparente para el complejo de ATP-Mg, el primero en el rango de 0.1 a $3 \mu\text{M}$ y el segundo de $480 \mu\text{M}$ (67). Este dato señala la posible existencia de 2 sitios con diferente afinidad por el ATP en la enzima. El ADP compete con el ATP por el sitio mayor afinidad (68, 69) pero el P_i no lo hace (69, 70). Otros cationes divalentes como el Mn^{2+} , y el Co^{2+} , pueden sustituir al Mg^{2+} aunque

cabe señalar que la eficiencia es diez veces menor. Por otro lado Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} y Be^{2+} inhiben la hidrólisis del ATP (71). La principal característica de la enzima es que requiere la presencia de Na^+ y K^+ . Los requerimientos de Na^+ son absolutos pues ningún otro catión monovalente lo puede sustituir, sin embargo el K^+ puede ser reemplazado por Tl^+ , Rb^+ , Cs^+ y NH_4^+ , así como compuestos orgánicos como la hidroxilamina. El Li^+ también puede sustituirlo pero con una afinidad muy baja (72).

ACTIVIDAD DE FOSFATASA

La ATPasa-(Na^+ , K^+) también cataliza una reacción de fosfatasa dependiente de K^+ (73). Durante el proceso de purificación de la ATPasa-(Na^+ , K^+), la actividad de fosfatasa copurifica con la de ATPasa (74, 75) y cuando la preparación enzimática de ATPasa-(Na^+ , K^+) se somete a la acción del calor, a tratamientos con enzimas proteolíticas y al efecto de inhibidores como la ouabaína, la actividad de ATPasa y fosfatasa se pierden en paralelo (73, 76-78).

La especificidad de sustrato para la reacción de fosfatasa es baja ya que hidroliza una variedad de compuestos de tipo anhídridos del ácido fosfórico como el acetyl fosfato (AcP), carbamil fosfato, p-nitrofenilfosfato (pNFP) y umbeliferona fosfato (76, 78). Para que se lleve a cabo la hidrólisis de estos pseudosustratos se requiere K^+ y Mg^{2+} , existen estudios (73, 79, 80) que indican la existencia de un sólo sitio para la hidrólisis del sustrato para la fosfatasa y éste posee propiedades del sitio de baja afinidad para el ATP, pues cuando utiliza pNFP como sustrato el ATP a concentraciones mM tiene un efecto inhibitor sobre la reacción de fosfatasa, parece ser que la inhibición es de tipo competitivo (68, 81), la K_I para el ATP como inhibidor de la fosfatasa se compara a su K_m para el sitio de baja afinidad en la actividad de ATPasa-(Na^+ , K^+) (68).

El Na^+ en ausencia de K^+ también promueve una actividad de fosfatasa aunque esta actividad es menor que la obtenida en presencia de K^+ (82).

El Na^+ inhibe la actividad de fosfatasa dependiente de K^+ , cuando no hay Na^+ presente el ATP a concentraciones μM también es inhibidor de la fosfatasa, pero cuando están presentes tanto Na^+ mM y ATP μM y la concentración de K^+ es menor a 1 mM hay una estimulación de la actividad de fosfatasa (79, 80, 83). Esta activación probablemente ocurra vía fosforilación de un sitio activador, posiblemente el de alta afinidad para el ATP en la ATPasa-(Na^+ , K^+), la acti-

vación se debe al aumento de la afinidad de la enzima por el K^+ (72, 84).

INHIBIDORES

La ATPasa-(Na^+ , K^+) es sensible a varios inhibidores como los glucósidos cardíacos o digitálicos, reactivos de grupos sulfhidrilos, oligomicina, butanediona, 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1, 3 diazol, vanadato, fluoruro y otros (4). Solamente se explicará el mecanismo por el cual inhiben la Ouabaína, la Oligomicina y el Vanadato, que son los inhibidores más utilizados para explicar el mecanismo de las reacciones parciales de la ATPasa-(Na^+ , K^+).

GLUCOSIDOS CARDIACOS

Esta familia de inhibidores muestra una especificidad casi absoluta por la ATPasa-(Na^+ , K^+) y por lo tanto han sido empleados para determinar la presencia y función de esta ATPasa en una variedad de tejidos (12). La Ouabaína es la que ha sido usada más ampliamente, inhibe la unión de ATP (85) y la defosforilación del intermediario fosforilado (86), uniéndose a la ATPasa por la superficie externa de la membrana celular (87, 88). El número de sitios de unión de la Ouabaína es igual al número de sitios de unión de ATP y de sitios de fosforilación (89) en la ATPasa-(Na^+ , K^+). Ciertas condiciones favorecen la unión de los digitálicos a la enzima como son: la presencia de Na^+ , Mg^{2+} y ATP, o de Mg^{2+} y P_i , esto es debido a que estos ligandos o combinación de ligandos estabilizan la conformación de la enzima E_2P (90), que es la forma de la enzima por la cual son más afines los digitálicos.

El K^+ reduce la inhibición por Ouabaína, este efecto se ha visto en experimentos en los cuales se mide la velocidad de unión del inhibidor a la enzima en presencia de diferentes combinaciones de ligandos (Mg^{2+} , $Mg+P_i$ o $Mg^{2+} + Na^+ + ATP$) los cuales incrementan la velocidad de unión, al repetir los experimentos en presencia de K^+ se observa que disminuye la velocidad de unión de la Ouabaína a la enzima (91, 93).

La unión de una molécula de Ouabaína por molécula de ATPasa inhibe todas las funciones enzimáticas desde la unión del ATP a la enzima hasta la actividad de fosfatasa dependiente de K^+ (50, 79). Con preparaciones enzimáticas de diferente origen de órganos y especies la K_0 para la Ouabaína y otros digitálicos varía, siendo la de corazón de rata la menos afín por estos inhibidores (94, 95).

OLIGOMICINA

La oligomicina inhibe las reacciones de ATPasa-(Na⁺, K⁺) y la ATPasa-Na⁺, tiene poco efecto sobre la actividad de fosfatasa de K⁺ y puede estimular la reacción de intercambio ADP/ATP (80, 96, 97, 98). Esto indica que la oligomicina actúa preferencialmente sobre la transformación de E₁~P a E₂-P (97). La oligomicina inhibe la defosforilación dependiente de K⁺ de la enzima fosforilada - en presencia de Na⁺ y ATP (99). Además inhibe las actividades de pNFPasa y Acetil fosfatasa en la presencia de Na⁺ (96) también disminuye la estimulación de las actividades de pNFPasa y acetil fosfatasa de K⁺ dependientes de fosforilación por ATP en presencia de Na⁺ (80). A concentraciones elevadas de Mg²⁺ libre (3 mM) que incrementan la proporción de la conformación E₂-P se contrarresta la inhibición por oligomicina (96). Por lo tanto la oligomicina se une a la enzima bajo condiciones que favorecen la formación de E₁ y actúa bloqueando la transición de E₁~P ↔ E₂-P (67, 97).

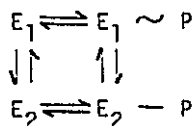
VANADATO

Cantley y col. (100) demostraron que la ATPasa-(Na⁺, K⁺) posee dos sitios de unión para el Vanadato un sitio de alta afinidad con una K_D = 4 nM, y otro sitio de baja afinidad con una K_D de 0.5 μM. Por medio de experimentos de competencia encontraron que el VO₄³⁻ a concentraciones nM compite con el ATP -- por el sitio de baja afinidad para éste y a concentraciones μM compite con el de alta afinidad para el ATP (100). La inhibición por VO₄³⁻ requiere Mg²⁺ y se lleva a cabo en la superficie intracelular de la enzima, el K⁺ actuando en la superficie extracelular potencia su acción (101) y además el Pi antagoniza la inhibición de VO₄³⁻ (100). Se postula que la gran afinidad del VO₄³⁻ por la ATPasa-(Na⁺, K⁺) se debe a la estructura bipiramidal trigonal del vanadato que sería análoga al estado de transición propuesto para Pi en la forma enzimática E₂-P, lo que sugiere que el sitio de alta afinidad para vanadato - puede ser el sitio donde se libera el Pi en el curso de la reacción de la ATPasa-(Na⁺, K⁺) en la conformación E₂-P. Beaugé (102) sugiere que la inhibición de la ATPasa-(Na⁺, K⁺) por VO₄³⁻ se debe a que disminuye la liberación del K⁺ después de la defosforilación de E₂-P, uniéndose al sitio de baja afinidad para el ATP, ya que el ATP al unirse a este sitio acelera la liberación de K⁺, y por lo tanto el cambio de conformación de E₂ ↔ E₁. Por otro lado la ATPasa de Na⁺ se inhibe hasta que el sitio de baja afinidad para el VO₄³⁻ se satura, - que correspondería al sitio de alta afinidad para el ATP (100), la K_i para el

efecto inhibitorio de VO_4^{3-} sobre la ATPasa-Na^+ es de $1 \mu\text{M}$ (82). El vanadato inhibe la actividad de fosfatasa con una $K_i = 0.05 \mu\text{M}$ y a la $\text{ATPasa-(Na}^+, \text{K}^+)$, con una $K_i = 0.5 \mu\text{M}$ (82), estos datos muestran que la actividad de fosfatasa es más sensible a este inhibidor que la $\text{ATPasa-(Na}^+, \text{K}^+)$ y que probablemente el sitio de hidrólisis del pNFP sea el sitio de baja afinidad para el ATP.

FORMAS CONFORMACIONALES:

En su ciclo catalítico la $\text{ATPasa-(Na}^+, \text{K}^+)$ sufre cambios conformacionales que se pueden representar de la siguiente forma condensada:



Los cambios involucran la presencia de cuatro formas enzimáticas diferentes: dos no fosforiladas E_1 y E_2 y dos fosforiladas $E_1 \sim P$ y $E_2 - P$.

FORMAS CONFORMACIONALES E_1 Y E_2 :

E_1 y E_2 lograron distinguirse por medio de estudios de digestión enzimática controlada con tripsina y de cambios de fluorescencia intrínseca de la proteína; Jørgensen (103) reporta que la digestión controlada de la $\text{ATPasa-(Na}^+, \text{K}^+)$ por tripsina rompe solamente en sitios sobre el péptido α , la presencia de ligandos durante la digestión determina cuales enlaces se rompen:

- En presencia de KCl 150 mM el péptido $-\alpha$ se rompe en dos fragmentos con PM de 58 KD y 48 KD , con esta ruptura se pierden en paralelo la actividad de $-\text{ATPasa-(Na}^+, \text{K}^+)$, la unión de ATP y la fosforilación del péptido $-\alpha$; la pérdida de la actividad de fosfatasa de K^+ fue ligera. Jørgensen nombró a las conformaciones sensibles a este rompimiento forma "K", otros ligandos capaces de producir esta forma "K", son MgCl_2 y $\text{ATP} + \text{MgCl}_2 + \text{NaCl}$ (104, 105).
- En presencia de NaCl 150 mM , la digestión triptica sigue un curso con fragmentos diferentes de aquellos obtenidos con KCl , obteniéndose un trozo de PM 70 KD (103, 104). Se pierde casi la mitad de la actividad de $\text{ATPasa-(Na}^+, \text{K}^+)$ junto con el 85% de la actividad de fosfatasa de K^+ . En contraste, la unión de ATP y el nivel de fosforilación casi no cambian y la reacción de intercambio ADP/ATP se incrementa al doble. Esta última observación es consistente con la demostración de que el intercambio $\text{ATP} \leftrightarrow \text{ADP}$ (una función $E_1 - P$) se incrementa, mientras que la desfosforilación sensible a K^+ (una función $E_2 - P$) está disminuida (104).

Cambios de Fluorescencia Intrínseca de la Proteína.

Una evidencia más para la existencia de las formas enzimáticas E_1 y E_2 (Forma "Na" y Forma "K"), fue presentada por Karlsh y Yates (106) quienes midieron los cambios de fluorescencia intrínsecos de los grupos triptofano en la proteína. Trabajaron con una preparación de enzima purificada y encontraron que la fluorescencia aumenta por la adición de K^+ al medio (lo cual interpretaron como la conversión de la forma "Na" o E_1 a la forma "K" o E_2), y este efecto era antagonizado por la adición de Na^+ o ATP (este resultado señalaba que el Na^+ o el ATP favorecen la conversión de E_2 a E_1). Cuando se mide la velocidad de estas transformaciones (58) se demuestra que el ATP acelera la disminución de la fluorescencia intrínseca de la proteína.

INTERMEDIARIOS FOSFORILADOS. $E_1 \sim P$ Y $E_2 - P$

La enzima puede fosforilarse bajo dos condiciones diferentes:

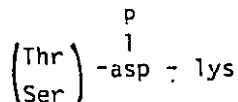
1) Fosforilación por ATP

Para que se lleve a cabo esta fosforilación, se requiere Mg^{2+} 2 mM, Na^+ 20 mM y (γ - ^{32}P -ATP) 40 μ M; se mide la concentración de enzima fosforilada en estado estacionario. La fosfoenzima es estable en medio ácido, por lo cual se puede precipitar y cuantificar el ^{32}P unido a la enzima (107). La enzima fosforilada bajo estas condiciones es la $E_1 \sim P$ y la naturaleza del enlace es de alta energía, ya que puede ser defosforilada por el ADP para llevar a cabo síntesis de ATP o intercambio $ATP \leftrightarrow ADP$ (97).

2) Fosforilación por P_i

La incorporación de $^{32}P_i$ en la enzima es dependiente de Mg^{2+} . La Ouabaína aumenta la velocidad y el nivel de fosforilación de la enzima, se requiere Mg^{2+} 5mM y $^{32}P_i$ 100 μ M en presencia o ausencia de Ouabaína 0.1 mM, también es estable en medio ácido, por lo que después de la precipitación se cuantifica el $^{32}P_i$ incorporado (107). La forma enzimática fosforilada bajo estas condiciones es la $E_2 - P$ la cual es una forma de menor energía que es sensible a K^+ puesto que se defosforila en su presencia y no hay formación de ATP en presencia de ADP.

Cuando las formas enzimáticas fosforiladas $E_1\sim P$ o E_2-P se someten a proteólisis con pepsina los fragmentos resultantes marcados con radioactividad son de igual peso molecular (2,200 daltons), cuando se tratan con pronasa, el fragmento marcado con radioactividad es de $PM = 380$ daltons, independientemente de que la enzima haya sido fosforilada con $(\mu^{32}\text{-P}) - \text{ATP}$ o con $^{32}\text{P}_i$, o si se ha fosforilado por $(\mu^{32}\text{-P}) - \text{ATP}$ bajo condiciones que dan lugar $E_1\sim P$ o E_2-P (108, 109). Al tratar los fragmentos con hidroxilamina o molibdato éstos pierden el fosfato (108), esto indica que en ambas $E_1\sim P$ y E_2-P el enlace es de tipo acil-fosfato, Post y Kume (110) aislaron un tripéptido, el cual llevaba el acil fosfato, después de una breve digestión con pronasa de una preparación de $\text{ATPasa}-(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ microsomal que había sido fosforilada con ^{32}P y encontraron que por sus propiedades electroforéticas, estabilidad y susceptibilidad a carboxipeptidasa β se asemejaba al tripéptido:



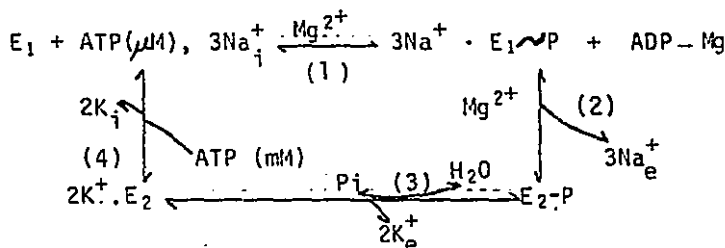
posteriormente Nishigaky y col (111) utilizaron el método de Degani y Boyer (112) basado en una reducción de la enzima fosforilada y desfosforilada con ^3H -borohidruro de sodio, seguida por hidrólisis ácida completa. Por este tratamiento un aspartil-fosfato dará lugar a homoserina y homoserina lactona, la cual puede ser convertida toda a homoserina por tratamiento con álcali. Nishigaky y col. emplearon $\text{ATPasa}-(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ purificada de glándula salina rectal de tiburón; una vez fosforilada la enzima la trataron de la forma descrita anteriormente (111) y demostraron que la fosfoenzima da lugar solamente a homoserina radioactiva, lo que indica que el acil-fosfato de la $\text{ATPasa}-(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ es un residuo aspartil β -fosfato. El residuo aminoácido fosforilado tiene una serina o treonina del lado correspondiente al amino terminal y un residuo lisina del lado del carboxilo terminal (110).

Aunque $E_1\sim P$ y E_2-P tienen diferentes características ($E_1\sim P$ es sensible a ADP y no a K^+ , y E_2-P es sensible a K^+ pero no a ADP) el tratamiento con enzimas proteolíticas de las dos formas fosforiladas produce péptidos ^{32}P -con un comportamiento electroforético similar (108, 109), lo que sugiere que la diferencia es debido a configuración.

Sintetizando, las cuatro conformaciones presentan diferente afinidad por -

Na^+ , K^+ y ATP, la forma E_1 tiene afinidad por Na^+ y ATP y la E_2 por K^+ , $\text{E}_1\sim\text{P}$ es sensible a ADP y no a K^+ , mientras que $\text{E}_2\sim\text{P}$ es sensible a K^+ y no a ADP.

Para explicar la forma como se lleva a cabo el transporte de Na^+ al exterior de la célula y de K^+ al interior de la célula por la $\text{ATPasa}-(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ el esquema de reacciones más simple propuesto por Post y Kume (110) es el siguiente: y tiene en cuenta las cuatro conformaciones demostradas de la ATPasa.



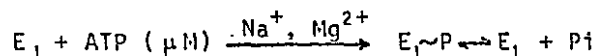
En resumen las cuatro etapas de reacción son:

- 1) El ATP a concentraciones μM en presencia de Mg^{2+} y Na^+ se une a la enzima al sitio de alta afinidad (K_0 del ATP 0.1 -3.0 μM) (50, 113) y la fosforila. Los sitios de unión para el ATP (K_m 0.1-3 μM y 0.1-0.5 mM) (68, 114), Mg^{2+} ($K_{0.5} = 0.5-1$ mM) (115, 116) y sitios de carga del Na^+ ($K_{0.5} = 0.2-0.4$ mM) (117), se localizan en la superficie interna de la membrana celular (118).
- 2) La enzima fosforilada $\text{E}_1\sim\text{P}$ cambia la conformación a $\text{E}_2\sim\text{P}$ y 3 Na^+ son translocados hacia el exterior de la célula, esta reacción requiere Mg^{2+} libre y se inhibe por oligomicina (97, 108) y N-etil maleimida (NEM) (119) la conformación $\text{E}_2\sim\text{P}$ tiene poca afinidad por el Na^+ ($K_0 = 31$ mM) (54, 120) y gran afinidad por el K^+ ($K_{0.5} = 0.08$ mM) (72, 83, 120).
- 3) El K^+ actuando en el lado externo de la forma $\text{E}_2\sim\text{P}$ activa la hidrólisis de $\text{E}_2\sim\text{P}$ quedando unido a la enzima en forma del complejo $\text{E}_2 \cdot 2\text{K}^+$, el Pi se libera y 2K^+ son translocados hacia el interior de la célula.
- 4) El ATP a concentraciones mM disminuye la afinidad por el K^+ ($K_{0.5} = 10$ mM) (63, 72, 121, 122) de la forma $\text{E}_2 \cdot 2\text{K}^+$, por lo tanto el ATP uniéndose al sitio de baja afinidad facilita simultáneamente la descarga del K^+ en el interior de la célula y el cambio de conformación de E_2 a E_1 ; al saturarse el

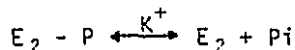
sitio de baja afinidad aumenta la actividad de ATPasa-(Na⁺, K⁺) (68) debido a que probablemente la velocidad limitante del ciclo sea la transformación de E₂ ↔ E₁. Parece ser que el ATP unido al sitio de baja afinidad tiene un papel regulador en la ATPasa-(Na⁺, K⁺) (62, 68).

La actividad de fosfatasa estimulada por K⁺ de la ATPasa-(Na⁺, K⁺) aparentemente representa el paso en el cual el K⁺ estimula la defosforilación de la forma E₂ - P (123) o etapa 3 del esquema.

Por lo tanto el ciclo total de la ATPasa-(Na⁺, K⁺), puede dividirse en dos medios ciclos, uno que comprende la actividad de ATPasa-Na⁺,



y el otro que corresponde a la reacción de fosfatasa -K⁺



Como vemos el ATP juega un papel bifuncional en el transporte activo de Na⁺ y K⁺ por la ATPasa -(Na⁺, K⁺) (50): 1) En la presencia de Na⁺, el ATP se une con afinidad elevada (K_D = 0.1 - 3 μM) (50, 113) a un sitio catalítico involucrado en la fosforilación de la enzima y en el transporte de Na⁺ hacia el exterior celular (57, 68); 2) el ATP activa el cambio de conformación E₂ ↔ E₁ con baja afinidad (K_m = 0.1 - 0.5 mM) (62, 68) en un sitio regulador en la presencia de Na⁺ más K⁺. Se piensa que el ATP en el sitio de baja afinidad promueve la liberación intracelular del K⁺ que se unió en el exterior (57, 58, 63, 106, 122).

La cinética de activación de la ATPasa -(Na⁺, K⁺) por el ATP es compleja, cuando se mide velocidad de hidrólisis de ATP en presencia de Na⁺ y K⁺ y se grafican los valores obtenidos en forma de doble recíproca en función de la concentración de ATP resulta una pendiente bifásica (57, 68, 100, 114, 124) extrapolando se obtienen dos valores de K_m aparente y dos valores de V_{máx} aparente. Los valores de K_m de alta y baja afinidad caen en los rangos de 0.1-80 μM y - 0.1 a 2 mM dependiendo de la fuente de obtención de la enzima, la temperatura del ensayo y la concentración de Na⁺, K⁺ y Mg²⁺ (57, 68, 100, 114, 124). Este comportamiento se ha interpretado postulando la existencia de dos sitios de -- unión para el ATP independientes o como interacciones cooperativas negativas - entre dos sitios idénticos en subunidades separadas de un complejo enzimático funcional dímérico (68, 100, 125).

Existe controversia en cuanto a si son realmente dos sitios para el ATP o es uno solo el que se está transformando en sitio de alta a baja afinidad durante el ciclo reaccional de la enzima, ya que Moczydlousky y Fortes (126, 127) empleando un derivado fluorescente del ATP (TNP-ATP 2', 3', -O-(2, 4, 6-Trinitrociclohexadienilidina) adenosin 5' -Trifosfato) hicieron estudios cinéticos de unión y de inhibición de la ATPasa (Na^+ , K^+) y obtuvieron resultados que sugieren que es un solo sitio el que sufre cambios en afinidad por el ATP durante el ciclo reaccional de la enzima.

Es de gran interés encontrar datos que conduzcan a la comprensión del complejo mecanismo de activación de la ATPasa (Na^+ , K^+) por el ATP.

O B J E T I V O S

El objetivo de este trabajo es aportar datos que ayuden a aclarar la controversia que existe en relación al sitio o sitios para el ATP en la ATPasa-(Na⁺, K⁺).

Se hicieron estudios cinéticos sobre la reacción de fosfatasa dependiente de K⁺ midiendo el efecto activador que tiene sobre ella el ATP a concentraciones μ M en presencia de Na⁺ mM, con el propósito de dar respuesta a las siguientes preguntas:

- 1). ¿Cuáles son las características cinéticas del efecto activador del ATP en presencia de Na⁺ sobre la reacción de fosfatasa dependiente de K⁺?
- 2). Durante este efecto activador del ATP sobre la reacción de fosfatasa, ¿se hidrolizan simultáneamente el ATP y el sustrato para la fosfatasa (pNFP)?
- 3). ¿Cuál es la relación de hidrólisis pNFP/ATP?

Hipótesis de trabajo:

Si en la ATPasa-(Na⁺, K⁺) existe un solo sitio para el ATP, cuando están presentes el sustrato para la fosfatasa el pNFP y el ATP solo debe haber hidrólisis de ATP, sobre todo cuando el ATP está a concentración saturante y el pNFP no está saturante, mientras que si existen dos sitios se espera que ambos se hidrolicen con una relación pNFP/ATP = 1, por cada ATP que se hidrolice en el sitio de alta afinidad se hidrolizará una molécula de pNFP en el sitio de baja afinidad para el ATP.

M A T E R I A L

El p-Nitrofenilfosfato como sal de dicitclohexilamonio (pNFP-dic), ATP-Ba₂ y Trietanolamina se obtuvieron de Sigma. El ATP-Tris se preparó a partir de la sal dibárica — por tratamiento con ácido sulfúrico y eliminación del Ba²⁺ residual en una columna — Dowex AG 50W-X8 en forma ácida. El ($\gamma^{32}\text{P}$) —ATP se preparó por el método de de Meis- (128). El resto de las sustancias empleadas fueron de calidad analítica. La concentración del ATP marcado y no marcado se midió espectrofotométricamente $\epsilon_{\text{M}}(260) = 1.54 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

M E T O D O S

Purificación de ATPasa-(Na⁺, K⁺) de riñón de perro.

La purificación de la enzima se hizo siguiendo el método de Jørgensen (13) y se obtuvieron preparaciones con una actividad específica promedio de 10 $\mu\text{moles Pi/min/mg}$ — proteína y más del 95% de la actividad fue inhibible por Ouabaína.

Actividad de ATPasa dependiente de Na⁺, K⁺.

La hidrólisis de ATP dependiente de Na⁺ y K⁺ de las preparaciones enzimáticas se determinó en las siguientes condiciones estándar: NaCl 100 mM, KCl 10 mM MgCl₂, 5 mM, TEA-HCl 50 mM pH 7.4, EGTA 0.2 mM (para quelar el Ca²⁺ contaminante) ATP-Tris 2 mM, en un volumen final de 1.0 ml. La concentración de la proteína varió de 2 a 4 $\mu\text{g/ml}$ dependiendo de cada preparación enzimática. La enzima se preincubó durante 5 minutos a 37°C con el medio de reacción en ausencia de ATP y la reacción se llevó a cabo a la temperatura anteriormente mencionada iniciándose con la adición de ATP-Tris. El tiempo de reacción fue de 10 minutos, durante este tiempo la hidrólisis de ATP fue lineal con respecto al tiempo (aproximadamente un 10 a 20% de ATP hidrolizado). La reacción se detuvo añadiendo un volumen igual de ácido tricloroacético (TCA) frío al 10%, centrifugando a 3000 RPM por 5 minutos en centrífuga clínica. El ATP hidrolizado se midió en una alícuota del sobrenadante determinando el Pi por el método de — Taussky y Shorr (129). La actividad inhibible por Ouabaína 50 μM corresponde a la — ATPasa dependiente de Na⁺ y de K⁺.

Se hicieron blancos en ausencia de enzima en condiciones similares, para medir la hidrólisis de ATP al tiempo cero y a los 10 minutos, para el tiempo cero el TCA se — agregó antes que el ATP-Tris. La hidrólisis en estas condiciones se restó a la hidrólisis de ATP en presencia de enzima.

Actividad de Fosfatasa Dependiente de K^+

Las condiciones estándar para la determinación de hidrólisis de pNFP fueron: KCl 20 mM, $MgCl_2$ 10 mM, TEA-HCl 50 mM pH 7.4, pNFP 10 mM, la concentración de proteína varió de 2 a 6 $\mu g/ml$ dependiendo de la preparación enzimática, volumen final 1.0 ml, temperatura de reacción 37°C.

El medio se preincubó durante 5 minutos con la enzima y la reacción se inició por la adición del pNFP. La reacción se siguió midiendo la liberación de p -nitrofenolato (pNF^-) espectrofotométricamente a 410 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo 25. $E_{M(410\text{ nm})} = 1.186 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ del pNF^- se calculó en las mismas condiciones.

Efecto del K^+ sobre la actividad de fosfatasa de la ATPasa-(Na^+ , K^+) en ausencia y en presencia de Na^+ 30 mM.

Este efecto se midió empleando el medio de reacción estándar variando la concentración de KCl entre 0 y 150 mM en ausencia y presencia de NaCl 30 mM. La concentración de proteína fue de 2.8 $\mu g/ml$. La fuerza iónica total se ajustó a un valor constante de 250 mM con Cloruro de Colina. La reacción se llevó a cabo como se describe precedentemente, a un pH de 7.4 y temperatura de 37°C.

Efecto del ATP (μM) en presencia de Na^+ sobre la fosfatasa de K^+ .

Para estudiar las características del efecto activador del ATP a concentraciones μM y Na^+ a concentraciones 20 y 100 mM en presencia de K^+ bajo, las condiciones de reacción fueron: KCl 0.5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, TEA-HCl 50 mM pH 7.4, $NaCl$ 20 ó 100 mM, pNFP 1, 4, 6 y 10 mM, ATP-Tris 0.1 a 100 μM . La concentración de proteína cuando se trabajó con NaCl 20 mM fue 1.06 $\mu g/ml$ y con NaCl 100 mM 3.7 $\mu g/ml$, la temperatura fue de 37°C. La hidrólisis de pNFP se siguió en el espectrofotómetro por la aparición de pNF^- a 410 nm durante 5 minutos en ausencia de ATP, inmediatamente después se añadió el ATP y se continuó el registro en iguales condiciones.

La velocidad de fosfatasa estimulada por ATP se calculó por diferencia entre las velocidades de hidrólisis de pNFP en presencia y en ausencia de ATP.

Efecto del AMP-PNP sobre la actividad de la fosfatasa de K^+ en presencia de Na^+ 20 mM.

Las condiciones de reacción fueron las señaladas para la activación de la fosfatasa de K^+ por ATP μM empleando en su lugar AMP-PNP 20 μM , la concentración

de Na^+ fue de 20 mM y la de pNFP de 10 mM.

Efecto del ATP (mM) en presencia de Na^+ 20 mM sobre la fosfatasa de K^+ .

La velocidad de reacción se midió en las condiciones siguientes: KCL 0.5 mM, NaCl 20 mM, MgCl_2 10 mM, TEA-HCl 50 mM pH 7.4, pNFP 1, 4, 7 y 10 mM, ATP variable de 10 μM a 10 mM, proteína 2.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en un volumen final de 500 μl . La temperatura de reacción fue de 37°C. La reacción se inició por la adición de la enzima al medio de reacción que contenía pNFP y ATP. Los tiempos de reacción fueron para: pNFP 1 mM 60 minutos, pNFP 4 mM 50 minutos, pNFP 7 mM 40 minutos y pNFP 10 mM 30 minutos. La reacción se detuvo con un volumen igual de TCA al 10% frío, enseguida se adicionó 1.0 ml de Tris 1.0 M para alcalinizar el medio y tener el pNFP en su forma coloreada. Con p-nitrofenol puro y en las mismas condiciones se hizo una curva patrón variando las concentraciones de 0 a 100 nmoles de pNFP/ml y se midió la D.O. a 410 nm.

Relación de hidrólisis de pNFP/ATP.

La relación de hidrólisis de pNFP/ATP se estudió durante el período de activación de la fosfatasa por el ATP. El medio de reacción contenía KCl 0.5 mM, MgCl_2 10 mM, TEA-HCl 50 mM pH 7.4, pNFP concentraciones de 2 a 10 mM, NaCl 20 a 100 mM, enzima 0.95 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ^{32}P -ATP 20 μM , volumen total 2.0 ml, temperatura 37°C. La actividad específica del (γ - ^{32}P)-ATP fue de 2.5×10^7 cpm/1 μmol . Se midió simultáneamente la hidrólisis de pNFP y ^{32}P -ATP de la siguiente forma: En la cubeta del espectrofotómetro se puso el medio de reacción con el pNFP, esta mezcla de preincubó a 37°C durante 5 minutos, la reacción de fosfatasa se inició añadiendo la enzima, esta reacción se registró por un tiempo de 5 minutos, se adicionó al ^{32}P -ATP, se mezcló y se tomó a los 15 segundos una alícuota de 500 μl que se añadió a un volumen igual de TCA al 10% frío, la reacción de fosfatasa activada por ^{32}P -ATP se registró durante 3 minutos, durante este tiempo la reacción fue lineal y a los 3 minutos 15 segundos se tomó una segunda alícuota de 500 μl que se añadió a 500 μl de TCA al 10% frío. La hidrólisis de ATP se midió extrayendo el $^{32}\text{P}_i$ liberado al medio de reacción por el método descrito por de Meis (128), y se determinó la radioactividad del extracto en un contador de centelleo líquido. En cada ensayo se cuantificó la radioactividad total para calcular la cantidad de ATP hidrolizado. La hidrólisis del pNFP se calculó del registro espectrofotométrico a 410 nm como se describió anteriormente.

Efecto del Na^+ sobre la relación de hidrólisis de pNFP/ATP.

Este efecto se midió en las condiciones descritas para el estudio de la relación de hidrólisis pNFP/ATP empleando una concentración de pNFP de 6 mM, variando las concentraciones de NaCl de 0 a 120 mM como se indica en las figuras 5A, 5B y 6A. La fuerza iónica se mantuvo constante con Cloruro de Colina, $\text{P}/2 = 120 \text{ mM}$.

Actividad de fosfatasa dependiente de Na^+ . Efecto de ATP μM .

Se estudió la actividad de fosfatasa de Na^+ y la activación por ATP a concentración $20 \mu\text{M}$, empleando el siguiente medio de reacción: MgCl_2 10 mM, TEA-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 0-170 mM, pNFPdic 5 mM, la concentración de enzima fue de 10-20 μg de proteína/ml, la fuerza iónica se mantuvo constante con cloruro de Colina, $\text{P}/2 = 170 \text{ mM}$, la temperatura de reacción 37°C ; la hidrólisis de pNFP se midió en ausencia y en presencia de ATP $20 \mu\text{M}$.

Las características cinéticas del efecto del ATP a concentraciones μM sobre la fosfatasa de Na^+ se hizo a dos concentraciones de Na^+ 4 y 100 mM, la concentración de pNFP fue de 5 mM y las de ATP se indican en la figura 8A. La constante cinética para el pNFP a concentración baja de Na^+ (4 mM) se obtuvo variando las concentraciones de pNFPdic de 0.75 a 4 mM (Fig 10A) en presencia y ausencia de ATP $10 \mu\text{M}$, el medio de reacción fue el empleado para los dos estudios anteriores.

La hidrólisis de pNFPdic en ausencia y en presencia de ATP μM para todas las determinaciones de actividad de fosfatasa de Na^+ se midió de la misma forma que para la activación de fosfatasa de K^+ por ATP μM en presencia de Na^+ .

Efectos de Oligomicina sobre las actividades de fosfatasa de la ATPasa-(Na^+ , K^+).

Se midió el efecto de la oligomicina a una concentración final de 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sobre las reacciones de fosfatasa de K^+ , fosfatasa de Na^+ y K^+ , y su activación por ATP $20 \mu\text{M}$ a concentraciones de Na^+ 20 y 100 mM y fosfatasa de Na^+ empleando Na^+ 20 mM.

Las condiciones de reacción fueron las mismas que se emplearon para el estudio de la actividad de cada una de las fosfatasas mencionadas. Se trabajó a una sola concentración de pNFP, la cual fue de 6 mM, la oligomicina utilizada :

se disolvió en etanol y se ajustó a una concentración de 5 mg/ml, la concentración de proteína por cada reacción fue de 4.3 $\mu\text{g/ml}$.

La enzima se preincubó en el medio de reacción con la oligomicina por 1 minuto cuando había Na^+ en el medio y 5 minutos cuando no había, para equilibrar la forma enzimática E-Oligo, la reacción se inició por la adición de pNFP y se registró la hidrólisis; en los casos de fosfatasa de Na^+ y K^+ y fosfatasa de Na^+ activadas por ATP, el ATP se adicionó enseguida, registrandose la hidrólisis del pNFP en estas condiciones. Cada una de las reacciones se realizó en presencia y en ausencia de oligomicina, en ausencia del inhibidor se empleó un volumen igual de etanol 5 μl , el volumen empleado de etanol no tuvo ningún efecto sobre las reacciones estudiadas. Las actividades enzimáticas obtenidas en ausencia de oligomicina se tomaron como 100% de actividad y se compararon con las obtenidas en su presencia para definir el efecto de la oligomicina.

Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

La electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS se hizo por el método de Weber y Osborn (130). Los geles se prepararon en tubos de vidrio de 10 cm de largo con un diámetro interno de 6 mm y contenían 7.5% de acrilamida-0.2% de bisacrilamida. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie Brillante. Los pesos moleculares de las cadenas polipeptídicas se determinaron incluyendo estándares de peso molecular conocido: Seroalbúmina 68 kdal, Ovoalbúmina 45 kdal, Deshidrogenasa Láctica 36 kdal, Lactoglobulina 18.4 kdal y Mioglobina -- 17.2 kdal.

Cuantificación de proteínas.

Las cuantificaciones de proteínas se hicieron siguiendo el método de Lowry -- (131) y Nakamura et al (132).

En los experimentos descritos en este trabajo la concentración de MgCl_2 fue suficiente, de tal forma que la concentración del -- complejo ATP-Mg fue esencialmente equivalente a la concentración total de ATP. Los valores de las constantes de disociación para -- ATP-Mg = $1.36 \times 10^{-5}\text{M}$ y para pNFP-Mg = $5.9 \times 10^{-3}\text{M}$ (67).

R E S U L T A D O S

I. Electroforesis en Geles de Poliacrilamida-SDS.

En la fig. 1 se muestra la imagen electroforética de una de las preparaciones de ATPasa-(Na^+ , K^+) de médula externa de riñón de perro, se observan dos bandas principales. En la fig. 2 se grafica el log del PM de las proteínas utilizadas como testigo frente a la movilidad electroforética y se calculó un PM de 90 kDa para la subunidad α y de 60 kDa para la subunidad β .

II. Actividad de Fosfatasa Dependiente de K^+ .

La primera parte de este trabajo se enfocó al estudio de las características de los efectos de K^+ sobre la actividad de fosfatasa de la ATPasa-(Na^+ , K^+) - purificada a partir de microsomas de médula externa de riñón de perro, con el objeto de caracterizar la segunda parte del ciclo reaccional de la ATPasa que se señaló en el esquema descrito en introducción y para posteriormente estudiar los efectos del ATP μM sobre esta actividad.

En la fig. 3A se grafican las velocidades de hidrólisis de pNFP en función de la concentración de K^+ en presencia y en ausencia de Na^+ 30 mM y se observa - que: a) el K^+ solo tiene un efecto activador hasta concentraciones de 20 mM. A concentraciones mayores se alcanza un valor constante para la activación de la hidrólisis de pNFP; b) en presencia de Na^+ 30 mM que no es saturante para el sitio del Na^+ en la ATPasa-(Na^+ , K^+), primero se observa que a concentraciones de K^+ menores de 2 mM hay activación de la fosfatasa que se debe a la presencia del Na^+ , a concentraciones de K^+ superiores a 2 mM el Na^+ tiene un efecto inhibitorio de la actividad de fosfatasa dependiente de K^+ de aproximadamente un 40%, esta inhibición debida a la presencia de Na^+ disminuye al aumentar la concentración de K^+ , cuando la concentración de K^+ alcanza 63 mM el Na^+ deja de tener el efecto inhibitorio y la velocidad de hidrólisis de pNFP es la misma que en ausencia de Na^+ . En esta gráfica 3A se observan además dos - zonas de activación por el K^+ en presencia de Na^+ , la primera a concentraciones de 0.2 a 2 mM y la segunda entre 2.5 y 50 mM.

Al representar los valores de velocidad de hidrólisis de pNFP activada por K^+ en ausencia de Na^+ en forma de doble recíproca (fig. 3C) el tipo de curva que se obtiene es cóncava hacia arriba y se convierte casi en una línea horizontal a las concentraciones más altas de K^+ , esta curvas resultan cuando existen in

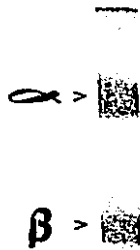


Fig 1. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% en presencia de 0.1% de SDS de enzima de riñón de perro purificada. Tinción con Azul de Coomassie.

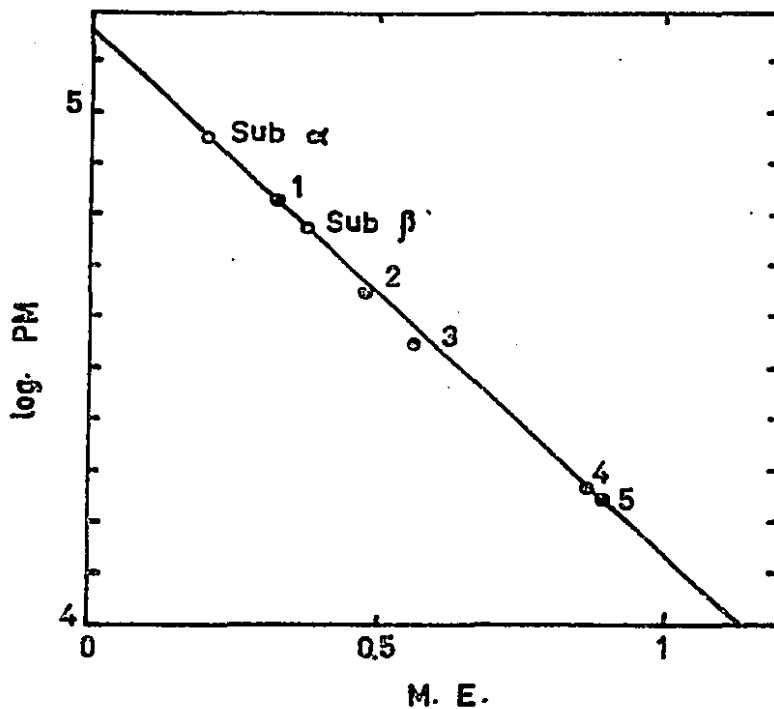


Fig 2. Determinación del PM de las subunidades de la ATPasa-(Na⁺, K⁺) de riñón de perro por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% en presencia de SDS. 1.- Seroalbúmina 68 kdal, 2.- Ovoalbúmina 45 Kdal, 3.- Deshidrogenasa Láctica 36 kdal, 4.- Lactoglobulina 18.4 kdal, 5.- Mioglobina 17.2 kdal, Sub α = Subunidad α , Sub β = Subunidad β . M.E = movilidad electroforética.

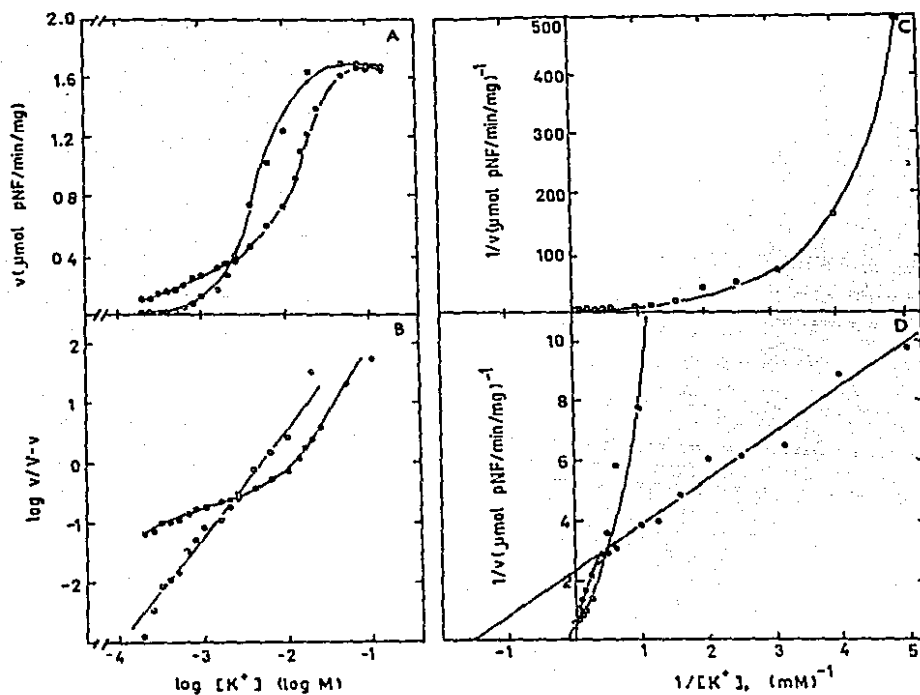


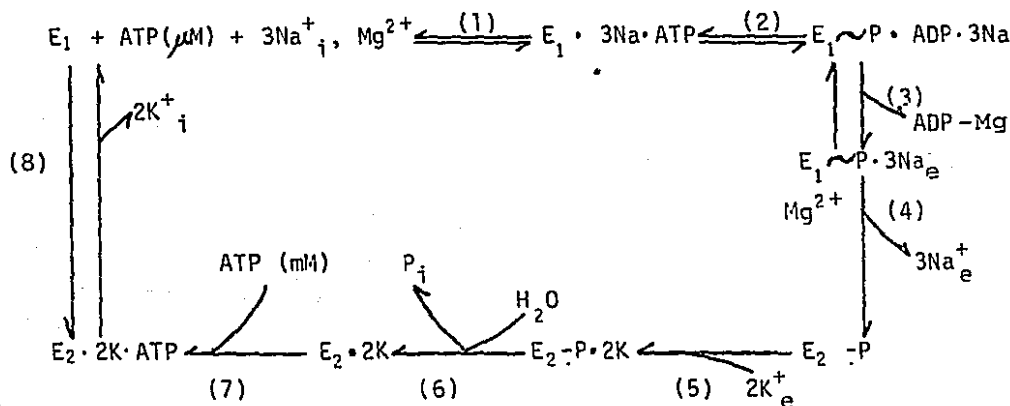
Fig 3. Efecto del K^+ sobre la actividad de fosfatasa de la ATPasa-(Na^+ , K^+). A) Representación directa de los valores de velocidad de hidrólisis de pNFP en función de la concentración de K^+ . Las condiciones se indican en metodología. (Na^+), 0 mM (O); 30 mM (●). B) Representación de Hill de los datos de velocidad obtenidos de A para el efecto estimulador del K^+ . (Na^+), 0 mM (O); 30 mM (●). C) Representación en forma de doble recíproca de los valores de velocidad obtenidos para el efecto estimulador del K^+ , en ausencia de Na^+ . D) Doble recíproca de los valores de velocidad obtenidos para el efecto activador del K^+ . Sin Na^+ (o) (concentraciones de K^+ superiores a 1 mM); en presencia de Na^+ 30 mM (●)

teraciones cooperativas fuertemente positivas (133). En la fig 3D están graficados los valores de las inversas de las velocidades obtenidas para el efecto del K^+ sobre la fosfatasa en ausencia y en presencia de Na^+ a las concentraciones de K^+ estudiadas. En ausencia de Na^+ se obtiene la curva cóncava hacia arriba (ya apreciada en 3C) con un valor de $V_{m\acute{a}x}$ de $1.692 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína. En presencia de Na^+ 30 mM se observan 2 zonas de activación para el K^+ , para la primera zona el valor $V_{m\acute{a}x}$ es de $0.4315 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína y el valor de K_m calculado es de 0.65 mM, este valor corresponde al reportado en la literatura (134) para el sitio de alta afinidad para el K^+ localizado en la parte de la enzima que se encuentra orientada hacia el exterior de la célula. Para la segunda zona activadora la $V_{m\acute{a}x}$ es de $1.67 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ proteína, el valor de $[K^+]_{0.5}$ para esta zona de activación por el K^+ se obtuvo a partir de la fig. 3B; en la fig 3B los datos de velocidad se grafican de acuerdo a la ecuación de Hill y los resultados obtenidos son: a) En la activación de la fosfatasa por el K^+ en ausencia de Na^+ existen interacciones de tipo cooperativas fuertemente positivas como indica el valor del coeficiente de Hill, $n_H = 1.78$; la $[K^+]_{0.5}$ para este efecto activador es de 4.9 mM, calculada a partir de la gráfica de Hill para valor 0 en ordenadas. b) Para el efecto del K^+ sobre la fosfatasa en presencia de Na^+ 30 mM, nuevamente se aprecia la presencia de los dos componentes para este efecto del K^+ , como ya se había observado en la fig 3D, las características de estos dos componentes son: el sitio de mayor afinidad $K_m(K^+) = 0.65 \text{ Mm}$, muestra efectos cooperativos negativos pues el coeficiente de Hill calculado es menor de 1, $n_H = 0.63$; el segundo componente de menor afinidad la $[K^+]_{0.5}$ es 12.6 mM y el n_H es igual 2.22 que indica interacciones fuertemente positivas entre estos sitios para el K^+ .

A partir de los resultados obtenidos para el efecto de K^+ en ausencia y en presencia de Na^+ se pudieron elegir las condiciones para estudiar el efecto activador del ATP a concentraciones μM en presencia de Na^+ . Se escogió una concentración de K^+ baja (0.5 mM), como se observa en la fig 3A, a esta concentración el K^+ tiene poco efecto estimulador sobre la velocidad de hidrólisis de pNFP y de esta forma se pudieran observar los efectos del ATP y del Na^+ .

III. Relación de Hidrólisis pNFP/ATP.

Uno de varios mecanismos que han sido propuestos para el esquema reaccional de la ATPasa-(Na^+ , K^+), es el planteado por Post y Albers (109, 137).



este esquema como el propuesto por Robinson (68), Glynn y Karlsh (57) y otros (50, 101, 117) propone la existencia de dos sitios con diferente afinidad para el ATP, el de alta afinidad característico de la forma enzimática E_1 es el catalítico (etapa 1), mientras que el de baja afinidad que se identifica con la conformación E_2 en la etapa (7) hasta el momento se le atribuye un papel regulador. Una de las pruebas a favor de la posible existencia de dos sitios para el ATP en la ATPasa-(Na^+ , K^+), es el efecto activador que tiene el ATP a concentraciones μM sobre la actividad de fosfatasa que posee la enzima, se ignora si este efecto activador se realiza solo por la unión del ATP a la enzima o si es necesaria la hidrólisis de éste para que se consiga el efecto, por lo tanto la segunda fase de este trabajo se orientó a investigar los siguientes puntos:

- 1) ¿Se requiere de hidrólisis del ATP en el sitio de alta afinidad para que se active la velocidad de hidrólisis de pNFP dependiente de K^+ ?
- 2) ¿Hidrolizan los dos sitios simultáneamente el sustrato?, en el caso de que así fuera,
- 3) ¿Cuál es la relación de hidrólisis de un sitio con respecto al otro?; para esto como se describió en material y métodos se midió simultáneamente la hidrólisis de pNFP (que ocupa el sitio de baja afinidad para el ATP) y de ATP $20 \mu\text{M}$ que activa la fosfatasa de K^+ y que satura el sitio de alta afinidad, en presencia de Na^+ 20 mM (no saturante) y 100 mM (saturante), así mismo se estudió

el efecto de la concentración del pNFP sobre la relación de hidrólisis pNFP/ATP, para intentar de esta forma comprender si el sitio de baja afinidad para el ATP ocupado por pNFP, influye sobre el sitio de alta afinidad ocupado por el ATP. — según el esquema anterior se esperaría que si solo existiera un sitio para el — ATP, éste lo ocuparía e impediría la hidrólisis de pNFP y viceversa, por lo tanto se esperaría que no hubiera hidrólisis de pNFP, lo que no explicaría el efecto activador del ATP sobre la fosfatasa de K^+ , pero si se tratara de dos sitios diferentes la relación esperada pNFP/ATP sería de 1 si están en relación 1:1 en la enzima, es decir durante el ciclo de reacción por cada ATP hidrolizado en el sitio de alta afinidad se hidrolizaría una molécula de pNFP en el de baja afinidad. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

Cuando se empleó un análogo del ATP no hidrolizable (AMP-PNP) para investigar — si se requiere ATP para que se active la hidrólisis del pNFP dependiente de K^+ no se observó incremento en la velocidad de hidrólisis de pNFP, lo cual indica que se necesita que la enzima se fosforile por el ATP para que se pueda llevar a cabo la activación.

En la fig. 4 se grafica la relación de hidrólisis pNFP/ATP en función de la concentración de pNFP con Na^+ 20 y 100 mM. Se observa que cuando el Na^+ está presente a una concentración de 20 mM la relación de pNFP/ATP alcanza un valor máximo constante de 4.7 a concentraciones de pNFP de 6 y 10 mM. Cuando el estudio se hace en presencia de Na^+ 100 mM, la relación de hidrólisis pNFP/ATP es — menor y alcanza un valor máximo constante de 2 a partir de concentraciones de — pNFP de 5 mM. En esta gráfica podemos apreciar que el Na^+ de alguna forma está modulando la relación de hidrólisis de pNFP/ATP y que esta relación alcanza un valor máximo cuando el sitio para el pNFP está ocupado del 70 al 80% ya que la $K_{0.5}$ para el pNFP en fosfatasa de K^+ tiene un valor de 2.7 mM.

A partir de estos resultados obtenidos se decidió hacer una titulación de los — efectos del Na^+ sobre la relación de hidrólisis pNFP/ATP durante la activación por ATP de la actividad de fosfatasa de K^+ .

En las figs 5A y 6A se grafica velocidad de hidrólisis de pNFP a concentraciones bajas de K^+ (0.5 mM), en función de la concentración de Na^+ , se observa que — el Na^+ en ausencia de ATP a concentraciones menores de 40 mM, estimula la hidrólisis de pNFP, a concentraciones mayores de 40 mM el Na^+ disminuye la velocidad de hidrólisis y llega a un valor constante a concentraciones mayores a 80 mM. La curva que se obtiene para la parte activadora del Na^+ no es Michael—

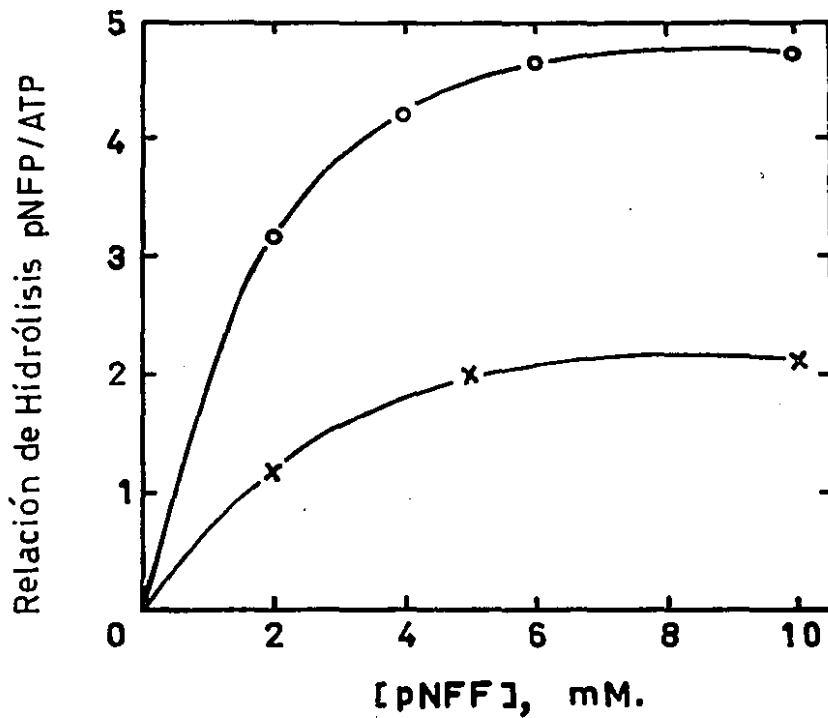


Fig 4. Relación de hidrólisis pNFP/ATP en función de la concentración de pNFP. Las condiciones de reacción se mencionan en material y métodos. Na^+ = 100 mM (X), Na^+ 20 mM (●) y las concentraciones de pNFP indicadas.

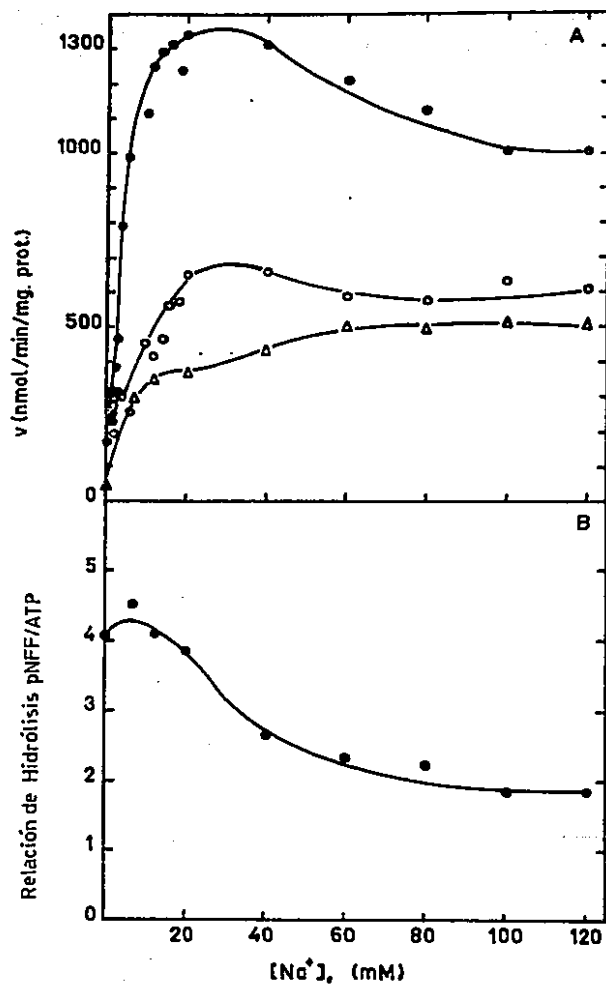


Fig 5. Efecto del Na^+ sobre la relación de hidrólisis pNFP/ATP. Las condiciones de reacción se indican en material y métodos, usando cloruro de Colina 120 a 0 mM para mantener la fuerza iónica constante y las concentraciones de Na^+ indicadas.

A) Efecto del Na^+ sobre la hidrólisis de: pNFP sin ATP (○), más ^{32}P -ATP 20 μ M (●), Hidrólisis de ^{32}P -ATP (Δ).

B) Relación de hidrólisis pNFP/ATP en función de la concentración de Na^+ . Esta gráfica se obtuvo a partir de los valores representados en la Fig 5 A.

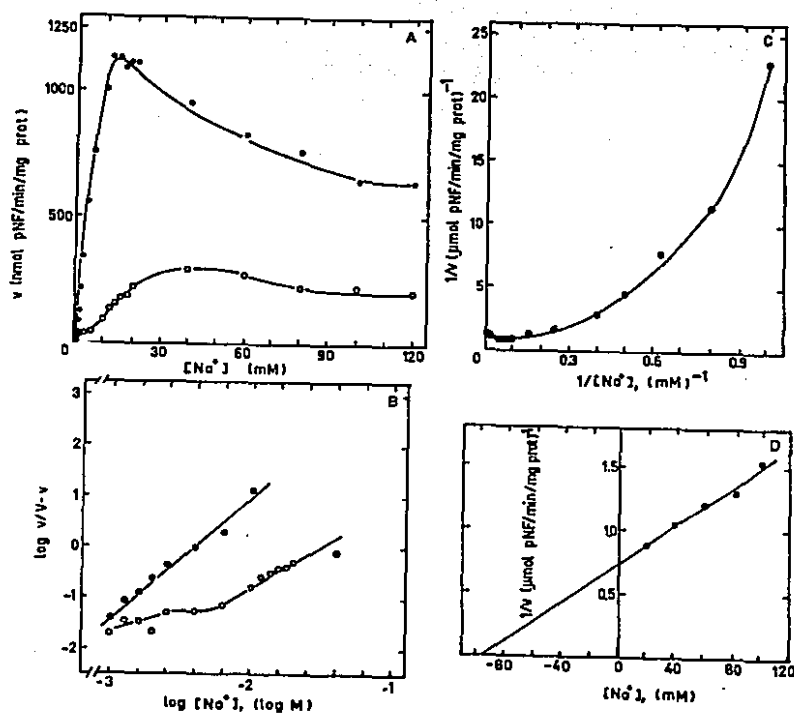


Fig 6. A) Efecto del Na^+ sobre la hidrólisis de pNFP, sin ATP (○), más ATP $20 \mu M$ (●).
 B) Representación de Hill de los valores de velocidad de hidrólisis de pNFP en función de la concentración de Na^+ en presencia de ATP de $20 \mu M$ (●), en ausencia de ATP (○). Los valores de $V_{m\acute{a}x}$ utilizados para esta gráfica se obtuvieron graficando $1/v$ vs $1/[Na^+]$ en C.
 C) Doble recíproca de los valores de velocidad obtenidos experimentalmente para la hidrólisis de pNFP activada por ATP μM en función de la concentración de Na^+ .
 D) Gráfica de Dixon de los valores de velocidad de hidrólisis de pNFP en presencia de ATP $20 \mu M$ (efecto inhibitorio) en función de la concentración de Na^+ .

liana (5A y 6A) lo que indica probablemente que durante esta activación existan efectos de tipo cooperativo entre los sitios del Na^+ . En las figs 5A y 6A también se encuentra graficada la curva de activación de hidrólisis de pNFP por el Na^+ en presencia de ATP $20 \mu\text{M}$ y se observa que por efectos del ATP la velocidad de hidrólisis de pNFP se incrementa de 2 a 3 veces en comparación con la velocidad que se obtiene cuando no está presente el ATP. La velocidad máxima de hidrólisis se alcanza con concentraciones de Na^+ de 15 a 20 mM y al aumentar la concentración de Na^+ la hidrólisis de pNFP disminuye hasta alcanzar un valor constante a concentraciones del efector de 100 y 120 mM.

Los valores de velocidad de hidrólisis se graficaron en forma de doble recíproca para calcular la $V_{\text{máx}}$ para los efectos del Na^+ sobre la fosfatasa dependiente de K^+ . En ausencia de ATP se obtuvo una curva cóncava hacia arriba y se apreciaron dos fases (fig. no presentada), de esta gráfica se calculó la $V_{\text{máx}}$ para la zona de activación por el Na^+ de menor afinidad y fue de 673.3 nmoles de pNFP/min/mg de proteína, para la zona de mayor afinidad de $V_{\text{máx}}$ observada experimentalmente fue de 43.39 nmoles pNFP/min/mg de proteína. Los datos de velocidad se sustituyeron en la ecuación de Hill y se representaron en la fig 6B, en esta figura se aprecian claramente dos componentes (círculos abiertos), la $|\text{Na}|_{0.5}$ para el componente de menor afinidad es de 29.5 mM y se calculó de la fig 6B, el n_H tiene un valor de 1.68 indicando efectos cooperativos positivos. La $|\text{Na}|_{0.5}$ para el componente de mayor afinidad también se calculó graficando los datos en la representación de Hill (fig no presentada) el valor obtenido fue de 1.6 mM y el n_H es 2.29 señalando la existencia de interacciones cooperativas positivas entre los sitios del Na^+ , estos datos confirman los efectos observados en las figs. 5A y 6A en la zona de activación por el Na^+ . En la fig 6C se representaron los valores de la inversa de la velocidad de hidrólisis de pNFP para la zona de activación por el Na^+ en presencia de ATP, la curva cóncava hacia arriba indica que en la activación de la reacción de la fosfatasa por el Na^+ en presencia de ATP hay interacciones cooperativas fuertemente positivas, la $V_{\text{máx}}$ se calculó graficando $1/v$ vs $1/|\text{Na}^+|^2$ y el valor obtenido fue de 1.137 $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína, la $|\text{Na}^+|_{0.5}$ se calculó de la fig 6 B (representación de Hill) y fue de 3.8 mM, el n_H calculado en esta figura fue de 2.35 lo que corrobora lo observado en la gráfica de dobles recíprocas, fig 6 C.

En Na^+ a concentraciones superiores a 20 mM y en presencia de ATP disminuye la velocidad de la reacción de fosfatasa de K^+ y en representación de Dixon de la fig 6D se puede calcular una $K_{i\text{ap}}$ de 96 mM.

La hidrólisis de ATP que se midió simultáneamente durante la activación de la

fosfatasa de K^+ , también se activa por el Na^+ Fig 5A, la $K_{m,ap}$ calculada para el Na^+ por doble recíproca es de 6 mM, parece ser que durante esta activación hay dos componentes uno de alta y otro de menor afinidad, la velocidad máxima de hidrólisis de ATP se alcanza con una concentración de Na^+ de 60 mM y esta velocidad permanece constante al incrementar la concentración de Na^+ .

La relación de hidrólisis de pNFP/ATP en la fosfatasa de K^+ se ve afectada por el Na^+ de la siguiente forma: cuando la concentración de Na^+ es menor a 20 mM la relación tiene un valor máximo de 4 a 4.5 o sea que la hidrólisis de una molécula de ATP en el sitio de alta afinidad activa la hidrólisis de aproximadamente 4 moléculas de pNFP posiblemente en el sitio de baja afinidad como se indicó anteriormente; el Na^+ uniéndose a un sitio con $K_{m,ap}$ 3.8 mM y en presencia de ATP 20 μ M activa fuertemente la hidrólisis de pNFP mientras que la hidrólisis de ATP tiene lugar de una forma más lenta y solo alcanza su máximo a concentraciones de Na^+ a partir de 60 mM; a concentraciones de Na^+ mayores de 20 mM empieza a haber una disminución de la activación por ATP de la velocidad de hidrólisis de pNFP, hasta llegar a un valor constante a concentraciones de Na^+ de 100 a 120 mM, debido a estos efectos del Na^+ sobre la hidrólisis tanto de pNFP como del ATP al aumentar la concentración del Na^+ la relación de hidrólisis pNFP/ATP va disminuyendo hasta llegar a un valor cercano a 2 a concentraciones de Na^+ de 60 a 120 mM fig. 5B.

Actividad de fosfatasa de Na^+ . Efecto del ATP 20 μ M.

Como ya se mencionó anteriormente la ATPasa-(Na^+ , K^+) también tiene una actividad de fosfatasa en ausencia de K^+ que es dependiente de Na^+ (fosfatasa de Na^+) (82), pero se ignora que efectos tiene el ATP a concentraciones μ M sobre esta actividad de fosfatasa de Na^+ . Este estudio se hizo con la finalidad de obtener resultados que puedan ayudar a esclarecer el mecanismo que sigue la fosfatasa de K^+ durante la activación por ATP en presencia de Na^+ a diferentes concentraciones.

Los resultados obtenidos en los estudios hechos sobre la actividad de fosfatasa de Na^+ se presentan en las Figs 7-10; en la Fig 7A se grafican las velocidades de hidrólisis de pNFP en presencia y en ausencia de ATP 20 μ M en función de la concentración de Na^+ , en ausencia de ATP la hidrólisis del pNFP no es estrictamente hiperbólica ya que a bajas concentraciones de Na^+ , menores de 10 mM, se observa una curvatura inicial que estudiada con más detalle (Fig 7B) se nota una activación que se satura alrededor de 5 mM de Na^+ . Este sitio de alta afinidad ya ha sido descrito en la actividad de ATPasa- Na^+ (135-136).

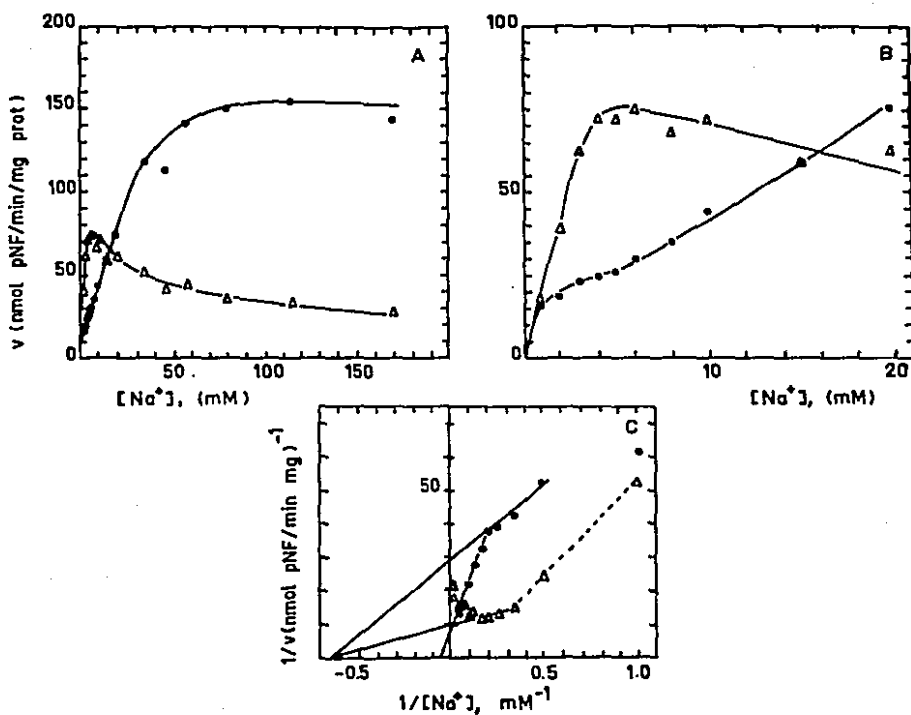


Fig 7. Actividad de Fosfatasa de Na⁺. Efecto del ATP 20 μM.
 A) Velocidad de hidrólisis de pNF en función de la concentración de Na⁺. Las condiciones y composición del medio de reacción están descritas en Métodos. ● —● Sin ATP; Δ —Δ con ATP 20 μM.
 B) Parte inicial de la curva A.
 C) Dobles recíprocas de los valores de las curvas en A.

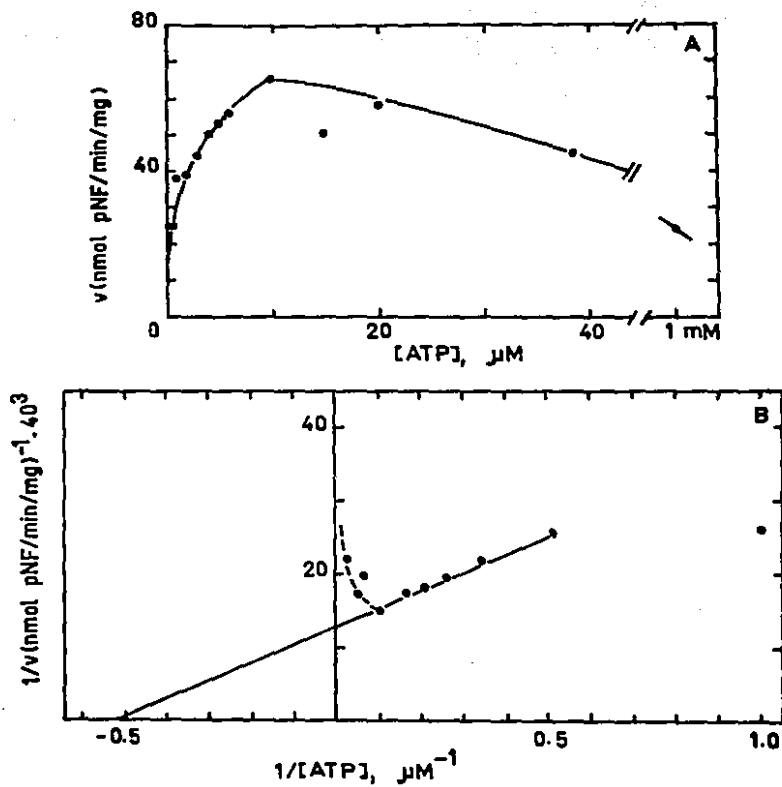


Fig 8. Fosfatasa de Na⁺. A) Velocidad de hidrólisis del pNF β en función de la concentración del ATP a baja concentración de Na⁺ (4 mM). B) Doble recíproca de los valores de velocidad representados en A.

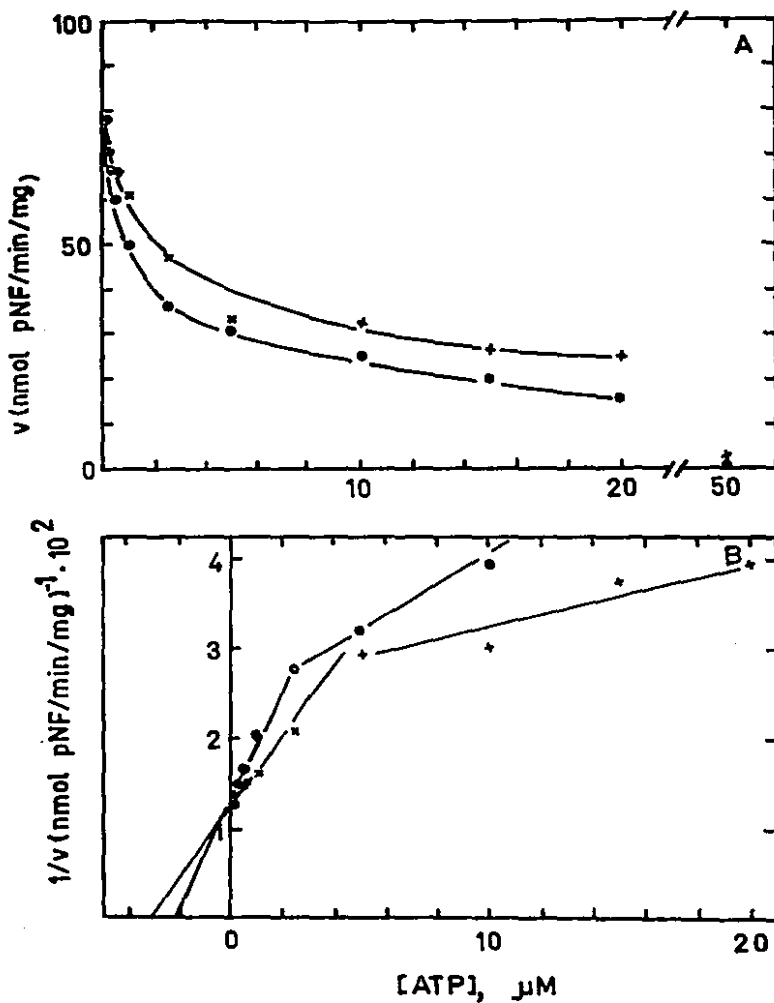


Fig 9. Efecto inhibitorio del ATP sobre la hidrólisis del pNFP con Na^+ 100 mM.

A) Velocidad de hidrólisis del pNFP en función de la concentración de ATP. \circ — \circ pNFP 5 mM, + — + pNFP 8 mM.

B) Gráfica tipo Dixon de los datos en A para calcular K_I del ATP.

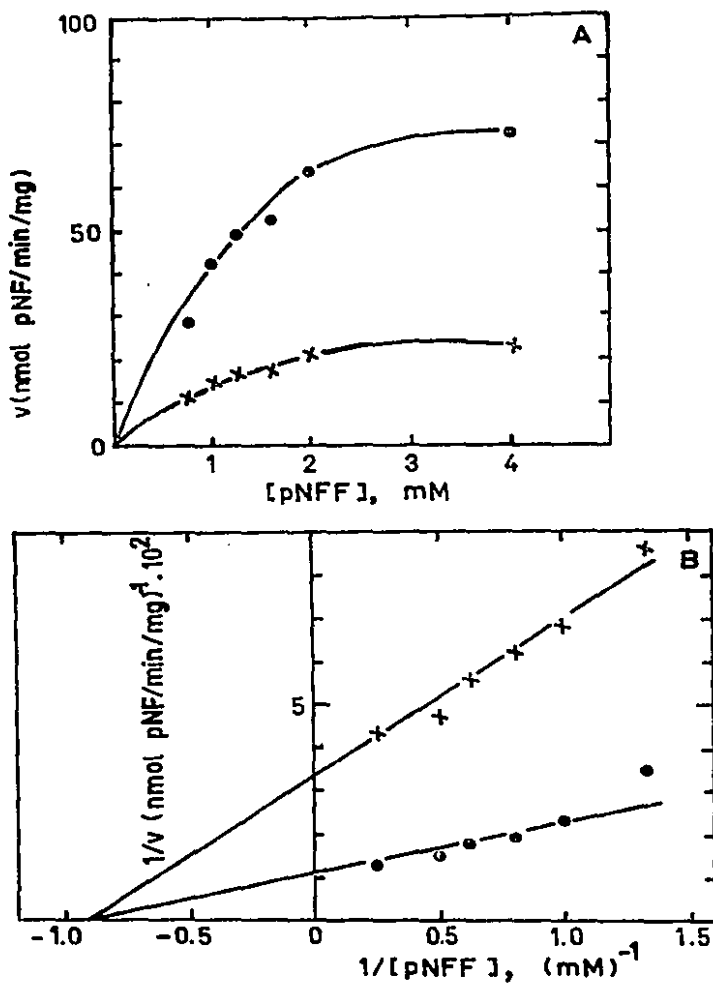


Fig 10. Determinación de K_m para el pNFP con Na^+ 4 mM.
 A) Velocidad de hidrólisis en función de la concentración de pNFP.
 + — + Sin ATP; ●—● con ATP $10 \mu\text{M}$.
 B) Dobles recíprocas de los datos graficados en A.

Al estudiar el efecto del ATP $20 \mu\text{M}$ en el sitio de alta afinidad, se observa una activación de la pNFPasa a bajas concentraciones de Na^+ (Figs 7A y 7B) hasta 5 mM , la actividad de fosfatasa activada por ATP disminuye la velocidad al aumentar la concentración de Na^+ después de 5 mM hasta ser menor que la velocidad de la fosfatasa en ausencia de ATP. A concentraciones superiores a 15 mM de Na^+ el ATP se comporta netamente como inhibidor. De la Fig 7C se calculan la $K_m(\text{Na}^+)$ para el primer y segundo sitio ocupados por el Na^+ en ausencia de ATP y se observa que es de 1.5 y 20 mM respectivamente, estos sitios ya han sido reportados anteriormente en la ATPasa de Na^+ (135, 136, 137). Aunque difícil de calcular en presencia de ATP se observa que la $K_m(\text{Na}^+)$ para el primer comportamiento es aproximadamente 1.5 mM para el Na^+ al parecer es el mismo sitio de alta afinidad que funciona en la activación de la fosfatasa de Na^+ en ausencia de ATP (Fig 7C).

El ATP activa a la fosfatasa de Na^+ a bajas concentraciones de Na^+ (4 mM) actuando en un sitio cuya $K_m(\text{Na}^+)$ es de $1.9 \mu\text{M}$ (Fig 8B) y a concentraciones altas de Na^+ 100 mM , el ATP actúa como inhibidor y la K_I obtenida a partir de la Fig 9B es de $0.5 \mu\text{M}$, por la afinidad parece ser el mismo sitio para el ATP, el sitio de alta afinidad.

El pNFP en presencia de Na^+ 4 mM se hidroliza en un sitio con una K_m del 1.1 mM Fig 10B el valor obtenido es el mismo en presencia y en ausencia de ATP $10 \mu\text{M}$.

En general las velocidades de hidrólisis de pNFP dependientes de Na^+ son inferiores a las obtenidas en presencia de K^+ bajo, pues en presencia de ATP representan solo el 7% y en su ausencia el 15% comparado con las velocidades obtenidas en condiciones de fosfatasa de K^+ en presencia de ATP $20 \mu\text{M}$ y Na^+ variable.

IV. Activación de la Fosfatasa de K^+ por ATP (μM) y Na^+ 20 mM.

Ya hemos mostrado que el ATP a concentraciones μM y en presencia de Na^+ mM tiene un efecto estimulador sobre la actividad de fosfatasa dependiente de K^+ , a concentraciones bajas de K^+ menores de 1 mM (Figs 5 y 6) y (79, 83). La tercera etapa del presente trabajo consistió en estudiar las características de este efecto activador del ATP en su sitio de alta afinidad sobre la velocidad de hidrólisis de pNFP que hasta el momento se sabe se lleva a cabo en el sitio de baja afinidad para el ATP (68).

En la Fig 11A donde se grafica la velocidad relativa de hidrólisis del pNFP en función de la concentración de ATP se observa que a concentraciones menores de 20 μM el ATP activa la hidrólisis del pNFP, las curvas de saturación presentan dos componentes, lo que posiblemente indica la existencia de efectos cooperativos y además se observa que al aumentar la concentración de pNFP las curvas se desplazan hacia la derecha, es decir se requiere de mayor concentración de ATP para llevar a cabo el efecto activador.

Al graficar los valores de velocidad de hidrólisis de pNFP obtenidos experimentalmente en función de la concentración de ATP en la representación de Hill Fig 11B, se observa que a las cuatro concentraciones de pNFP empleadas 1, 4, 6 y 10 mM, se obtienen dos pendientes, a concentraciones de ATP menores de 0.6 μM el valor de la primera pendiente es cercano a 3, lo cual explica los dos componentes obtenidos en la fig. 11A, al aumentar la concentración de ATP el valor de la pendiente es cercano a 1 (tabla I). Estos resultados parecen indicar la existencia de dos sitios de alta afinidad para el ATP, uno (sitio 1) con efectos cooperativos muy positivos y el otro (sitio 2) el cual no presenta efectos cooperativos. En la tabla I se muestran los valores de las constantes cinéticas para ambos sitios, obtenidas a partir de los datos de la Fig 11B y se aprecia que al aumentar la concentración de pNFP en el medio de reacción disminuye ligeramente la afinidad del ATP por el sitio 1, Fig 12, el n_H obtenido para este sitio es cercano a 3. La disminución de la afinidad del ATP por el sitio 2 por efectos de la concentración del pNFP es más marcada y el n_H es cercano a 1, en este experimento se observa que la afinidad por el ATP del sitio de alta afinidad se modifica por la presencia del pNFP en el sitio de baja afinidad y como además el ATP activa la hidrólisis del pNFP, parece probable que ambos sitios

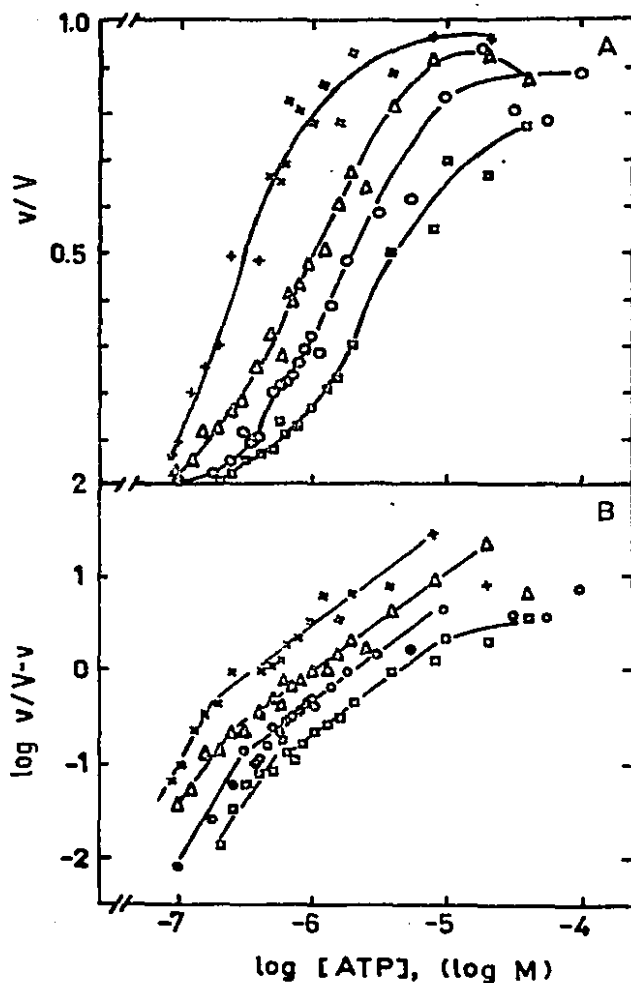


Fig 11. Efecto activador del ATP sobre la actividad de fosfatasa dependiente de K^+ en presencia de Na^+ 20 mM. Las medidas de velocidad se hicieron en las condiciones señaladas en material y métodos. pNFP 1 (X), 4 (Δ), 6 (o) y 10 mM (\square); y las concentraciones de ATP indicadas. A) Curva de Saturación. B) Gráfica de Hill de los valores de velocidad obtenidos experimentalmente. Los valores $V_{m\acute{a}x}$ se obtuvieron de las gráficas de doble recíproca.

TABLA I

CONSTANTES CINÉTICAS DE LOS SITIOS DE ALTA AFINIDAD PARA EL ATP				
pNFF (mM)	1		2	
	$A_{0.5}$	n_H	$A_{0.5}$	n_H
1	0.2 μ M	3.7	0.3 μ M	1.03
4	0.3 μ M	2.9	1.1 μ M	1.1
6	0.8 μ M	2.4	2.3 μ M	1.05
10	0.8 μ M	3.2	4.0 μ M	1.0

Los valores de $A_{0.5}$ y n_H se obtuvieron a partir de la Fig 11-B.

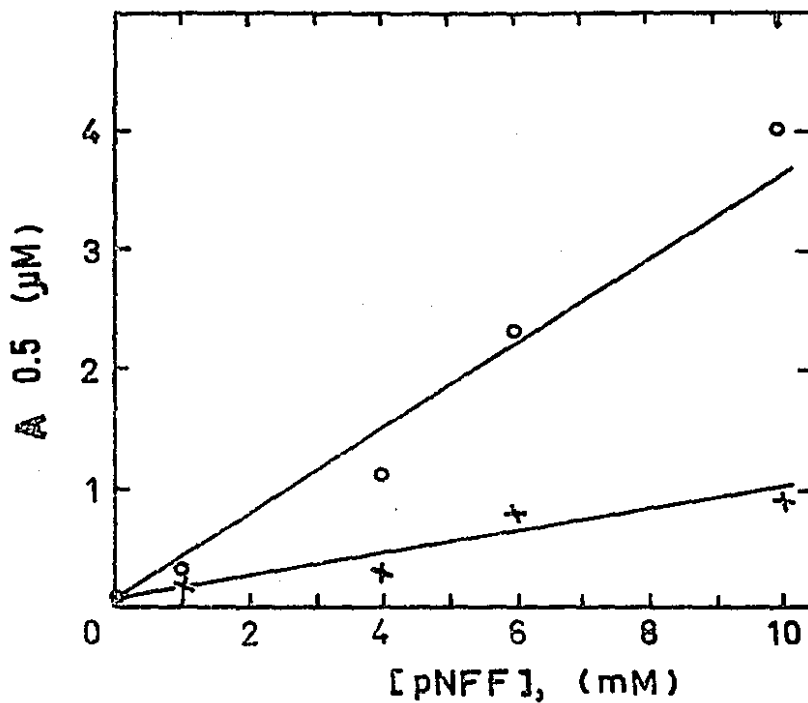


Fig 12. Variación de la $[A]_{0.5}$ del efecto activador del ATP en función de la concentración de pNFF. Los datos se obtuvieron a partir de la figura 11-B. Sitio 1 (X), Sitio 2 (o).

el de alta afinidad ocupado por ATP y el de baja afinidad ocupado por pNFP estén relacionados ya que se modifican mutuamente.

En la Fig 12 se grafican los valores de $[A]_{0.5}$ para el efecto activador del ATP obtenidos con las concentraciones de pNFP indicadas, al extrapolar el valor de $[A]_{0.5}$ para el ATP a concentración de pNFP = 0, éste coincide con el valor de $K_{0.5}$ obtenido experimentalmente para la hidrólisis de ATP en las mismas condiciones de reacción en ausencia de pNFP, este valor es de $0.1 \mu\text{M}$ corresponde con el valor reportado para el sitio de alta afinidad (67).

Como la relación de hidrólisis pNFP/ATP es dependiente de la concentración de Na^+ presente, se decidió estudiar las características del efecto activador del ATP μM en presencia de una concentración de Na^+ saturante del sitio del Na^+ en la ATPasa (Na^+ , K^+), la concentración de Na^+ fue de 100 mM, la velocidad de hidrólisis de pNFP se midió a una sola concentración de este pseudosustrato la cual fue de 6 mM, en la Fig 13, se grafican los valores de velocidad relativa en función de la concentración de ATP y se observa que el ATP activa la hidrólisis del pNFP a concentraciones menores a $60 \mu\text{M}$, el comportamiento de esta curva es no Michaeliana lo cual indica que durante la activación de la fosfatasa por el ATP hay interacciones de tipo cooperativo.

Al representar los valores de v y $V_{\text{máx}}$ de hidrólisis de pNFP obtenidos en función de la concentración de ATP, en la gráfica de Hill (Fig 13B) se obtienen 2 pendientes como en el caso que se trabajó a una concentración de Na^+ de 20 mM, el primer sitio (sitio 1) tiene un valor de $n_H = 2.7$ semejante al valor obtenido para la activación de la fosfatasa por el ATP μM en presencia de Na^+ 20 mM lo que señala probablemente la existencia de una familia de sitios con interacciones cooperativas fuertemente positivas, la otra pendiente resultado del efecto del ATP a concentraciones superiores a $1 \mu\text{M}$ tiene un valor cercano a 1 $n_H = 1.08$ (sitio 2), estos resultados pueden indicar la existencia de 2 sitios de alta afinidad para el ATP, el sitio 1 de mayor afinidad $[A]_{0.5} = 1.6 \mu\text{M}$ tiene efectos cooperativos fuertemente positivos $n_H = 3$ y el sitio 2 de menor afinidad $[A]_{0.5} = 3.6 \mu\text{M}$ con ausencia de efectos cooperativos $n_H = 1.08$. Analizando los valores de $[A]_{0.5}$ obtenidos con las dos concentraciones de Na^+ 20 y 100 mM observamos que el Na^+ a concentraciones 100 mM disminuye ligeramente la afinidad del ATP para el efecto activador sobre la pNFPasa.

Los resultados obtenidos para la activación de la fosfatasa de K^+ por ATP μM y

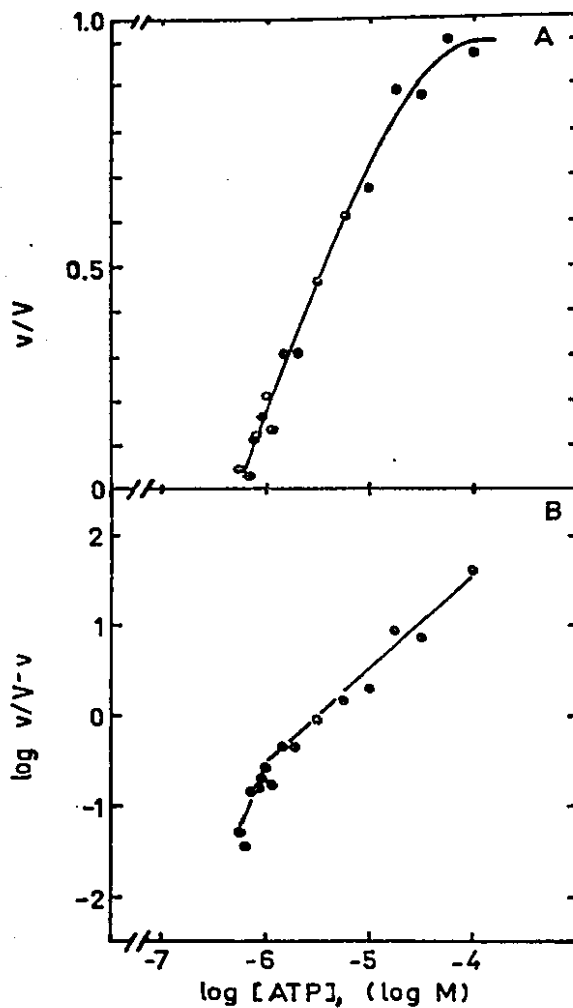


Fig 13. Efecto activador del ATP sobre la actividad de fosfatasa dependiente de K^+ en presencia de Na^+ 100 mM. Las medidas de velocidad se hicieron en las condiciones descritas en material y métodos. $\text{pNFF} = 6 \text{ mM}$ y las concentraciones de ATP indicadas. A) Curva de saturación. B) Gráfica de Hill.

Na^+ mM, indican la presencia de dos sitios para el ATP con alta afinidad, uno — con efectos cooperativos positivos y otro con ausencia de cooperatividad, los efectos cooperativos para el ATP sólo se pueden visualizar cuando se utiliza un pseudosustrato como el pNFP, otro punto que hace pensar sobre la existencia de estos dos sitios es el efecto de disminución de la afinidad del ATP por los sitios 1 y 2 de alta afinidad que ejercen concentraciones crecientes del pNFP.

Efecto inhibidor del ATP en presencia de Na^+ sobre la actividad de fosfatasa de K^+ .

A concentración de ATP mayor de $20 \mu\text{M}$ disminuye la activación de la fosfatasa — Fig 14A y a concentraciones de ATP mayores a 1 mM hay inhibición real de la actividad en ausencia de ATP de la fosfatasa, la K_I para el ATP se modifica por — efecto de la concentración del pNFP aumenta el valor de K_I para el ATP Fig 14B, es decir disminuye la afinidad, en esta figura se grafican los valores de K_I — obtenidos a las concentraciones indicadas de pNFP, cuando se extrapola para una concentración de pNFP = 0 la K_I para el ATP es de 1 mM, Fig 14B, este valor co rresponde con el valor de $K_{0.5}$ reportado para el sitio de baja afinidad para el ATP en la ATPasa—(Na^+ , K^+) (68), posiblemente esta inhibición sea de tipo compe titivo.

Efecto de la Oligomicina sobre las actividades de fosfatasa de la ATPasa—(Na^+ , K^+).

Se sabe que la oligomicina actúa bloqueando la transición de $E_1 \sim P \leftrightarrow E_2 -P$ en el ciclo de reacción de la ATPasa—(Na^+ , K^+) (67, 97). Los resultados de los estudios que se hicieron del efecto de este inhibidor sobre las reacciones de fosfa tasa de la ATPasa—(Na^+ , K^+) se encuentran resumidos en la tabla II, en la cual— vemos que la oligomicina a una concentración de $25 \mu\text{g/ml}$ actuó de la siguiente— forma: inhibió la actividad de fosfatasa de K^+ en un 21.7%, en la actividad de — fosfatasa de Na^+ en presencia de K^+ (0.5 mM) el efecto que tuvo fue estimulato— rio de 80.4% en presencia de Na^+ 20 mM y de 27.4% con Na^+ 100 mM, la activación de esta reacción por adición de ATP al medio se inhibió un 41.5% y 40.6% con Na^+ 20 y 100 mM respectivamente, a la reacción de fosfatasa de Na^+ la estimuló un 26.15% y a la activación de esta reacción por ATP la inhibió en un 31.6%.

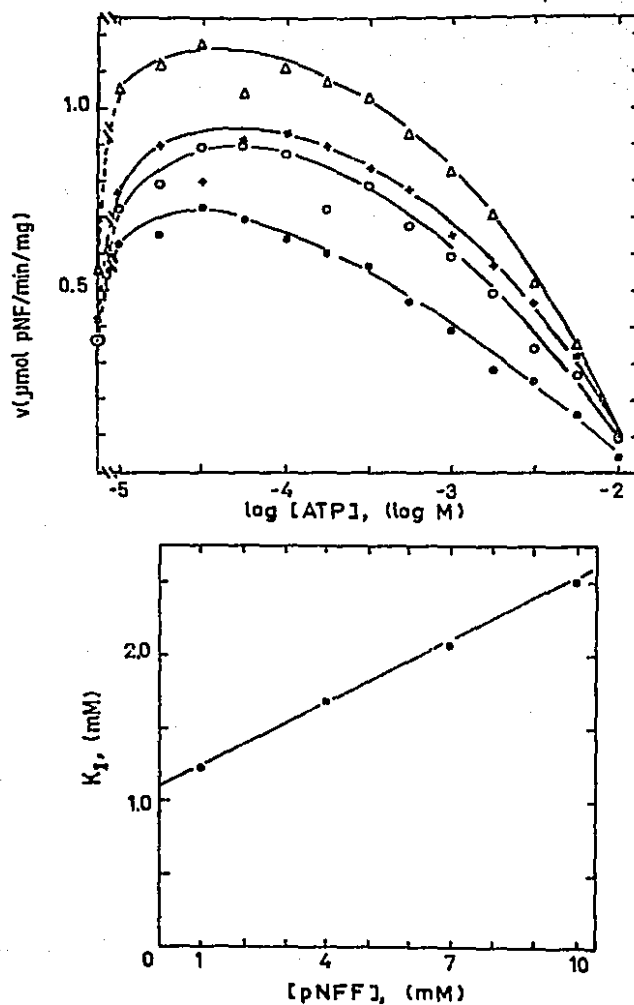


Fig 14. Efecto inhibitor del ATP sobre la actividad de fosfatasa dependiente de K^+ . pNFP 1 (\bullet), 4 (\circ), 7 (\times) y 10 mM (Δ), y las concentraciones de ATP indicadas.
 B) Efecto de la concentración de pNFP sobre la K_I para el ATP. Los datos de K_I se obtuvieron de la representación de Dixon de los valores de velocidad de hidrólisis de pNFP obtenidos experimentalmente.

TABLA II

EFECTOS DE LA OLIGOMICINA SOBRE LAS ACTIVIDADES DE FOSFATASA DE LA ATPasa-(Na ⁺ , K ⁺)*				
FOSFATASA ESTIMULADA POR: **	ACTIVIDAD (nmoles pNF/min/mg prot)		Efecto***	
	-Oligo	Oligo	I(%)	A(%)
K ⁺ (20)	2596.9	2034.4	21.67	
K ⁺ (0.5)+Na ⁺ (20)	190.12	342.99		80.41
K ⁺ (0.5)+Na ⁺ (20)+ATP(20)	964.29	564.07	41.5	
K ⁺ (0.5)+Na ⁺ (100)	203.85	259.85		27.39
K ⁺ (0.5)+Na ⁺ (100)+ATP(20)	250.87	148.96	40.6	
Na ⁺ (20)	128.96	162.68		26.15
Na ⁺ (20)+ATP+(20)	150.33	102.89	31.55	

*Las condiciones de reacción se detallan en métodos.

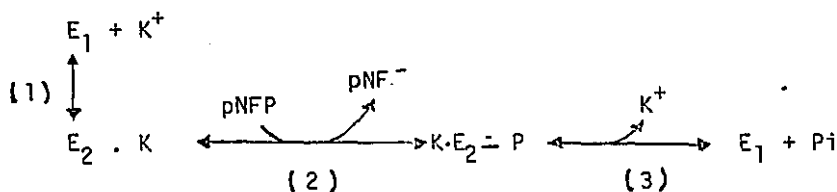
**Las concentraciones señaladas entre paréntesis son mM para Na⁺ y K⁺ y para ATP μ M.

***I = Inhibición. A = Activación.

D. I. S. C. U. S. I. O. N

La forma enzimática involucrada en la reacción de fosfatasa dependiente de K^+ que muestra la $ATPasa-(Na^+, K^+)$ es la E_2 (135), el K^+ uniéndose a sitios en la enzima localizados aparentemente en la porción citoplasmática estimula dicha actividad (136). La secuencia de reacción para esta actividad se representa en el esquema 1.

Esquema 1



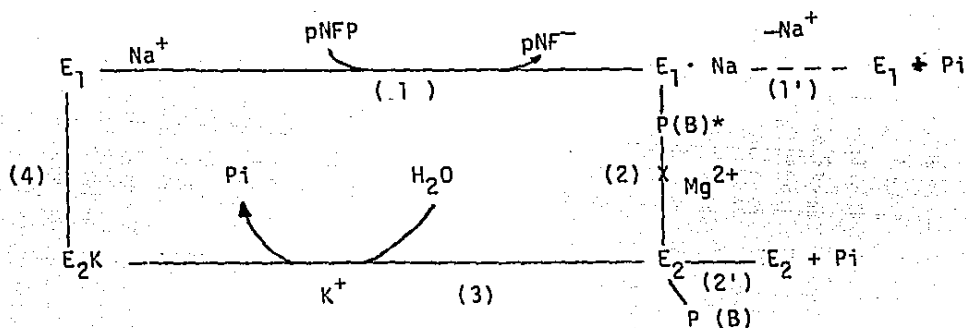
Robinson (137) ha reportado que hay incorporación de ^{32}P proveniente de ^{32}P -pNFP estimulada por K^+ en una preparación de $ATPasa(Na^+, K^+)$ de cerebro de rata, por esta razón posiblemente en el transcurso de la reacción de hidrólisis de pNFP ha ya la formación de un intermediario fosforilado que difiere de la forma enzimática fosforilada por ATP y dependiente de Na^+ en su sensibilidad a hidroxilamina y a cambios de pH (137).

En el presente trabajo se encontró que el K^+ activa la hidrólisis de pNFP uniéndose a un sitio con una $[K^+]_{0.5} = 4.9$ mM posiblemente se trate de un sitio para el K^+ localizado en el interior de la célula ya que la afinidad es cercana a la reportada en la literatura para este sitio del K^+ (intracelular) ($K_{0.5} = 10$ mM) (63). Esta actividad de fosfatasa dependiente de K^+ fue inhibida por oligomicina en un 22%.

Cuando se estudian los efectos de K^+ en presencia de Na^+ 30 mM la hidrólisis de pNFP dependiente de K^+ sigue un comportamiento cinético diferente; a concentraciones bajas de K^+ (menor a 1 mM) hay una estimulación dependiente de Na^+ , esta activación ya observada por Robinson (79) y Nagai y cols. (75) posiblemente presente la disponibilidad de una vía enzimática alterna la cual requiere Na^+ y K^+ para realizar la hidrólisis de pNFP, ya que el Na^+ solo es un activador muy débil (79) y además esta reacción de fosfatasa dependiente de Na^+ y K^+ se caracteriza porque debido a los efectos del Na^+ hay una mayor afinidad por el K^+ $K_{0.5} = 0.65$ mM. Ya anteriormente se ha propuesto que en la activación de la fosfatasa por Na^+ a K^+ bajo está involucrada una fosforilación de la enzima por —

pNFP dependiente de Na^+ para formar $\text{E}_1\text{-P}$ (esquema 2 etapa 1) y en presencia de Mg^{2+} hay una isomerización a $\text{E}_2\text{-P}$ con sitios para el K^+ con afinidad elevada y orientados extracelularmente, análogos a los presentados en la secuencia de reacción de la ATPasa-(Na^+ , K^+) (80, 138).

Esquema 2



X= Paso que bloquea la oligomicina en ATPasa-(Na^+ , K^+).

En ausencia de Na^+ , la forma enzimática E_1 se fosforila por pNFP probablemente en el sitio de baja afinidad para el ATP y pasa lentamente a $\text{E}_2\text{-P(B)}$. La forma $\text{E}_2\text{-P}$ se hidroliza activada por el K^+ presente a baja velocidad porque la concentración de K^+ es baja.

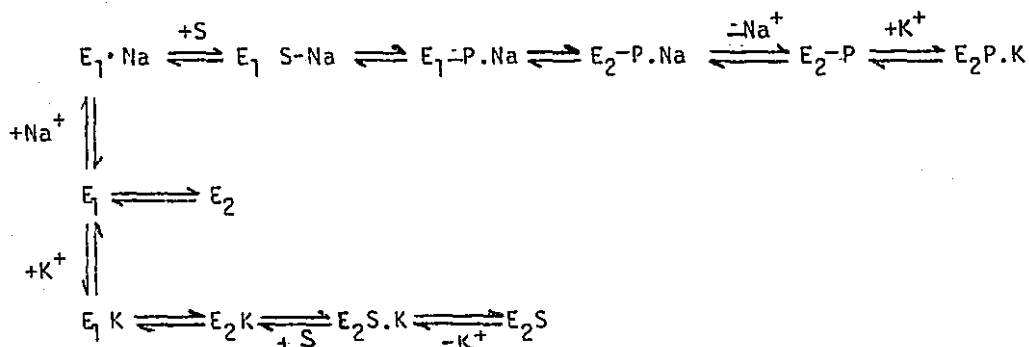
La reacción de fosfatasa activada por Na^+ a concentraciones bajas de K^+ , es estimulada por oligomicina (tabla II), a diferencia de la reacción de ATPasa-(Na^+ , K^+) la cual se inhibe por oligomicina que actúa bloqueando el paso de transición de la forma $\text{E}_1\text{-P} \leftrightarrow \text{E}_2\text{-P}$ (etapa 2 del esquema 2), lo que indica que cuando no se lleva a cabo el paso $\text{E}_1\text{-P(B)} \rightarrow \text{E}_2\text{-P(B)}$ en la reacción de la fosfatasa la hidrólisis de pNFP es más rápida (etapa 1 y 1' en el esquema 2), este efecto de la oligomicina señala también que la vía de hidrólisis del pNFP dependiente de Na^+ y K^+ es diferente a la ruta que sigue la fosfatasa dependiente de K^+ , en este caso la oligomicina es inhibidora y que el intermediario fosforilado es diferente al que se forma en el curso de la reacción de ATPasa-(Na^+ , K^+) puesto que no hubo inhibición de la reacción.

El Na^+ inhibe la actividad de fosfatasa dependiente de K^+ al existir en el medio de reacción concentraciones de K^+ mayores de 2 mM; y este efecto desaparece a concentraciones de K^+ de 63 a 150 mM. En el efecto de inhibición por el Na^+ hay un cambio en la afinidad de la enzima por el K^+ y la disminución en la velocidad

*La forma fosforilada de la enzima se designó como $\text{E}_1\text{-P(B)}$ para indicar que la fosforilación es en un sitio de baja afinidad diferente al de fosforilación por ATP.

de hidrólisis de pNFP observada por efecto del Na^+ , puede ser el resultado de la suma de dos vías hidrolíticas una dependiente de Na^+ y otra de K^+ (esquema 2, — etapas 1, 2 y 2' para Na^+ y 3 y 4 para K^+) Robinson (139,140) Presenta un modelo de reacción para la fosfatasa (esquema 3) en el cual puede existir competencia entre el Na^+ y el K^+ por la forma E_1 de la enzima, la actividad total de fosfatasa sería el resultado de la hidrólisis de pNFP por la vía de $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ y la de K^+ .

Esquema 3



Modelo para la secuencia de reacción de la actividad de fosfatasa dependiente de $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$. S = Sustrato (140).

En los estudios que se hicieron en este trabajo, con fosfatasa de Na^+ , se encontró que la hidrólisis de pNFP por esta vía es muy lenta, lo que provoca la disminución de la velocidad de hidrólisis de pNFP total observada. A concentraciones de K^+ de 63 a 150 mM, en el Na^+ no tiene efecto sobre la actividad de fosfatasa debido a que a esas concentraciones de K^+ la enzima estará en la forma $E_2\text{K}$, y la vía de hidrólisis será la de K^+ .

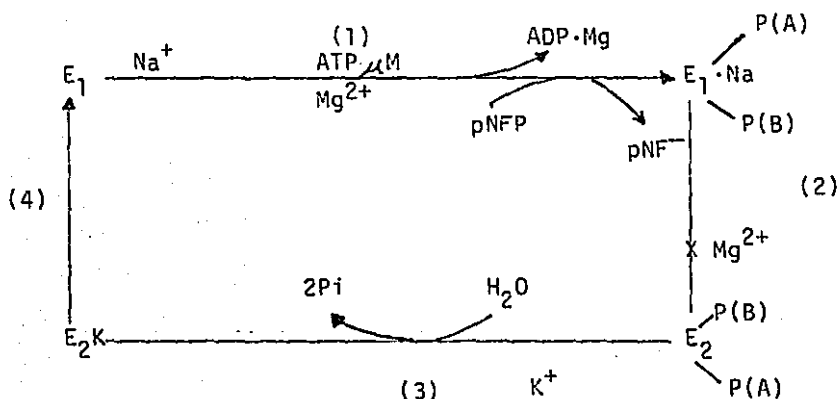
RELACION DE HIDROLISIS pNFP/ATP.

Los resultados de los experimentos mostrados en el apartado III sobre la activación de la fosfatasa- K^+ por ATP a concentraciones μM y Na^+ a concentraciones mM, señalan hallazgos importantes, como es el estado de la relación de hidrólisis de los sustratos durante dicha activación la cual hasta el momento se desconocía; así mismo se ignoraba si ambos sustratos el de la ATPasa y el de la fosfatasa se hidrolizan simultáneamente. En el presente trabajo, se encontró que tanto el ATP en el sitio de alta afinidad como el pNFP actuando en el sitio de baja afinidad para el ATP se hidrolizan durante la activación por ATP y Na^+ de la reacción de fosfatasa dependiente de K^+ y la relación de hidrólisis de pNFP/ATP es depen-

diente de la concentración de Na^+ en el medio de reacción.

Se conoce que la estimulación de la actividad de fosfatasa dependiente de K^+ por Na^+ a concentraciones bajas de K^+ (0.5 mM) es más marcada en la presencia de ATP o de otros agentes fosforilantes como son CTP y AcP(80) actuando en el sitio de mayor afinidad para el ATP y que en esta estimulación hay disminución en la $K_{0.5}$ para el K^+ (80), en este trabajo se demostró que es necesaria la fosforilación de la enzima para que se lleve a cabo la estimulación, ya que cuando se empleó en lugar del ATP el AMP-PNP no se produjo incremento en la velocidad de hidrólisis del pNFP como cuando se utiliza el ATP. Se propone un esquema de las etapas probables que sigue la enzima para hidrolizar pNFP en presencia de ATP, Na^+ y K^+ :

Esquema 4



X = Etapa que bloquea la oligomicina.

Robinson (80) ha indicado que durante la activación por ATP posiblemente se forme un intermediario doblemente fosforilado $\text{E}_1\text{-P(A)}$ y $\text{E}_2\text{-P(B)}$ durante el cambio de conformación el sitio de alta afinidad se estará transformando en sitio de baja afinidad y viceversa según lo propuesto por Cantley(100); como la activación de la fosfatasa a K^+ bajo (menor a 1 mM) la realiza el Na^+ en ausencia de ATP y esta activación puede ser porque el Na^+ esté promoviendo la fosforilación de la enzima por pNFP (80, 137). Este compuesto doblemente fosforilado cambia de conformación en presencia de Mg^+ (etapa 2) y por efectos del K^+ se lleva a cabo la hidrólisis de los dos grupos fosfato (etapa 3), el ATP acelera la etapas 1 y 2 (esquema 4) por esta razón aumenta la velocidad de hidrólisis del pNFP. Esta reacción a semejanza de la ATPasa-(Na^+ , K^+) se inhibe por Oligomicina (tabla II).

Durante la estimulación de la fosfatasa dependiente de K^+ por Na^+ y ATP la hidrólisis del pNFP en el sitio de baja afinidad para el ATP es superior a la hidrólisis del ATP en el sitio de alta afinidad, por lo cual resulta una relación de hidrólisis pNFP/ATP superior a 1. El valor de esta relación depende de la concentración de Na^+ en el medio de reacción, cuando la concentración de Na^+ es menor a 20 mM alcanza un valor máximo de 4.7 y a concentraciones de 100 mM alcanza un valor mínimo de 2. Estos cambios en la relación de hidrólisis se explican en función de la vía de hidrólisis de pNFP que predomina por efectos del Na^+ , cuando la concentración de Na^+ es menor a 20 mM la vía hidrolítica principal es la señalada en el esquema 1 (ruta dependiente de K^+), en la cual la hidrólisis de pNFP es rápida, mientras que la hidrólisis de ATP procede lentamente debido a que el sitio del Na^+ para la función de ATPasa- Na^+ no ha alcanzado la saturación, a medida que la concentración de Na^+ aumenta para la actividad de pNFP pasa la ruta que está siguiendo la enzima predominantemente es la señalada en el esquema 4 la cual es dependiente de Na^+ y K^+ y acelerada por el ATP y la hidrólisis de ATP ha alcanzado el máximo, lo señalado anteriormente explica porqué varía la relación de hidrólisis pNFP/ATP.

La hidrólisis de pNFP activada por ATP y Na^+ en presencia de concentraciones bajas de K^+ sigue principalmente la vía hidrolítica señalada en el esquema 4. La contribución por otras vías es mínima ya que cuando se hizo el estudio de la fosfatasa dependiente de Na^+ con y sin ATP se encontró que la hidrólisis de pNFP por esta vía es muy lenta comparada a la que se obtiene en presencia de K^+ bajo y además es inhibida por oligomicina respuesta semejante a la de la actividad de ATPasa-(Na^+ , K^+).

Características del efecto activador del ATP (μM) en la reacción de fosfatasa dependiente de Na^+ y K^+ .

Al estudiar el efecto activador del ATP a concentraciones saturantes del sitio de alta afinidad sobre la hidrólisis del pNFP en el sitio de baja afinidad se encuentra que para llevar a cabo esta activación el ATP produce dos efectos que en representación de Hill aparecen como dos componentes de elevada afinidad, estos dos componentes se visualizan solamente en la presencia de un pseudosustrato como el pNFP y se requiere K^+ pues cuando se estudia la activación por ATP de la fosfatasa dependiente de Na^+ aparece solamente un sitio de afinidad elevada para el ATP. El componente de mayor afinidad que se denominó sitio 1 tiene efectos cooperativos positivos, el componente 2 muestra ausencia de cooperatividad, este comportamiento no se modifica al cambiar la concentración del pNFP solamente la afinidad por el --

ATP en los dos componentes disminuye al aumentar la concentración de pNFP. Los dos componentes observados en la gráfica de Hill de la fig. 11B no se pueden explicar fácilmente con argumentos cinéticos. Este tipo de patrones de activación bifásicos se han visto en ATPasa activada por Ca^{2+} por Silva y Verjovski-Almeida (145), en ATPasa activada por Sr^{2+} con Mg^{2+} 5mM por Guimaraes-Motta et. al. (146), en pNFPasa activada por Ca^{2+} y pNFPasa activada por Sr^{2+} por Holguín --- (147), también han sido descritos como soluciones teóricas en sistemas con multi sitios, con o sin comportamiento cooperativo (133). Si los dos componentes de la fig. 11B representan dos sitios o es un sitio que cuando no está saturado presenta cooperatividad y al saturarse ya no muestra cooperatividad, es algo que requiere aclaración en el futuro.

Los valores de n_H obtenidos fueron de 3 y 1 para los efectos o componentes 1 y 2 respectivamente (tabla I), por primera vez se obtiene un valor de n_H superior a 1 para el ATP, el coeficiente de Hill de 3 obtenido a concentraciones bajas del sustrato es difícil de explicar, puede implicar la existencia de sitios reguladores los cuales deben ser ocupados antes de que el sustrato ocupe el sitio catalítico en la enzima (133), o bien puede ser que este n_H elevado esté indicando el número de sitios activados por el ATP al unirse al sitio de alta afinidad y esto explicaría la relación de $\text{pNFP}/\text{ATP} \simeq 4$.

Cuando se estudia la cinética de hidrólisis del ATP a concentraciones menores a 20 μM y en ausencia de pNFP, aparece un solo sitio para el ATP con una $A_{0.5}$ de 0.1 μM ; al parecer los sitios de alta afinidad que se muestran en presencia de pNFP pertenecen a la misma familia de sitios, pues al extrapolar en la fig. 12 -- para una concentración de pNFP= 0, el valor de los dos sitios coinciden con el valor $S_{0.5}$ obtenido experimentalmente en ausencia de pNFP.

El ATP a concentraciones mayores a 1 mM tiene un efecto inhibitor sobre la reacción de fosfatasa dependiente de K^+ en presencia de Na^+ , posiblemente compitiendo por el mismo sitio del pNFP, ya que a mayor concentración de pNFP se requiere de mayor concentración de ATP para inhibir la reacción de fosfatasa y cuando se extrapola el valor K_I para el ATP a una concentración de pNFP = 0 (fig. 14B) la K_I del ATP es de 1mM que corresponde al valor reportado para el sitio de baja afinidad para el ATP (68), la inhibición observada con ATP 10mM cuando la concentración de pNFP es de 10mM se puede deber parcialmente a que en el medio de reacción exista ATP libre y no en forma de ATP-Mg , ya que la concentración de Mg^{2+} fue -

de 10mM y el pNFP también forma complejo con éste aunque con una afinidad menor que la del ATP (K_D pNFP-Mg=5.9 mM), se conoce que el ATP libre inhibe la reacción de ATPasa-(Na^+ , K^+) compitiendo con el complejo ATP-Mg con una $K_I = 4.8\text{mM}$ (67).

Para el efecto inhibitor del ATP sobre la reacción de fosfatasa dependiente de K^+ Robinson reporta una inhibición de tipo competitivo (68).

De esta manera utilizando el ATP a concentraciones saturantes del sitio de afinidad elevada y el pseudosustrato pNFP a concentraciones que ocupan el sitio de baja afinidad se pudo lograr estudiar las características de los sitios catalíticos para el ATP en la ATPasa-(Na^+ , K^+), los resultados señalan la existencia de más de un sitio hidrolítico para el ATP los cuales no son independientes ya que la ocupación de un sitio modifica el comportamiento del otro.

CONCLUSIONES

Dentro del complejo mecanismo de reacción de la ATPasa-(Na⁺, K⁺) el ATP tiene un papel bifuncional el cual se ha explicado en la parte de introducción de este trabajo; se ha propuesto la existencia de dos sitios con diferente afinidad para el ATP, los cuales muestran interacciones anticooperativas (57, 62, 100, 141-144). Si estos sitios existen en efecto separados (uno de alta y uno de baja afinidad), o bien se trata de un sólo sitio que se está transformando (126, 127), es algo que aún no está claro. Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue aportar datos que ayuden a aclarar esta duda y las conclusiones son las siguientes:

1. Durante la activación por ATP y Na⁺ de la fosfatasa dependiente de K⁺ se requiere hidrólisis de ATP en el sitio de alta afinidad para activar la fosfatasa, lo que implica que en la vía que sigue la reacción está involucrada la fosforilación de la enzima en el sitio de alta afinidad.
2. El conocimiento de la relación de hidrólisis de pNFP/ATP es una aportación más en favor de la teoría de la existencia de dos sitios con diferente afinidad para el ATP los cuales se están alternando durante el ciclo de reacción de la enzima, puesto que la relación que resulta es siempre mayor a 1.
3. El valor de la relación pNFP/ATP que pasa de un valor cercano a 4 a 2 puede indicar la vía preferencial de hidrólisis del pNFP activada por el ATP, cuando no hay Na⁺ o la concentración del mismo es menor de 20 mM la enzima sigue la vía de hidrólisis señalada en el esquema 1 (fosfatasa dependiente de K⁺), al aumentar el Na⁺ la enzima para hidrolizar el pNFP en presencia de ATP μ M seguirá predominantemente la ruta dependiente de Na⁺ y K⁺ (esquema 4).
4. Por primera vez se encuentran un n_H superior a 1; el valor encontrado es cercano a 3, indicando posiblemente el número de sitios de baja afinidad - activados por el ATP actuando en el sitio de alta afinidad. ¿Existe o no - relación entre el n_H obtenido y la hidrólisis de cuatro moléculas de pNFP - cuando las concentraciones de Na⁺ son menores a 20 mM? esta es una pregunta que requiere mayor investigación.

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

1. Skou, J.C. The Influence of some cations on adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta* 23, 394-401 (1957).
2. Glynn, I.M. and Karlish, S.J.D. The Sodium Pump. *Annu. Rev. Physiol.* 37, 13-55 (1975).
3. Robinson, J.D. and Flashner, M.S. The $(Na^+ + K^+)$ -activated ATPase Enzymatic and transport properties. *Biochim. Biophys. Acta* 549, 145-176 (1979).
4. Schuurmans Stekhoven F. and Bonting S.L. Transport Adenosine Triphosphatases: Properties and Functions. *Physiological Reviews* 61(1), 1-28 (1981).
5. Wallick, E.T., Lane, L.K. and Schwartz, A. Biochemical Mechanism of the Sodium pump. *Ann. Rev. Physiol.* 41, 397-411. 1979.
6. Skou, J.C. The $(Na^+ + K^+)$ -ATPase: Coupling of the reaction with ATP to the reaction with Na^+ and K^+ . *Annals of the New York Academy of sciences.* 402, 169-184 (1982).
7. Anner, B.M., Lane, L.K. Schwartz, A., Pitts, B.J.R. A reconstituted $Na^+ + K^+$ pump in liposomes containing purified Na^+ , K^+ ATPase from Kidney Medulla. *Biochim Biophys. Acta* 467, 340-345 (1977).
8. Goldin, S.M. Active transport of sodium and potassium ions by the sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase from renal medulla. *J. Biol. Chem.* 252, 5630-42 (1977).
9. Hilden, S., Hokin, L. Coupled $Na^+ - K^+$ transport in vesicles containing a purified Na^+ , K^+ -ATPase and only phosphatidylcholine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 69, 521-27. (1976).
10. Sen, A.K. and Post, R.L. Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 239, 345-352 (1964).
11. Whittam, R. and Chipperfield, A.R. The reaction mechanism of the sodium pump. *Biochim. Biophys. Acta.* 415, 149-171. (1975).
12. Bonting, S.L., Caravaggio, L.L. and Hawkins, N.M. Studies on sodium-potassium activated adenosine triphosphatase. IV. Correlation with cation transport sensitive to cardiac glycosides. *Arch. Biochem. Biophys.* 98, 413-419 (1962).
13. Jørgensen, P.L. Purification and characterization of $(Na^+ + K^+)$ -ATPase. III.

- Purification from outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by sodium dodecyl sulphate. *Biochim. Biophys. Acta.* 356, 36-52. (1974).
14. Dixon, J.F., and Hokin, L.E. Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. Purification and properties of the enzyme from the electric organ of *Electrophorus electricus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 163, 749-758 (1974).
 15. Hokin, L. E., Dahl, J.L., Deupree, J.D., Dixon, J.F. Hackney, J.F. and Perdue, J.F. Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. X. Purification of the enzyme from the rectal gland of *Squalus acanthias*. *J. Biol. Chem.* 248, 2593-2605 (1973).
 16. Uesugi, S., Dulak, M., Dixon, J., Hexum, T.D., Dahl, J.L., Perdue, J.F. and Hokin, L.E. Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. VI. Large scale partial purification and properties of a lubrol-solubilized bovine brain enzyme. *J. Biol. Chem.* 246, 531-543 (1973).
 17. Akera, T., Larsen, F.S. and Brody, T.M. The effect of ouabain on sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase from the hearts of several mammalian species. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 170, 17-26 (1969).
 18. Matsui, H. And Schwartz, A. Purification and properties of a highly active ouabain-sensitive Na^+ , K^+ -dependent adenosine triphosphatase from cardiac tissue. *Biochim. Biophys. Acta.* 128, 380-390 (1966).
 19. Kyte, J. Purification of the sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase from canine renal medulla. *J. Biol. chem.* 246, 4157-4165 (1971).
 20. Lane, L.K., Copenhaver, Jr. J.H., Lindenmayer, G.E. and Schwartz, A. Purification and characterization of [^3H]-ouabain binding to the transport adenosine triphosphatase from outer medulla of canine kidney. *J. Biol. Chem.* 248, 7197-7200 (1973).
 21. Lee, H.C., Breitbart, H., Berman, M. and Forte, J.G. Potassium-stimulated ATPase activity and hydrogen transport in gastric microsomal vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 553, 107-131 (1979).
 22. Forbush, B. III., Kaplan, J.H., Hoffman, J.F. Characterization of a new photoaffinity derivative of Ouabain: Labeling of the large polypeptide and of a Proteolipid Component of the Na^+ , K^+ -ATPase. *Biochemistry* 17, 3667-3676 (1978).

23. Rucho, A. and Kyte, J. Photoaffinity Labeling of the ouabain-binding site on (Na^+ plus K^+) adenosinetriphosphatase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71, 2352-2356 (1974).
24. Girardet, M., Geering, K., Frantes, J.M., Geser, D., Rossier, B.C., Kraehenbuhl, J.-P., and Bron, C. Immunochemical Evidence for a transmembrane Orientation of Both the (Na^+ , K^+)-ATPase Subunits. Biochemistry. 20, 6684-6691 (1981).
25. Peterson, G.L., Hokin, L.E. Improved purification of brine shrimp (*Artemia salina*) (Na^+ , K^+)-activated adenosine triphosphatase and amino-acid and carbohydrate analyses of the isolated subunits. Biochem. J. 192, 107-118 (1980).
26. Churchill, L., Pitherson, G.L., and Hokin, L.E. The large subunit of (sodium+potassium)-activated adenosine triphosphatase from the electroplax of *Electrophorus electricus* is a glycoprotein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 488-490 (1979).
27. Kyte, J. Properties of the two polypeptides of sodium and potassium-dependent adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 247, 7642-7649 (1972).
28. Perrone, J.R., Hackney, J.F., Dixon, J.F. and Hokin, L.E. Molecular properties of purified (sodium+potassium)-activated adenosine triphosphatases and their subunits from the rectal gland of *squalus acanthias* and the electric organ of *Electrophorus electricus*. J. Biol. Chem. 250, 4178-4184 (1975).
29. Jean, D.H., Albers, R.W. and Koval, G.J. Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase of *electrophorus electricus* organ. X. Immunochemical properties of the Lubrol-solubilized enzyme and its constituent polypeptides. J. Biol. Chem. 250, 1035-1040 (1975).
30. Rhee, H.M. and Hokin, L.E. Inhibition of the purified sodium potassium activated adenosinetriphosphatase from the rectal gland of *squalus acanthias* by antibody against the glycoprotein subunit. Biochem. Biophys. Res. Commun. 63, 1139-1145 (1975).
31. Hall, C., Rucho, A. Ouabain-Binding site photoaffinity probes that label both subunits of Na^+ , K^+ -ATPase. Proc Natl Acad Sci USA 77 (8) 4529-4533 (1980).
32. Kepner, G.R. and Macey, R.I. Membrane enzyme systems. Molecular size determinations by radiation inactivation. Biochim. Biophys. Acta 163, 188-203 (1968).

33. Hokin, L.E. Purification and properties of the (sodium + potassium)-activated adenosine triphosphatase and reconstitution of sodium transport. Part I. Purification and Physical Properties. Ann. N.Y. Acad. Sci 242, 12-23 (1974).
34. Freytag, J.W. and Reynolds, J.H. Polipeptide molecular weights of the (Na⁺ + K⁺)-ATPase from porcine kidney medulla. Biochemistry 20, 7211-7214 (1981).
35. Brotherus, J.R., Møller, J.V. and Jorgensen, P.L. Soluble and active renal Na⁺, K⁺-ATPase with maximum protein molecular mass 170,000[±] 9000 daltons; formation of large units by secondary aggregation. Biochem, Biophys. Res. Commun. 100, 146-154 (1981).
36. Giotta, G.J. Quaternary Structure of (Na⁺ + K⁺)-dependent Adenosine Triphosphatase. J. Biol. Chem. 251, 1247-1252 (1976).
37. Kimmelberg, H.K., and Papahadjopoulos, D. Phospholipid requirements for (Na⁺ + K⁺)-ATP activity: head-group specificity and fatty acid fluidity. Biochim. Biophys. Acta. 282, 277-292, (1972).
38. Tanaka, R., and abood, L.G. Phospholipid requirement of Na⁺, K⁺-activated adenosine triphosphatase from rat brain. Arch. Biochem. Biophys. 108, 47-52 (1964).
39. Wheeler, K.P., and Whittam, R. The involvement of phosphatidylserine in adenosine triphosphatase activity of the sodium pump. J. Physiol. London 207, 303-328 (1970).
40. Jarnefelt, J. Lipid requirements of functional membrane structures as indicated by the reversible inactivation of (Na⁺ K⁺)-ATPase. Biochim. Biophys. Acta 266, 91-96 (1972).
41. Noguchi, T., and Freed, S. Dissociation of lipid components and reconstitution at -75°C of Mg²⁺ dependent, Na⁺ and K⁺ stimulated adenosine triphosphatase in rat brain. Nature London New Biol. 230, 148-150 (1971).
42. Roelofsen, B., Baadenhuysen, H., and Van Deenen, L.L.M. Effects of organic solvents on the adenosine triphosphatase activity of erythrocyte ghosts. Nature London 212, 1379-1380 (1966).
43. Goldman, S.S., and Albers, R.W. Sodium-Potassium-activated adenosine triphosphatase. IX. The role of phospholipids. J. Biol. Chem. 248, 867-874 (1973).
44. Hokin, L.E. and Hexum, T.D. Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. IX. On the role of phospholipids

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- in the enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 151, 453-463 (1972).
45. Schatzmann, H.J. Lipoprotein nature of red cell adenosine triphosphatase. Nature London 196, 677 (1962).
 46. Taniguchi, K., and Tonomura, Y. Inactivation of Na^+ - K^+ -dependent ATPase by phospholipase treatment and its reactivation by phospholipids. J. Biochem. 69, 543-557 (1971).
 47. Wheeler, K.P. Walker, J.A., and Barker, D.M. Lipid requirement of the membrane sodium-plus-potassium ion-dependent adenosine-triphosphatase system. Biochem. J. 146, 713-722 (1975).
 48. De Pont, J.J.H.M. Van Prooyen-Vam Eeden, A. and Boting, S.L. Studies on $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -activated ATPase, XXXIX. Role of negatively charged phospholipids in highly purified $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase from rabbit kidney outer medulla. Biochim. Biophys. Acta 508, 464-477 (1978).
 49. Glynn, I.M. The action of cardiac glycosides on ion movements. Pharmacol. Rev. 16, 381-407. (1964).
 50. Hegyvary, C., and Post, R.L. Binding of adenosine triphosphate to sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 246, 5234-5240 (1971).
 51. Garrahan, P.J. and Glynn, I.M. The stoichiometry of the sodium pump. J. Physiol. London 192, 217-235 (1967).
 52. Dixon, J.F. and Hokin, L.E. The reconstituted (Na, K) -ATPase is electrogenic. J. Biol. Chem 255 (22), 10681-10686 (1980).
 53. Schwartz, A., Lindenmayer, G.E. and Allen, J.C. The sodium-potassium adenosine triphosphatase: Pharmacological, physiological and biochemical aspects. Pharmacol. Rev. 27, 1-34 (1975).
 54. Glynn, I.M., and Lew, V.L. Synthesis of adenosine triphosphate at the expense of down hill cation movements in intact human red cells. J. Physiol. London 207, 393-402 (1970).
 55. Taniguchi, K., and Post, R.L. Synthesis of adenosine triphosphate and exchange between inorganic phosphate and adenosine triphosphate in sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 250, 3020-3018 (1975).
 56. Garrahan, P.J. and Glynn, I.M. The behaviour of the sodium pump in red cells

- in the absence of external potassium. *J. Physiol.* 192, 159-174 (1967).
57. Glynn, I.M., and Karlish, S.J.D. ATP hydrolysis associated with an uncoupled sodium flux through the sodium pump: evidence for allosteric effects of intracellular ATP and extracellular sodium. *J. Physiol. London* 256, 465-496 (1976).
 58. Post, R.L., Hegyvary, C. and Kume, S. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 247, 6530-6540 (1972).
 59. Sachs, J.R. Sodium movements in the human red blood cell. *J. Gen. Physiol.* 56, 322-41 (1970).
 60. Cavieres, J.D. and Glynn, I.M., Na-Na exchange by the Na pump requires ATP as well as ADP [proceedings]. *J. Physiol.* 263, 214-215 (1976).
 61. Glynn, I.M., Hoffman, J.F. Nucleotide requirements for sodium-sodium exchange catalysed by the sodium pump in human red cells. *J. Physiol. London* 218, 239-56 (1971).
 62. Robinson, J.D. The $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -dependent ATPase, mode of inhibition of ADP/ATP exchange activity by MgCl_2 . *Biochim. Biophys. Acta* 440, 711-722 (1976).
 63. Simons, T.J.B. Potassium: potassium exchange catalysed by the sodium pump in human red cells. *J. Physiol. London* 237, 123-155 (1974).
 64. Simons, T.J.B. The interaction of ATP-analogues possessing a blocked phosphate group with the sodium pump in human red cells. *J. Physiol.* 244, 731-739 (1975).
 65. Post, R.L., Toda, G. and Rogers, F.N. Phosphorylation by inorganic phosphate of sodium plus potassium ion transport adenosine triphosphatase. Four reactive states. *J. Biol. Chem.* 250, 691-701 (1975).
 66. Schoner, W., Von Ilberg, C., Kramer, R., and Seubert, W. On the mechanism of Na^+ - and K^+ -stimulated hydrolysis of adenosine triphosphate. I. Purification and properties of a Na^+ - and K^+ activated ATPase from ox brain. *Eur. J. Biochem.* 1, 334-343 (1967).
 67. Robinson, J.D. Nucleotide and divalent cation interactions with the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -dependent ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 341, 232-247 (1974).
 68. Robinson, J.D. Substrate sites of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -dependent ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 429, 1006-1019 (1976).

69. Hexum, T. Samson, F.E. Jr. and Himes, R.H. Kinetic studies of membrane $(\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Mg}^{2+})$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 212, 322-331 (1970).
70. Robinson, J.D., Flashner, M.S. and Marin, G.K. Inhibition of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -dependent ATPase by inorganic phosphate. *Biochim. Biophys. Acta* 509, 419-428 (1978).
71. Dahl, J.L. and Hokin, L.E. The sodium-potassium adenosine triphosphatase. *Annu. Rev. Biochem.* 43, 327-356 (1974).
72. Robinson, J. D. Functionally distinct classes of K^+ sites on the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ dependent ATPase. *Biochim Biophys. Acta* 384, 250-264 (1975).
73. Bader, H., and Sen A.K. (K^+) -dependent acyl phosphatase as part of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -dependent ATPase of cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 118, 116 - 123 (1966).
74. Jorgensen, P.L., Skou, J.C., Solomonson, L.P. Purification and characterization of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase. II. Preparation by zonal centrifugation of highly active $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATPase from the outer medulla of rabbit kidneys. *Biochim. Biophys. Acta* 233, 381-94 (1971).
75. Nagai, K., Izumi, F., Yoshida, H. Studies on potassium dependent phosphatase: its distribution and properties. *J. Biochem. Tokyo* 59, 295-303 (1966).
76. Fujita, M., Nakao, T., Toshima, Y., Mizuno, N., Nagano, K., Nakao, M. Potassium-ion stimulated p-nitrophenylphosphatase activity occurring in a highly specific adenosine triphosphatase preparation from rabbit brain. *Biochim. Biophys. Acta* 117, 42-53 (1966).
77. Inturrisi, C.E., Titus, E.O. Ouabain dependent incorporation of ^{32}P from p-nitrophenylphosphate into a microsomal phosphatase. *Mol. Pharmacol.* 6, 99 - 107 (1970).
78. Yoshida, H., Izumi, F., Nagai, K. Carbamyl-phosphate, a preferential substrate of K^+ -dependent phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 120, 183-86 (1966).
79. Robinson, J.D. Kinetics studies on a brain microsomal adenosine triphosphatase. III. Potassium-dependent phosphatase activity. *Biochemistry* 8, 3348-3355 (1969).
80. Robinson, J.D. Phosphatase activity stimulated by Na^+ plus K^+ : Implications for the $(\text{Na}^+ \text{ plus } \text{K}^+)$ -dependent adenosine triphosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 164-171 (1970).

81. Garrahan, P.J., Pouchan, M.I., Rega, A.F. Potassium-activated phosphatase - from human red blood cells. The effects of adenosine triphosphate. *J. Membrane Biol.* 3, 26-42 (1970).
82. Albers, R.W., Koval, G.J. Na-K-activated ATPase of *Electrophorus electricus*. VIII. Monovalent cation sites regulating phosphatase activity. *J. Biol. Chem.* 248, 777-84 (1973).
83. Robinson, J.D. Cation interactions with different functional states of the Na^+ , K^+ -ATPase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 242, 185-202 (1974).
84. Swann, A.C. and Albers, R.W. Sodium potassium - activated ATPase of mammalian brain. Regulation of phosphatase activity, *Biochim Biophys. Acta.* 382, 437-456. (1975).
85. Hansen, O., Jensen, J. and Norby. Mutual exclusion of ATP, ADP and g-strophan tin binding to NaK-ATPase. *Nature London New Biol.* 234, 122-124 (1971).
86. Sen, A.K., Tobin, T., and Post, R.L. A cycle for ouabain inhibition of sodium and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 244, 6596 - 6604 (1969).
87. Caldwell, P.C., and Keynes, R.D. The Effect of ouabain on the efflux of sodium from a squid giant axon. *J. Physiol London* 148, 8P-9P, (1959).
88. Hoffman, J.F. The red cell membrane and the transport of sodium and potassium *Am. J. Med.* 41, 666-680 (1966).
89. Erdmann, E., and Schoner, W. Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ preparations. IV. The molecular structure of different cardioactive steroids and other substances and their affinity to the glycoside receptor. *Arch. Pharmacol.* 283: 335-356, (1974).
90. Albers, R.W., Koval, G.J. and Siegel, G.J. Studies on the interaction of ouabain and other cardio-active steroids with sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. *Mol. Pharmacol.* 4, 324-336 (1968).
91. Erdmann, E., Schoner, W. Ouabain-receptor interactions in $(\text{Na}+\text{K})\text{-ATPase}$ preparations. II. Effect of cations and nucleotides on rate constants and dissociation constants. *Biochim. Biophys. Acta* 330, 302-315 (1973).
92. Hansen, O., Skou, J.C. A study on the influence of the concentration of Mg^{2+} , Pi , K^+ , Na^+ , and Tris on $(\text{Mg}^{2+}, \text{Pi})\text{-supported}$ g-strophanthin binding to $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-activated}$ ATPase from ox brain. *Biochim. Biophys. Acta* 311, 51-66 (1973).

93. Tobin, T., Sen, A.K. Stability and ligand sensitivity of ^3H -ouabain binding to $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$. *Biochim. Biophys. Acta* 198, 120-31 (1970).
94. Tobin, T., and T.M. Brody. Rates of dissociation of enzyme-ouabain complexes and $K_{0.5}$ values in $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ adenosine triphosphatase}$ from different species. *Biochem. Pharmacol.* 21, 1553-1560 (1972).
95. Tobin, T., R. Henderson, and A.K. Sen. Species and tissue differences in the rate of dissociation of ouabain from $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$. *Biochim. Biophys Acta* 274, 551-555 (1972).
96. Robinson, J.D. Effects of oligomycin on the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-dependent adenosine triphosphatase}$. *Mol. Pharmacol.* 7, 238-246 (1971).
97. Fahn, S., Koval, G.J. and Albers, R.W. Sodium-potassium-activated adenosine-triphosphatase of *Electrophorus electric organ*. I. An associated sodium-activated transphosphorylation. *J. Biol. Chem.* 241, 1882-1889 (1966).
98. Askari, A. and Koyal, D. Different oligomycin sensitivities of the $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ -activated adenosine triphosphatase and its partial reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 227-232 (1968).
99. Fahn, S., Koval, G.J., and Albers, R.W. Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase of *Electrophorus electric organ*. V. Phosphorylation by adenosine triphosphate- ^{32}P . *J. Biol. Chem.* 243, 1993-2002 (1968).
100. Cantley, L.C. Jr. Cantley, L.G. and Josephson, L. A characterization of vanadate interactions with the $(\text{Na}, \text{K})\text{-ATPase}$. Mechanistic and regulatory implications. *J. Biol. Chem.* 253, 7361-7368 (1978).
101. Beaugé, L.A. and Glynn, I.M. Commercial ATP containing traces of vanadate alters the response of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ to external potassium. *Nature* 272, 551-554 (1978).
102. Beaugé, L.A. Vanadate-potassium interactions in the inhibition of $\text{Na}, \text{K}\text{-ATPase}$. In: *Na, K-ATPase. Structure and kinetics*, edited by J.C. Skou and J.C. Norby, New York: Academic, p 373-387, 1979.
103. Jorgensen, P.L. Purification and characterization of $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. V Conformational changes in the enzyme transitions between the Na -form and the K -form studied with tryptic digestion as a tool. *Biochim. Biophys. Acta* 401, 399-416 (1975).
104. Jorgensen, P.L. Purification and characterization of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$. VI Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified

- enzyme in presence of NaCl and KCl. *Biochim. Biophys. Acta* 466, 97-108 (1977).
105. Castro, J. and Farley, R.A. Proteolytic fragmentation of the catalytic subunit of the sodium and potassium adenosine triphosphatase alignment of tryptic and chymotryptic fragments and location of sites labeled with ATP and iodoacetate. *J. Biol. Chem.* 254, 2221-2228 (1979).
 106. Karlsh, S.J.D. and Yates, D.W. Tryptophan fluorescence of Na, K-ATPase as a tool for study of the enzyme mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 527, 115-130 (1978).
 107. Schuurmans Stekhoven, F.M.A.H. Van Heeswijk, M.P.E., de Pont, J.J.H.H.M., and Bonting, S.L. Studies on $(Na^+ + K^+)$ -activated ATPase. XXXVIII. A 100 000 molecular weight protein as the low energy phosphorylated intermediate of the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 422, 210-224 (1976).
 108. Post, R.L., Kume, S., Tobin, T., Orcutt, B., and Sen, A.K. Flexibility of an active center in sodium plus-potassium adenosine triphosphatase. *J. Gen Physiol.* 54, 305_s-326_s, (1969).
 109. Siegel, G.J., Koval, G.J., and Albers, R.W. Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. IV. Characterization of the phosphoprotein formed from orthophosphate in the presence of ouabain. *J. Biol. Chem.* 244, 3264-3269, (1969).
 110. Post, R.L., Kume, S. Evidence for an aspartil phosphate residue at the active site of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 248, 6993-7000 (1973).
 111. Nishigaki, I., Chen, F.T., and Hokin, L.E. Studies on the characterization of the sodium-potassium transport adenosine triphosphatase. XV. Direct chemical characterization of the acyl phosphate in the enzyme as an aspartyl phosphate residue. *J. Biol. Chem.* 249, 4911-4916, (1974).
 112. Degani, C., and Bayer, P.D. A borohydride reduction method for characterization of the acyl phosphate linkage in proteins and its application to sarcoplasmic reticulum adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 248, 8222-8226 (1973).
 113. Norby, J.G. and Jensen, J. Binding of ATP to Na, K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 233, 104-116, (1971).
 114. Kanazawa, T., Saito, M. and Tonomura, Y. Formation and decomposition of a phosphorylated intermediate in the reaction of Na plus K-dependent ATPase. J.

- Biochem. (Tokio) 67, 693-711, (1970).
115. Swann, A.C. and Albers, R.W. Sodium and potassium ion-dependent adenosine triphosphatase of mammalian brain. Interactions of magnesium ions with the phosphatase site. *Biochim. Biophys. Acta* 523, 215-227 (1978).
 116. Rossi, B., Gache, C. and Lazdunski, M. Specificity and interactions at the cationic sites of the axonal (Na^+ , K^+)-activated adenosine triphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 85, 561-570, (1978).
 117. Flashner, M.S. and Robinson, J.D. Effects of Mg^{2+} on activation of the (Na^+ + K^+)-dependent ATPase by Na^+ . *Arch. Biochem. Biophys.* 192, 584-591, (1979).
 118. Sen, A.K., and Post, R.L. Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate-dependent sodium and potassium transport in the erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 239: 345-352, (1964).
 119. Fahn, S., Hurley, M.R., Koval, G.J. and Albers, R.W. Sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase of *Electrophorus electricus* organ II Effects of N-ethylmaleimide and other sulfhydryl reagents. *J. Biol. Chem.* 241, 1890-1895, (1966).
 120. Lew, V.L. Hardy, M. A., Jr. and Ellory, J.C. The uncoupled extrusion of Na^+ through the Na^+ pump. *Biochim. Biophys. Acta* 323, 251-266, (1973).
 121. Robinson, J.D. Kinetic studies on a brain microsomal adenosine triphosphatase. Evidence suggesting conformational changes. *Biochemistry* 6, 3250-3258, (1967).
 122. Karlsh, S.J.D., Yates, D.W. and Glynn, I.M. Conformational transitions between Na^+ -Bound and K^+ -Bound forms of (Na^+ + K^+)-ATPase, studied with formycin nucleotides. *Biochim. Biophys. Acta*, 525, 252-264, (1978).
 123. Siegel, G.J., and Albers, R.W. Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase of *Electrophorus electricus* organ. IV. Modification of responses to sodium and potassium by arsenite plus 2, 3 dimercaptopropanol. *J. Biol. Chem.* 242, 4972-4979, (1967).
 124. Froehlich, J.P., Albers, R.W., Koval, G.J., Goebel, R. and Berman, M. Evidence for a new intermediate state in the mechanism of (Na^+ + K^+)-adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 251, 2186-2188 (1976).
 125. Grosse, R., Rapoport, T., Malur, J., Fischer, J., and Repke, K.R.H. Mathematical modelling of ATP, K^+ and Na^+ interactions with (Na^+ + K^+)-ATPase occurring under equilibrium conditions. *Biochim, Biophys. Acta* 550, 500-514, (1979).

126. Moczydlowski, E.G. and Fortes, P.A.G. Characterization of 2', 3'-o-(2,4,6-Trinitrocyclohexadienylidene) adenosine 5'-triphosphate as a fluorescent probe of the ATP site of sodium and potassium transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 256, 2346-2356, (1981).
127. Moczydlowski, E.G. and Fortes, P.A.G. Inhibition of Sodium and Potassium Adenosine Triphosphatase by 2',3'-o-(2,4,6-Trinitrocyclohexadienylidene) Adenine Nucleotides. Implications for the structure and mechanism of the Na:K Pump. *J. Biol. Chem.* 256(5), 2357-2366, (1981).
128. De Meis L. Phosphorylation of the membranous protein of the sarcoplasmic reticulum. Inhibition by Na^+ and K^+ . *Biochemistry* 11, 2460-5 (1972).
129. Taussky H.H. and Shorr, E. A microcolorimetric method for the determination of organic phosphorus. *J. Biol. Chem.* 202, 675-685, (1953).
130. Weber, K. and Osborn, M. The reability of molecular weight determinations by SDS gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412, (1969).
131. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein Measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, (1951).
132. Nakamura, J., Wang, T., Tsai, L.I., Schwartz, A. Properties and characterization of a Highly purified S.R. Ca-ATPase from Dog Cardiac and Rabbit Skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 258(8) 5079-5083, (1983).
133. Segel, I.H. Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady State Enzyme Systems. John Wiley and Sons (1975) ch. 7
134. Sachs, J.R., Welt, L.G. The concentration dependence of active K transport in the human red blood cell. *J. Clin. Invest.* 46, 65-76, (1967).
135. Beaugé, L., Berberian, G. and Campos, M. Potassium -p-Nitrophenyl phosphate interactions with $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ their relevance to phosphatase activity. *Biochim. Biophys Acta* 773, 157-164 (1984).
136. Drapeau, P. and blostein, R. Interactions of K^+ with $(\text{Na},\text{K})\text{-ATPase}$ orientation of K^+ -phosphatase sites studied with inside-out red cell membrane vesicles. *J. Biol Chem* 255, 7827-2834 (1980).
137. Robinson, J.D. K^+ -stimulated incorporation of ^{32}P from nitrophenyl phosphate into a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-activated ATPase}$ preparation. *Biochem Biophys Res comm.* 42 (5) 880-85, (1971).
138. Robinson, J.D. Cation sites of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-dependent ATPase}$: Mechanisms -

- for Na^+ -induced changes in K^+ affinity of the phosphatase activity. *Biochim Biophys. Acta* 321, 662-670, (1973).
139. Robinson, J.D., Levine, G.M. and Robinson L.J. A model for the reaction pathways of the K^+ -dependent phosphatase activity of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -dependent ATPase. *Biochim Biophys Acta*, 731, 406-414, (1983).
 140. Robinson, J.D., Robinson, L.J. and Martin, N.J. Effects of oligomycin and quercetin on the hydrolytic activities of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -dependent ATPase. *Biochim Biophys Acta*, 772, 295-306, (1984).
 141. Askari, A., Huang, W. Na^+ , K^+ -ATPase: Evidence for the binding of ATP to the phosphoenzyme. *Biochim. Biophys. Res. Com.* 104, 1447-1453 (1982).
 142. Hobbs, A.S., Albers, R.W., Froehlich, J.P. and Heller, P.F. ADP stimulates hydrolysis of the "ADP-insensitive" phosphoenzyme in Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* 260, 2035-2037, (1985).
 143. Huang, W.H. Simultaneous binding of ATP and vanadate to $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase, Implications for the reaction mechanism of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 259 (21) 13287-1391, (1984).
 144. Kakar, S.S. Coexistence of two sites on the ouabain complex $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -ATPase. *Biochem Int.* 11 (4), 611-616, (1985).
 145. Silva, S.L., and Verjouski-Almeida, S. Self-association and modification of Calcium binding in solubilized Sarcoplasmic reticulum adenosinetriphosphatase. *Biochemistry.* 22, 707-716, (1983).
 146. Guimaraes-Motta, H., Sande-Lemos, M.P., de Meis, L. Energy interconversion in Sarcoplasmic reticulum vesicles in the presence of Ca^{2+} and Sr^{2+} gradients. *J. Biol. Chem.* 259, 8699-8705, (1984).
 147. Holguín J.A. Cooperative Effects of Ca^{2+} and Sr^{2+} on sarcoplasmic reticulum - Adenosine Triphosphatase. *Arch Biochem Biophys*, 251 (1), 9-16, (1986).