



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**IDENTIFICACIÓN Y ESTUDIO DE LOS
ESTADOS OLIGOMÉRICOS DE LA H⁺-ATPASA
DE MEMBRANA PLASMÁTICA DE
*Kluyveromyces lactis***

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN NUTRICIÓN
P R E S E N T A**

YADIRA GISELA RUIZ GRANADOS

**BAJO LA DIRECCIÓN DE:
DR. JOSÉ G. SAMPEDRO PÉREZ**

PACHUCA, HGO., JULIO 2006.





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**



CON EL ORGULLO DE SER UNIVERSITARIO !!

De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

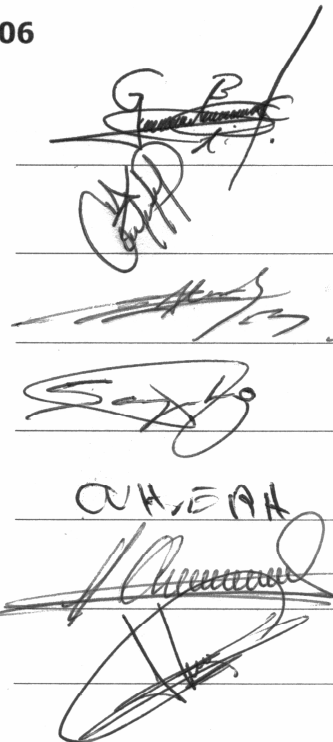
"Identificación y estudio de los estados oligoméricos de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática de *Kluyveromyces lactis*"

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustenta la Pasante

C. Ruíz Granados Yadira Gisela

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo., 16 de Junio del 2006
"Amor, Orden y Progreso"

Presidente del Jurado	Dr. Gabriel Betanzos Cabrera
Secretario de Jurado	IBQ. Araceli Ortiz Polo
1er. Vocal del Jurado	Dr. Ernesto Alanis García
2º Vocal del Jurado	Dr. Jose Guadalupe Sampedro Pérez
3er Vocal del Jurado	Dr. Hugo Nájera Peña
Suplente	M. en N. H. Amanda Peña Irecta
Suplente	QFB. Zurissadai Betanzos Palmeros
c.c.p.- Interesado	
c.c.p.- Expediente	



Esta tesis fue realizada
en el Laboratorio de Nutrición Molecular
del Instituto de Ciencias de la Salud
de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la asesoría
del Dr. José G. Sampedro Pérez
y con el financiamiento de los proyectos:

**PROMEP-SESIK SEP UAEHGO-PTC-192 “Estudio de la estructura y
función de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática y su estabilidad en
condiciones de estrés”,**

**y CONACYT 46537 “Las P-ATPasas de cobre y protones estructura,
función y estabilidad en condiciones de estrés”**

AGRADECIMIENTOS

Sabiendo que las palabras no son suficientes... GRACIAS...

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por la ventura de formar parte de su comunidad y por brindar lo necesario para mi desarrollo profesional... con el orgullo de ser universitaria.

A PROMEP y CONACYT por el apoyo y fomento a la investigación.

Al Área Académica de Nutrición; al Maestro Marcos Galván por sus invaluable enseñanzas, a todos y cada uno de mis maestros de quienes tanto aprendí.

A los sinodales de esta tesis: Dr. Gabriel Betanzos, I.B.Q. Araceli Ortiz, Dr. Ernesto Alanís, Dr. José Sampedro, Dr. Hugo Nájera, Q.F.B. Zurissadaí Betanzos, así como a la M. en N. H. Amanda Peña por su valiosa colaboración.

A mi director de tesis; el Dr. Sampedro por acercarme al mundo fascinante de la ciencia, por su inigualable guía, por sus consejos y enseñanzas, por su confianza, entusiasmo y apoyo.

Al Instituto de Fisiología Celular (UNAM) y en especial al Dr. Salvador Uribe por alentar y apoyar la culminación de esta tesis, por las facilidades otorgadas en su laboratorio y por la gran oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Hugo Nájera por su apoyo constante y sus acertadas observaciones.

A Dr. Alfredo Téllez por sus entusiastas comentarios, así como al área académica de Farmacia y a Martita por los préstamos y consejos.

Al Dr. Alanís por su apreciable ayuda con todos los trámites de titulación.

GRACIAS...

A la química Ale Islas no solo por las facilidades y el apoyo con material y reactivos, sino también por las palabras de aliento y las charlas compartidas.

A los que conmigo formaron parte de la segunda generación de la Licenciatura en Nutrición y con quienes compartí más que cuatro años de formación académica. A los de mi pequeño gran grupo: Ale, Selene, Ely, Digna, Karla, Dulce, Marina, Yasser, Héctor, Emma y Elusaid.

A mis compañeras de laboratorio y colegas, en particular a Isabela, Andrea y Laura por seguirme brindando su amistad.

A mis grandes amigas Ale, Karina e Isabel con quienes he tenido la fortuna de compartir todos estos años de formación académica, llevando nuestras técnicas como laboratoristas a la investigación en nutrición, y sin las cuales lo que pasábamos dentro y fuera del laboratorio, no hubiera sido tan divertido.

A Álvaro Meneses, por ayudarme a ver mis cualidades y virtudes, por su invaluable comprensión y apoyo, por compartir aún los tiempos difíciles, que sin embargo llegamos a evocar... por todos los momentos que solo quedarán... "entre nous".

A toda mi familia, por ser los pilares de mi formación personal y profesional. A mis tíos y a mi madre por su dedicación y esfuerzo, por su apoyo constante, por su confianza y entusiasmo.

Al dador de la sabiduría, a Dios, por su fidelidad incomparable, por su gracia infinita, por la muestra mas grande de amor; el Único Camino, la Verdad y Vida.

A todas aquellas personas que comparten conmigo este gran logro.

DEDICATORIAS

Dedico con todo mi amor esta tesis a todos los que son parte de mi vida:

*A mi gran familia; a mis tíos, quienes han confiado y cuidado de mí,
a mis primos y sobrinos por darle a mi vida alegría y esperanza,
y muy especialmente a mi mamita Leo, por su apoyo incondicional, por su lucha incansable.*

*A Álvaro, por compartir más que sueños y logros;
con quien he aprendido a valorar el mas sublime sentimiento... JTM =u*v= pour toute la vie*

A mis entrañables amigos:

Karina, Isabel y Chucho que emprendieron conmigo esta carrera, y con quienes viví momentos inolvidables. A Kary por las grandes alegrías, tristezas y esfuerzos compartidos, a Chabelita por esa chispa de felicidad, al Fulanito, donde quiera que esté.

A Ale, por tantos momentos que disfrutamos juntas.

A Selene, quien me enseñó el valor de la amistad.

A Saynne, mi mejor amiga.

A Javier, por sus consejos y apoyo incondicional.

A Martin y toda la Fam. Hernández Pacheco por los momentos compartidos sin igual y la lucha por nuestra amistad. A Vicky con quien hubiera deseado compartir este logro... "aunque ya no estés aquí, te veo en el cielo".

A los viejos y nuevos amigos.

A todos los que guardan un lugar especial en mi corazón y en mi vida...

ABREVIATURAS

Abreviación	Significado
ADP	Adenosin difosfato
AMP-PCP	adenosina 5'-[β,γ -metilene]trifosfato
ATP	Adenosin trifosfato
BN-PAGE	Electroforesis nativo azul (Blue Native PAGE)
BSA	Albúmina sérica bovina
DOC	Desoxicolato de sodio
EDTA	Etilen diamino tetraacetato de sodio
EGTA	Etilen glicol-bis (β -aminoetileter)- <i>N,N,N,N</i> - tetraacetato de sodio
<i>g</i>	Gravedad de la tierra (aceleración = $g = 9.81 \text{ m s}^{-2}$)
HSP	Proteínas de choque térmico
K_d	Constante de disociación
kDa	kilodalton
M	Concentración molar
M_r	Masa molecular
<i>n</i>	Número de Hill
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonato
$S_{0.5}$	Concentración de sustrato cuando: velocidad = $v = \frac{1}{2} V_{\max}$
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Std PM	Estándares de peso molecular
TEMED	<i>N,N,N,N</i> -Tetrametilenetilendiamino
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
V_{\max}	Velocidad máxima
YPD	Medio de cultivo: extracto de levadura-peptona-dextrosa
Zwittergent 3,14	<i>N</i> -tetradecil- <i>N,N</i> -dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato

ÍNDICE

TEMA	Pag.
RESUMEN.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 La H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática.....	3
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1 Las proteínas y la trehalosa	9
2.2 La dinámica estructural de las proteínas.....	10
3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	11
4. JUSTIFICACIÓN.....	11
5. OBJETIVOS.....	13
6. METODOLOGÍA.....	14
6.1 Purificación de las membranas plasmáticas de levadura.....	14
6.2 Purificación de la H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática.....	15
6.3 Determinación de concentración proteica.....	17
6.4 Medición de la actividad catalítica de la H ⁺ -ATPasa.....	17
6.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	18
6.5.1 SDS-PAGE.....	19
6.5.2 BN-PAGE.....	19
6.6 Tinción de geles de poliacrilamida.....	21
6.6.1 Tinción con azul de coomassie.....	21
6.6.2 Tinción de plata.....	22
6.7 Densitometría.....	22
6.8 Cromatografía en columna.....	22

TEMA	Pag.
6.9 Apagamiento de la fluorescencia de la H ⁺ -ATPasa de membrana plasmática.....	23
6.10 Análisis de datos.....	23
7. RESULTADOS	25
7.1 Purificación de la H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática de <i>K. lactis</i>	25
7.2 Determinación de la estructura oligomérica de la H ⁺ -ATPasa.....	26
7.3 Identificación de los estados oligoméricos de la H ⁺ -ATPasa.....	27
7.4 Estudio de los parámetros cinéticos de la H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática.....	28
7.4.1 H ⁺ -ATPasa previa a la cromatografía en columna	28
7.4.2 H ⁺ -ATPasa del pico I.....	29
7.4.3 H ⁺ -ATPasa del pico II.....	30
7.5 Espectro de fluorescencia de la H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática de <i>K. lactis</i>	32
7.6 Apagamiento de la fluorescencia de la H ⁺ -ATPasa de membrana plasmática por la unión de ADP y AMP-PCP.....	33
7.6.1 H ⁺ -ATPasa previa a la cromatografía.....	33
7.6.2 H ⁺ -ATPasa de pico I	34
7.6.3 H ⁺ -ATPasa de pico II	35
8. DISCUSIÓN	36
9. CONCLUSIONES	41
10. BIBLIOGRAFÍA	42
11. ANEXOS	50

INDICE DE FIGURAS

	<i>Pag.</i>
Figura 1. Topología de la H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática.....	5
Figura 2. La H ⁺ -ATPasa y el transporte secundario en la levadura..... ..	7
Figura 3. Modelo estructural propuesto para la H ⁺ -ATPasa de <i>N. crassa</i> basado en la estructura cristalina de la Ca ²⁺ -ATPasa del R. S.....	8
Figura 4. Ciclo catalítico propuesto para la H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática de levadura.	9
Figura 5. Diagrama de flujo de la purificación de la H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática de <i>K. lactis</i>	16
Figura 6. SDS PAGE de H ⁺ -ATPasa aislada de membrana plasmática de <i>K. lactis</i>	25
Figura 7. Cromatografía por exclusión molecular de H ⁺ -ATPasa aislada de membrana plasmática de <i>K. lactis</i>	26
Figura 8. BN-PAGE análisis de los diferentes estados oligoméricos de la H ⁺ -ATPasa.....	27
Figura 9. Cinética de saturación con sustrato de la H ⁺ -ATPasa de membrana plasmática a 30 °C obtenida a partir del gradiente de trehalosa.....	28
Figura 10. Cinética de saturación con sustrato de la H ⁺ -ATPasa del pico I de la cromatografía en columna.....	29
Figura 11. Cinética de saturación con sustrato de la H ⁺ -ATPasa del pico II de la cromatografía en columna.....	30

	<i>Pag.</i>
Figura 12. Espectro de fluorescencia de la H ⁺ -ATPasa.....	32
Figura 13. Apagamiento de la fluorescencia de la H ⁺ -ATPasa en presencia de diferentes concentraciones de ADP y AMP-PCP.....	33
Figura 14. Apagamiento de la fluorescencia de la H ⁺ -ATPasa del pico I en presencia de diferentes concentraciones de nucleótido.....	34
Figura 15. Apagamiento de la fluorescencia de la H ⁺ -ATPasa del pico II en presencia de diferentes concentraciones de nucleótido.....	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. ATPasas tipo P.....	4
Tabla 2. Alineación de los aminoácidos de la H ⁺ -ATPasa de diferentes organismos.....	6
Tabla 3. Parámetros cinéticos de la H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática de <i>K. lactis</i>	31
Tabla 4. Grado de afinidad por sustrato en la H ⁺ -ATPasa de membrana plasmática y sus diferentes estados oligoméricos.....	31

ANEXOS

1. Soluciones para la purificación de H ⁺ -ATPasa.....	50
2. Soluciones para el método de Lowry.....	51
3. Soluciones para la SDS-PAGE.....	52
4. Soluciones para el BN-PAGE.....	53
5. Soluciones para la tinción de plata.....	54
6. Soluciones para la tinción con azul de coomassie.....	55

RESUMEN

En este estudio se mejoró el procedimiento de purificación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de la levadura *Kluyveromyces lactis*, obteniéndose una enzima con alta pureza (90.4%) después de la centrifugación en un gradiente discontinuo de trehalosa. El análisis por dispersión de luz (Light scattering) mostró un alto grado de agregación proteica debido probablemente a la naturaleza hidrofóbica de la enzima. La suspensión proteica fue sometida a un proceso adicional de separación por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna de Superosa 6. El perfil de elución mostró dos picos máximos de absorbencia (I y II) a 280nm. En electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas (BN-PAGE) se determinó un estado hexamérico (600 kDa) para la H⁺-ATPasa correspondiente al pico I en el perfil de elución. El pico II consistió de una mezcla de diferentes estados oligoméricos. Fueron identificados los siguientes estados: hexámero (600 kDa), tetrámero (400 kDa), dímero (200 kDa) y monómero (100 kDa). Los parámetros cinéticos de la H⁺-ATPasa obtenida del gradiente de trehalosa, así como de los picos I y II fueron determinados utilizando un sistema acoplado a enzimas. La actividad de hidrólisis de ATP en todos los casos mostró una dependencia sigmoidea con respecto a la concentración de ATP; el número de Hill (n) fueron similares y sólo ligeramente mayor para el Hexámero ($n= 1.97\pm 0.21$), los valores de $S_{0.5}$ fueron similares en todos los casos ($S_{0.5}= 0.33\pm 0.021$ mM ATP). Interesantemente, el hexámero presentó una velocidad máxima (V_{max}) significativamente mayor ($V_{max}= 17.68\pm 0.67$ $\mu\text{moles ATP min}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$) que contrasta con la observada para la mezcla de estados oligoméricos ($V_{max}= 5.19\pm 0.25$ $\mu\text{moles ATP min}^{-1}\text{.mg prot}^{-1}$). El espectro de fluorescencia intrínseca se obtuvo para el pico I, II y la suspensión proteica previa a la cromatografía. La fluorescencia intrínseca del hexámero fue tres veces más intensa que la fluorescencia de la mezcla de estados oligoméricos a la misma concentración de proteína. Además, la fluorescencia intrínseca fue altamente sensible a la unión de los sustratos ATP y ADP en todos los casos. Se observó un apagamiento de la fluorescencia presentando una dependencia hiperbólica con la concentración del nucleótido. Se calcularon las constantes de disociación (K_d) del sitio de unión para ADP y ATP. En todos los casos, el sitio de unión presentó una mayor afinidad para el ATP que para el ADP y de forma interesante, en el hexámero se observó una mayor afinidad para ambos nucleótidos: $K_d = 0.12\pm 0.003$ mM para ATP y $K_d = 0.20\pm 0.006$ mM para ADP, así como mayor grado de apagamiento de la fluorescencia por AMP-PCP.

Palabras clave: H⁺-ATPasa, cromatografía por exclusión molecular, cinética enzimática, apagamiento de fluorescencia, estados oligoméricos, constantes de disociación.

ABSTRACT

The isolation procedure for the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis* was improved; a highly pure enzyme (90.4%) was obtained after centrifugation on a trehalose concentration gradient. The H⁺-ATPase was obtained in a highly aggregated state as evidenced by light scattering analysis, which is probably due to the hydrophobic nature of the enzyme. Therefore, size exclusion chromatography on Superose 6 was performed to separate the protein aggregates. The elution profile exhibited two main peaks (named I and II) absorbing at 280 nm. Peak I consisted of the ATPase in a hexameric state (600 kDa) as revealed upon blue native electrophoresis, while peak II was a mixture of different oligomeric states; hexamers (600 kDa), tetramers (400 kDa), dimers (200 kDa) and monomers (100 kDa) were observed. ATP saturation kinetics for the enzyme (in peak I and II) showed a sigmoid (cooperative) dependence. Hill number (n) was slightly higher for the hexamer ($n= 1.97\pm 0.21$) than for the mixture of oligomeric states. While $S_{0.5}$ values were similar; $S_{0.5}= 0.33\pm 0.02$ mM ATP. In contrast, the maximum velocity (V_{max}) for the hexamer was three times higher ($V_{max}= 17.68\pm 0.67$ μ moles ATP $\text{min}^{-1}\text{mg prot}^{-1}$) than for the mixture of oligomeric states ($V_{max}= 5.19\pm 0.25$ μ moles ATP $\text{min}^{-1}\text{.mg prot}^{-1}$). Intrinsic fluorescence studies were also performed. Larger fluorescence intensity (three times) was observed for the hexamers as compared with that of the oligomeric state mixture. Further, fluorescence intensity was highly sensitive to nucleotide binding (ADP and AMP-PCP; an ATP analog). It was observed a hyperbolic dependence of fluorescence quenching on nucleotide concentration, thus allowing calculation of the dissociation constant (K_d) for nucleotides from binding site. The hexameric state displayed the highest affinity for nucleotides; The K_d for ATP and ADP were 0.12 ± 0.003 and 0.20 ± 0.006 mM respectively. Further, higher fluorescence quenching was observed in the presence of ATP than for ADP.

Keywords: H(+)-ATPase, Size exclusion chromatography, ATP saturation kinetics, fluorescence quenching, oligomer state, dissociation constants.

1. MARCO TEÓRICO

La H⁺-ATPasa de membrana plasmática de levadura es un miembro de la familia de las ATPasas tipo P que se encuentran presentes en una gran variedad de células de bacterias, levaduras, hongos, animales y plantas (Serrano *et al*, 1986). Las P-ATPasas forman una gran familia de enzimas de membrana que transportan iones inorgánicos (Na⁺,K⁺,Ca²⁺,Mg²⁺,Cd²⁺,Cu²⁺,H⁺) en contra del gradiente de concentración utilizando para esto la energía de hidrólisis de ATP (Tabla 1). El ciclo catalítico se caracteriza por la formación de un intermediario enzimático fosforilado (Morsomme *et al*, 2000). En animales superiores estas enzimas son ampliamente conocidas y están involucradas en diferentes funciones vitales, por ejemplo: en los potenciales de acción en los tejidos nerviosos, en la secreción y reabsorción de solutos en el riñón, en la acidificación del estómago, en la absorción de nutrientes en los intestinos, en la relajación de los músculos y en la transducción de señales (Axelsen y Palmgren, 1998). Las P-ATPasas más estudiadas son la Ca²⁺-ATPasa del retículo sarcoplásmico, la H⁺, K⁺- la Na⁺, K⁺- y la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática (Scarborough, 2002). En plantas y levaduras la P-ATPasa más estudiada es la protón-ATPasa (H⁺-ATPasa). La actividad de esta enzima es vital para estas células, ya que es la bomba primaria que energiza el transporte de nutrientes (carbohidratos, aminoácidos e iones inorgánicos) a la célula (Serrano, 1993).

1.1 La H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levadura

Estructuralmente, la H⁺-ATPasa consiste de un polipéptido de 100 kDa, similar en tamaño a otras P-ATPasas (Ca²⁺-, Na⁺-, K⁺- y Mg²⁺-ATPasa) y forma un intermediario fosforilado durante la catálisis (Fig. 4) (Amory y Goffeau, 1982). Sin embargo, no contiene la subunidad β glicosilada presente en las P-ATPasas de mamíferos (Na⁺,K⁺- y H⁺,K⁺-ATPasa) (Morsomme *et al*, 2000). La H⁺-ATPasa de la membrana plasmática está codificada por el gene *PMA1*, el cual ha sido clonado y secuenciado en *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Kluyveromyces lactis*, entre otros organismos

(Serrano *et al*, 1986; Miranda *et al*, 1995; Morsomme *et al*, 2000), en los cuales se observa que la longitud de la cadena polipeptídica, así como la secuencia de aminoácidos presentan un alto grado de identidad (Tabla 2)

Tabla 1. ATPasas tipo P*

Nombre	Organismo o tejido	Localización	Función
Na ⁺ K ⁺	Tejidos animales	Membrana plasmática	Mantiene baja concentración de Na ⁺ y alta de K ⁺ en el interior de la célula; crea potencial eléctrico transmembranal
H ⁺ K ⁺	Células parietales de la mucosa gástrica de mamíferos	Membrana plasmática	Acidifica el contenido gástrico
H ⁺	Células de animales, plantas superiores y hongos (<i>Neurospora</i>) y plantas	Membrana plasmática	Genera un gradiente de H ⁺ para el transporte secundario de nutrientes al interior de la célula
Ca ²⁺	Tejidos animales	Membrana plasmática	Mantiene baja concentración de Ca ²⁺ en el citosol.
Ca ²⁺	Miocitos de animales	Reticulo sarcoplasmático	Secuestra Ca ²⁺ intracelular y lo bombea al exterior para mantener baja la concentración de Ca ²⁺ citosólico.
Cd ²⁺ , Hg ²⁺ , Cu ²⁺	Bacterias	Membrana plasmática	Bombea iones metálicos pesados al exterior de la célula.
Cu ²⁺	Mamíferos	Membrana plasmática	Está involucrada en la asimilación y distribución de Cu ²⁺

* Tomada de Lehninger Principles of Biochemistry (Nelson y Cox, 2000)

Como se observa en la figura 1, el polipéptido de 100 kDa está anclado a la membrana por cuatro segmentos transmembranales en la porción amino terminal. Luego posee un gran dominio citoplásmico, seguido de seis segmentos transmembranales en el carboxilo terminal. Ambos extremos (amino y carboxilo) se localizan en el citoplasma (Fig. 1) (Nakamoto y Slayman, 1989).

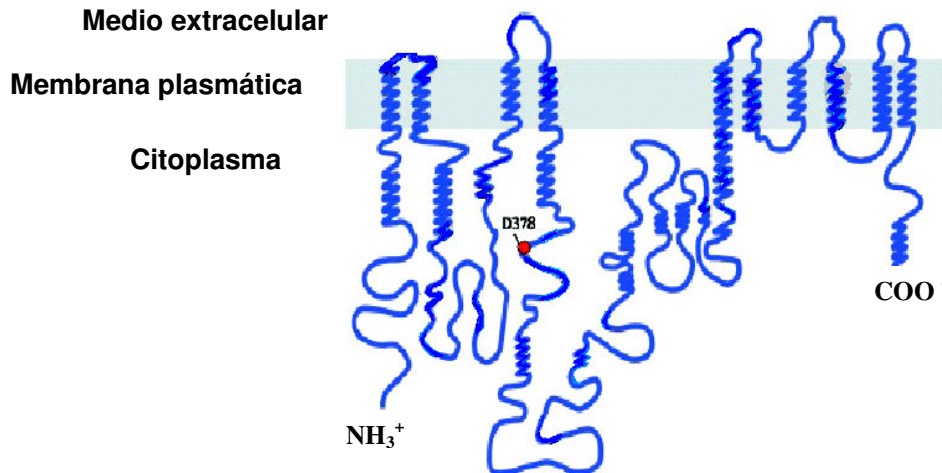


Figura 1. Topología de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de levadura basada en la cristalografía bi- y tridimensional de ATPasas relacionadas (Ferreira *et al*, 2001; Toyoshima *et al*, 2000). El extremo amino y el carboxilo terminal se localizan en el citoplasma. Las líneas en *Zig-zag* representan regiones asignadas como α -hélices. El punto marca la posición del residuo D378 fosforilado transitoriamente durante el ciclo de reacción.

En la levadura, la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática (E.C. 3.6.1.35) genera un gradiente electroquímico de protones (ácido afuera) (Perlin *et al*, 1984), el cual es empleado por la célula para el transporte de aminoácidos, iones y carbohidratos (Fig. 2) (Cartwright *et al*, 1987; Nakamoto y Slayman, 1989). Por otro lado, la actividad de la H⁺-ATPasa durante el choque térmico es importante ya que se requiere para contrarrestar la disminución del pH intracelular ocasionado por un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática a los protones (Panaretou y Piper, 1992; Coote *et al*, 1994; Viegas *et al*, 1995).

Tabla 2. Alineamiento de los aminoácidos de la H⁺-ATPasa de diferentes organismos.**

<i>Especie</i> ***	<i>Secuencia</i>
<i>K. l.</i> 1-53	MS-----AATEPTKEKPVN-----NQDSDDEDEDIDQLIEDLQSHHGLDDES-EDDEHVAAGSA
<i>S. c.</i> 1-72	MTDTSSSSSSASSVSAHQPTQEKPAKTYDD---AASESSDDDDIDALIEELQSNHGVDDESDNDGPVAAGEA
<i>N. c.</i> 1-72	MADHSAS-GAPALSTNIESGKFDEKAAEAAAYQPKKVEDDEDEDIDALIEDLESHDGHDAEE-EEEEATPGG-G
<i>S. p.</i> 1-70	MADNAGEYHDAEKHAPEQQAPPPQPAHAAA---PAQDDEPDDIDALIEELFSEDVQEEQE-DNDDAPAAGEA
<i>Z. r.</i> 1-74	MSDERITEKPPHQPESEGEPEVEEEVEEETEEVEPDEQSSSEDDDDIDGLIDELQSQEAHEEAE-EDDGPAAGEA
<i>K. l.</i> 54-128	RPVPEELLQTDPSYGLTSDEVTKRRKKYGLNQMSEETENLVFKFLMFFIGPIQFVMEAAAIIAAGLEDWVDFGVI
<i>S. c.</i> 73-147	RPVPEEYLQTDPSYGLTSDEVLKRRKKYGLNQMADEKESLVVKFVMFFVGP IQFVMEAAAIIAAGLSDWVDFGVI
<i>N. c.</i> 73-147	RVVPEDMLQTDTRVGLTSEEVQRRRKYGLNQMKEEKENHF LKF LGFFVGP IQFVMEGAAVLAAGLEDWVDFGVI
<i>S. p.</i> 71-145	KAVPEELLQTD MNTGLTMSEVEERRKKYGLNQMKEELENPF LKF IMFFVGP IQFVMEAAAIIAAGLRDWVDFGVI
<i>Z. r.</i> 75-149	RKIPEELLQTDPSVGLSSDEVNRRKKYGLNQMREESENLLVKFLMFFIGPIQFVMEAAAVLAAGLEDWVDFGVI
<i>K. l.</i> 129-203	CGLLFLNAAVGF IQEYQAGSIVDELKKT LANS AVVIR DGNLVEVPSNEVVP GDILQLEDGVVIPADGR LVTEDCF
<i>S. c.</i> 148-222	CGLLMLNAGVGFVQEFQAGSIVDELKKT LANTAVVIR DQG LVEIPANEVVP GDILQLEDGTVIPDGRIVTDCF
<i>N. c.</i> 148-222	CGLLLLNAVVG FVQEFQAGSIVDELKKT LALKAVVLRDGT LKEIEAPEVVP GDILQVEEGTII PADGRIVTDDAF
<i>S. p.</i> 146-220	CALLMLNAVVG FVQEFQAGSIVDELKKT LALKAVVIREGQVHELEANEVVP GDILKLD EGTIICADGRVVT PDVH
<i>Z. r.</i> 150-224	CGLLFLNAGVGF IQEYQAGSIVEELKKT LANTATVIR DGSVQEA PANEIVPGDILKLEDGTVIPADGR LVT EECF
<i>K. l.</i> 204-278	IQIDQSAITGESLAVDKRFGDSTFSSSTVKRGEAFMIVTATGDSTFVGR AAALVNKAAAGSGHFTEVLNGIGTIL
<i>S. c.</i> 223-297	LQIDQSAITGESLAVDKHYGDQTFSSSTVKRGE GFMVVTATGDNTFVGR AAALVNKAAGGQGHFTEVLNGIGIIL
<i>N. c.</i> 223-297	LQVDQSALTGESLAVDKHKGDQVFASSAVKRGEAFVVI TATGDNTFVGR AAALVNAASGGSGHFTEVLNGIGTIL
<i>S. p.</i> 221-295	LQVDQSAITGESLAVDKHYGDPF ASSGVKRGEGLM VVTATGDSTFVGR AASLVNAAAGGTGHFTEVLNGIGTIL
<i>Z. r.</i> 225-299	LQVDQSSITGESLAVDKHYGDEVFSSSTVKRGE GFMIVTATGDNTFVGR AASLVNAAAGGQGHFTEVLNGIGVIL
<i>K. l.</i> 279-353	LILVIVTLLLVVWVASFYRTNKIVRILRYTLAITIVGVPVGLPAVVTTTMAVGAAYLAKKQAI VQKLSAIESLAGV
<i>S. c.</i> 298-372	LVLVIATLLLVWTACFYRTNGIVRILRYTLGITIIGVVPVGLPAVVTTTMAVGAAYLAKKQAI VQKLSAIESLAGV
<i>N. c.</i> 298-372	LILVIFTLLIVWVSSFYRSNPIVQILEFTLAIT IIGVVPVGLPAVVTTTMAVGAAYLAKKQAI VQKLSAIESLAGV
<i>S. p.</i> 296-370	LVLVLLTLFCIYTAIFYRSVRLARLLEYTLAIT IIGVVPVGLPAVVTTTMAVGAAYLAEKQAI VQKLSAIESLAGV
<i>Z. r.</i> 300-374	LVLVIVTLLLIWTACFYRTVRI VPI LR YTLGIT IIGVVPVGLPAVVTTTMAVGAAYLAKKQAI VQKLSAIESLAGV
<i>K. l.</i> 354-428	EILCSDKTGTLTKNKL SLHEPYTVEGVDPDDLMLTACLAASRKKKGLDAIDKAF LKSLISYPRAKAALTKYKLE
<i>S. c.</i> 373-447	EILCSDKTGTLTKNKL SLHEPYTVEGVSPDDLMLTACLAASRKKKGLDAIDKAF LKSLKQYPAKDALTKYKLE
<i>N. c.</i> 373-447	EILCSDKTGTLTKNKL SLHDPYTVAGVDPEDLMLTACLAASRKKKGLDAIDKAF LKSLKYPRAKSVLSKYKVLQ
<i>S. p.</i> 371-445	EVLCSDKTGTLTKNKL SLGEPFTVSGVSGDDLVL TACLAASRKKKGLDAIDKAF LKALKNYPGRSMLTKYKVI E
<i>Z. r.</i> 375-449	EILCSDKTGTLTKNKL SLHEPYTVEGVSSDDLMLTACLAASRKKKGLDAIDKAF LKSLAQYPAKAGALTKYKLE
<i>K. l.</i> 429-503	FHPFDPVSKKVT AIVESPEGERIICVKGAPL FVLKTVEEHP IPEDVRENYENKVAELASRGFRALGVARKREG
<i>S. c.</i> 448-522	FHPFDPVSKKVT AVVESPEGERIICVKGAPL FVLKTVEEDHP IPEDVHENYENKVAELASRGFRALGVARKREG
<i>N. c.</i> 448-522	FHPFDPVSKKVAVVESPOGERITCVKGAPL FVLKTVEEDHP IPPEVDQAYKNKVAEFATRGRSLGVARKREG
<i>S. p.</i> 446-520	FQPFDPVSKKVTAYVQAPDGTRITCVKGAPL WVLKTVEEDHP IPEDVLSAYKDKVGD LASRGYRSLGVARKIEGQ
<i>Z. r.</i> 450-524	FHPFDPVSKKVT AVVESPEGERIICVKGAPL FVLKTVEEDHP IPEDVHENYENKVAELASRGFRALGVARKREG
<i>K. l.</i> 504-578	HWEILGVMPCMDPPRDDTAQTVNEARHLGLRVKMLTGDAVGI AKETCRQLGLGTNIYNAERLGLGGGDMPGSEL
<i>S. c.</i> 523-597	HWEILGVMPCMDPPRDDTAQTVSEARHLGLRVKMLTGDAVGI AKETCRQLGLGTNIYNAERLGLGGGDMPGSEL
<i>N. c.</i> 523-597	SWEILGIMPCMDPPRHDTYKTVCEAKTLGLS I KMLTGDAVGIARETSRQLGLGTNIYNAERLGLGGGDMPGSEV
<i>S. p.</i> 521-595	HWEIMGIMPCSDPPRHDTARTISEAKRLGLRVKMLTGDAVDI AKETARQLGMGTNIYNAERLGLTGGGNMPGSEV
<i>Z. r.</i> 525-599	HWEILGVMPCMDPPRDDTAATVNEAKRLGLSVKMLTGDAVGI AKETCRQLGLGTNIYDAERLGLGGGSMPGSEM
<i>K. l.</i> 579-653	ADFVENADGFAEVFPQH KYNVVEILQQRGYLVAMTGDGVNDAPSLKKADTGI AVEGATDAARSAADIVFLAPGLS
<i>S. c.</i> 598-672	ADFVENADGFAEVFPQH KYRVVEILQNRGYLVAMTGDGVNDAPSLKKADTGI AVEGATDAARSAADIVFLAPGLS
<i>N. c.</i> 598-672	YDFVEAADGFAEVFPQH KYNVVEILQQRGYLVAMTGDGVNDAPSLKKADTGI AVEGSSDAARSAADIVFLAPGLG
<i>S. p.</i> 596-670	YDFVEAADGFGEVFPQH KYAVVDILQQRGYLVAMTGDGVNDAPSLKKADTGI AVEGATDAARSAADIVFLAPGLS
<i>Z. r.</i> 600-674	YDFVENADGFAEVFPQH KFAVVDILQQRGYLVAMTGDGVNDAPSLKKADTGI AVEGATDAARSAADIVFLAPGLS

<i>K. l.</i> 654-728	AIIDALKTSRQIFHRMYSYVVYRIALSLHLEIFLGLWIAILNRSNLIDLVVVFAIFADVATLAIAYDNAPYSPKP
<i>S. c.</i> 673-747	AIIDALKTSRQIFHRMYSYVVYRIALSLHLEIFLGLWIAILDNSLDIDLIVFIAIFADVATLAIAYDNAPYSPKP
<i>N. c.</i> 673-747	AIIDALKTSRQIFHRMYAYVVYRIALSIHLEIFLGLWIAILNRSNLIELVVVFAIFADVATLAIAYDNAPYSQTP
<i>S. p.</i> 671-745	AIIDALKTSRQIFHRMYSYVVYRIALSLHLEIFLGLWLIIRNQLLNLELVVFAIFADVATLAIAYDNAPYSMKP
<i>Z. r.</i> 675-749	AIIDALKTSRQIFHRMYAYVVYRIALSLHLEIFLGLWIAILNHSLDIDLIVFIAIFADVATLAIAYDNAPFSPSP
<i>K. l.</i> 729-801	VKWNLRRLWGMSSVILGIILAIGTWITLTTMFVFP--KGGIIQNFSGSIDGVLFQISLTENWLIFITRAAGPFWSSI
<i>S. c.</i> 748-820	VKWNLPRLWGMSSILGIVLAIGSWITLTTMFLP--KGGIIQNFSGMNGIMFLQISLTENWLIFITRAAGPFWSSSI
<i>N. c.</i> 748-822	VKWNLPKLWGMSSVLLGVVLAIGTWITVTTMYAQGENGGIVQNFQNMDEVLFQISLTENWLIFITRANGPFWSSSI
<i>S. p.</i> 746-820	VKWNLPRLWGLSTVIGIVLAIGTWITNTTMIQAQQNRGIVQNFQVQDEVLFLEISLTENWLIFVTRCNGPFWSSSI
<i>Z. r.</i> 750-822	VKWNLPRLWGMSSIMMGIILAAGTWITLTTMFLP--KGGIIQNFSGSIDGILFLEISLTENWLIFITRAVGPFWSSSI
<i>K. l.</i> 802-875	PSWQLSGAVLIVDIIATMFCFLGWWSQNW-NDIVTVVRVWIFSFQVFCVMGGAYYMMSESEAFDRFMNGKSRDK
<i>S. c.</i> 821-894	PSWQLAGAVFAVDIIATMFTLFGWWSQNW-TDIVTVVRVWIWSIGIFCVLGGFYEMSTSEAFDRLMNGKPMKEK
<i>N. c.</i> 823-896	PSWQLSGAIFLVDILATCFTIIGWFEHSD-TSIVAVVRIWIFSFQVFCIMGGVYIILQDSVGFQDNLNMGKSPKGN
<i>S. p.</i> 821-894	PSWQLSGAVLAVDILATMFCIFGWFKGGHQTIVAVLRIWMYSFQVFCIMAGTYIILSESAGFDRMMNGKP-KES
<i>Z. r.</i> 823-896	PSWQLAGAVFVVDVVATMFTLFGWWSQNW-NDIVTVVRIYIWSIGIFCCLGGAYYLMSESETFDRLMNGKPLKEN
<i>K. l.</i> 876-899	PSGRSVEDFLMAMQRVSTQHEKEN-
<i>S. c.</i> 895-918	KSTRSVEDFMAAMQRVSTQHEKET-
<i>N. c.</i> 897-920	QKQRSLEDFVVSQRVSTQHEKSO-
<i>S. p.</i> 895-919	RNQRSIEDLVVALQRTSTRHEKQDA
<i>Z. r.</i> 897-920	KSTRSVEDFLASMRRVSTQHEKGN-

** Utilizando el programa *Multiple Sequence alignment Version 2.0*

*** *Kluyveromyces lactis* (*K.l.*), *Saccharomyces cerevisiae* (*S. c.*), *Neurospora crassa* (*N. c.*), *Schizosaccharomyces pombe* (*S. p.*) y *Zygosaccharomyces rouxii* (*Z. r.*)

La importancia de esta enzima en el metabolismo de la levadura se hace evidente por la letalidad de la eliminación del gene (*PMA1*) que codifica para la H^+ -ATPasa (Serrano *et al*, 1986).

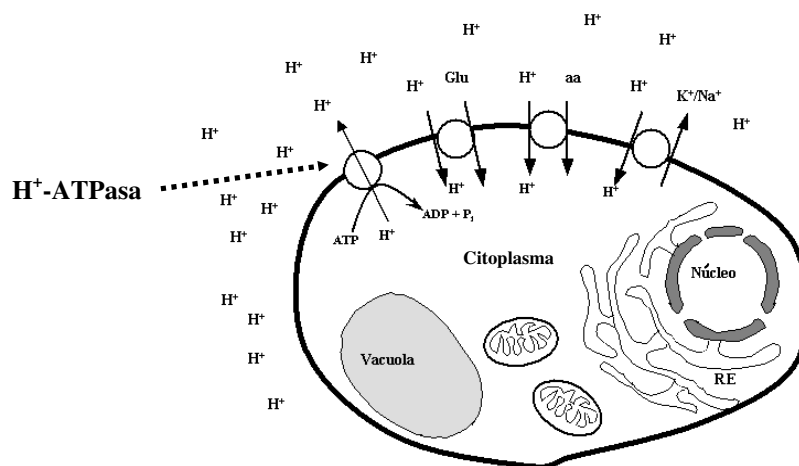


Figura 2. La H^+ -ATPasa y el transporte secundario en la levadura. Acoplamiento del gradiente de protones generado por la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática al transporte de nutrientes en la levadura. Glu, glucosa, aa, aminoácidos. (Tomado de la tesis de doctorado "Estabilización de la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de levadura por trehalosa", J.G. Sampedro, 2002)

2. ANTECEDENTES

En el año 2000, Toyoshima *et al* reportaron la estructura de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico a 2.8 Å de resolución; esta estructura muestra que la porción citoplásmica posee tres dominios: N; que contiene el sitio de unión a ATP, P; que contiene el sitio de fosforilación y A; propuesto por Toyoshima como el dominio de acción (movimiento) (Toyoshima *et al*, 2000), posteriormente Kühlbrandt (2004) propuso un modelo estructural que presentaba además un dominio de regulación, R (Fig. 3).

Para la H^{+} -ATPasa, así como para otras P-ATPasas, la estructura cuaternaria aún se desconoce (Morsomme *et al*, 2000). Sin embargo, para la H^{+} -ATPasa de *S. pombe* se han observado octámeros y decámeros después de la solubilización con detergentes (Morsomme *et al*, 2000), mientras que la enzima de *N. crassa* forma hexámeros estables (Chadwick *et al*, 1987; Cyrklaff *et al*, 1995). En contraste, la inactivación por radiación de la H^{+} -ATPasa de *N. crassa* en la membrana plasmática intacta muestra un tamaño de 230 kDa; un valor cercano al del dímero (Bowman *et al*, 1985). Por otro lado, se ha observado hidrólisis de ATP y bombeo de protones en monómeros de la misma enzima de *N. crassa* (Goormaghtigh *et al*, 1986). Es claro por lo tanto, que el monómero de 100 kDa es totalmente funcional, sin embargo, la estructura cuaternaria en la célula aún está por resolverse.

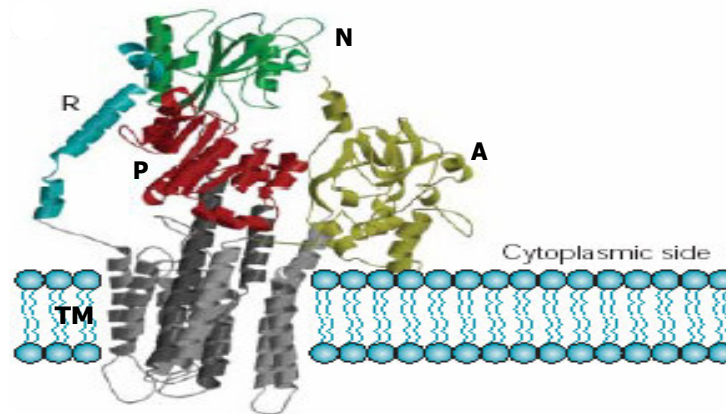


Figura 3. Modelo estructural propuesto para la H^{+} ATPasa de *N. crassa* basado en la estructura cristalina de la Ca^{2+} -ATPasa del Retículo Sarcoplásmico (Kühlbrandt, 2004). Dominios: A, acción; P, fosforilación; N, de unión a ATP; R, regulación; TM, transmembranal.

El ciclo catalítico de la H^+ -ATPasa involucra la alternancia entre dos estados conformacionales distintos, tradicionalmente llamados E_1 y E_2 o E y E^* (Fig. 4), que se diferencian por su sensibilidad a proteasas y anticuerpos (Nakamoto y Slayman, 1989). Los cambios conformacionales de la enzima permiten unir e hidrolizar el ATP, unir al protón, transportarlo a través de la membrana y liberarlo al exterior de la levadura (Fig. 2 y 4) (Nakamoto y Slayman, 1989). Aunque los estudios estructurales de las P-ATPasas se han realizado principalmente en las enzimas de mamíferos, se han desarrollado recientemente trabajos de ingeniería genética en la enzima de levadura enfocados a establecer el papel funcional de cada residuo (Morsomme *et al*, 2000).

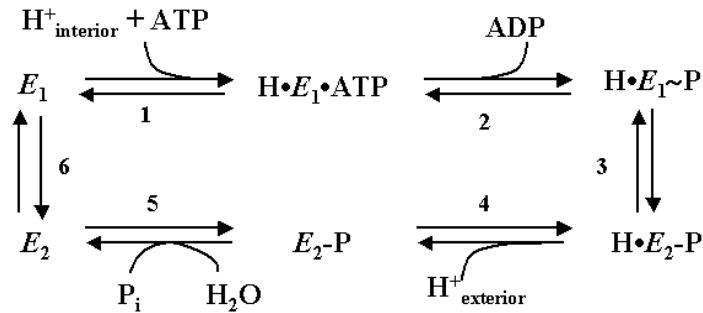


Figura 4. Ciclo catalítico propuesto para la H^+ -ATPasa de la membrana plasmática de levadura (Nakamoto y Slayman, 1989).

2.1 Las proteínas y la trehalosa

La trehalosa es un disacárido no reductor distribuido ampliamente en la naturaleza, que ha sido estudiado intensamente debido a la estrecha relación entre su acumulación y la resistencia celular al estrés (Parrou *et al*, 1997). Se ha propuesto como un agente protector contra el estrés por deshidratación (Crowe *et al*, 1987); pocos años después se observó protección contra el choque térmico (Hottiger *et al*, 1987a) y, más recientemente, a la osmotolerancia y al estrés oxidativo (Sharma, 1997; Benaroudj *et al*, 2001).

Además, se han reportado nuevos efectos de la trehalosa en la función de ciertas proteínas (HSP) enfocados a explicar la rápida movilización del disacárido después del periodo de estrés (Singer y Lindquist, 1998a y 1998b).

Actualmente, se sabe que las proteínas son moléculas dinámicas que llevan a cabo cambios conformacionales para alcanzar el estado de transición en determinados procesos o reacciones como por ejemplo en el plegamiento y la catálisis (Frauenfelder *et al*, 1988; Demchenko *et al*, 1989). En enzimas, particularmente, se ha propuesto una estrecha relación entre los cambios conformacionales observados y la función (Barth y Zscherp, 2000), por lo que frecuentemente se han analizado por diferentes medios las estructuras de los estados conformacionales (Haran *et al*, 1992). Sin embargo, algunos aspectos aún están sin resolver, por ejemplo: la cinética de los cambios conformacionales, la relación química del sustrato con la estructura de la proteína en cada estado, la topología de los estados y la relación mecánica entre dominios estructurales.

2.2 La dinámica estructural de las proteínas.

En enzimas, la estructura tridimensional fluctúa entre diferentes conformaciones para llevar a cabo la catálisis (Ishima y Torchia, 2000; Frauenfelder *et al*, 2002). Se ha demostrado que las fluctuaciones estructurales pueden ser inhibidas por cambios en las condiciones del medio (Cordone *et al*, 1998). Se propuso que tanto las fuerzas que mantienen la estructura nativa como las que generan o incrementan las fluctuaciones estructurales están involucradas en la estabilidad de las proteínas; además se ha sugerido que la magnitud de las fluctuaciones es el origen de la desnaturalización de las proteínas (Butler y Falke, 1996); es decir cuanto más grande sea la magnitud de las fluctuaciones más fácilmente se desestabilizan las proteínas (Haouz *et al*, 2001). Sin embargo se ha reportado que la estructura proteica puede ser modificada para optimizar su función (Fields, 2001)

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Hasta ahora, solo se ha logrado secuenciar y clonar el gene que codifica para la H⁺-ATPasa de membrana plasmática, además, se ha obtenido la topología de la enzima de levadura basada en la cristalografía bi- y tridimensional de ATPasas relacionadas, sin embargo, su estructura cuaternaria aún se desconoce. Por otra parte, se sabe que el aislamiento de las enzimas de membrana es una tarea compleja, especialmente en las P-ATPasas no se ha reportado una metodología que permita obtener estas proteínas con alta pureza; por ello en este estudio pretendemos mejorar el método de purificación de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática, lo que a su vez nos permitirá conocer su estructura y cinética de hidrólisis de ATP en diferentes estados oligoméricos y si éstos últimos poseen un papel en la actividad catalítica y en la estabilidad estructural.

4. JUSTIFICACIÓN

La H⁺-ATPasa de membrana plasmática es una enzima que la célula utiliza para energizar el transporte secundario de nutrientes hacia el interior de la célula; nutrientes necesarios para el metabolismo celular. La actividad de esta bomba primaria es vital ya que su ausencia o bien su mal funcionamiento ocasiona la muerte celular; esto debido principalmente a la incapacidad de la célula de transportar o tomar los nutrientes presentes en el medio.

Existen reportes de diversas patologías relacionadas a la falta de actividad de algunas P-ATPasas, como es el caso del aumento en la severidad de la gastritis auto-inmune por la producción de autoanticuerpos contra la bomba gástrica H⁺,K⁺-ATPasa (Bergman *et al*, 2005) y el desarrollo de anemia perniciosa (Burman *et al*, 1991). Por otro lado, se ha observado que en la desnutrición se presenta un efecto sobre la oxidación de acetato debido a que se modifica la actividad de Na⁺,K⁺-ATPasa (Schweigert *et al*, 2004).

Además, la deficiencia de magnesio en la dieta conduce a alteraciones en el metabolismo, la utilización de glucosa, la síntesis de proteínas y la síntesis de grasa; todo esto por la interrupción en las funciones de las P-ATPasas (Gums, 2004).

Por otra parte, se ha observado que la alcalosis, la insulina y los agonistas β -2 pueden provocar hipopotasemia al estimular la actividad de la Na^+, K^+ ATPasa, en otro caso, en el síndrome de Liddle, la acumulación de sodio en la célula, provoca la estimulación de la actividad de la Na^+, K^+ ATPasa, lo que lleva a una secreción alta de potasio (Shills, 2002)

El transporte de calcio inducido por la vitamina D, también parece requerir la activación de bombas de ATP dependientes de calcio para efectuar la expulsión de calcio contra un gradiente electroquímico en el plasma. Las capacidades relativas de fijación de calcio por el enterocito son borde de cepillo=1, calbindina=4 y la bomba de calcio dependiente de ATP=10, con las cuales hay transferencia unidireccional de calcio (Wasserman et al, 1992)

El retículo sarcoplásmico con sus bombas Ca^{2+} -ATPasa es la principal poza de calcio intracelular que alberga proteínas fijadoras de calcio importantes en el metabolismo de este elemento, ya que la acumulación de calcio en el citosol podría conducir a la muerte celular, debido a que provocaría la precipitación del fosfato (vital en la transferencia de energía).

Por lo anterior, se comprende que es muy importante conocer la estructura, función y estabilidad de las P-ATPasas en general y de la H^+ -ATPasa en particular, incluyendo su estado oligomérico nativo.

5. OBJETIVOS

Objetivo General:

Identificar y caracterizar los estados oligoméricos de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática de levadura *Kluyveromyces lactis*.

Objetivos Específicos:

1. Obtener la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de la levadura *K. lactis* con una pureza de 90-95%.
2. Determinar los diferentes estados oligoméricos de la H⁺-ATPasa.
3. Estudiar los parámetros cinéticos (V_{max} , $S_{0.5}$ y No. de Hill) de la H⁺-ATPasa en sus diferentes estados oligoméricos.
4. Analizar el espectro de fluorescencia y grado de afinidad por sustrato en los oligómeros de la H⁺-ATPasa.

6. METODOLOGÍA

6.1 Purificación de las membranas plasmáticas de levadura

Se realizó un precultivo sembrando una asada de la levadura *Kluyveromyces lactis* WM27 en 100 mL de medio YPD y se dejó incubando durante 25 h a 30°C con agitación constante a 250 rpm, posteriormente se inocularon 2 mL del precultivo en matraces Erlenmeyer con 1 L de YPD para su incubación a 30°C durante 20 h con agitación constante a 250 rpm. Las células se cosecharon por centrifugación a 5,000 rpm durante 5 min a 4°C en una centrífuga Sorvall RC 5B *Plus* y el pellet se resuspendió con agua desionizada para volver a centrifugar a 5,000 rpm durante 5 min a 4°C. Se determinó la cantidad de biomasa (de levadura) obtenida por diferencia de peso para resuspender en amortiguador sorbitol 1M pH 7.0 (20 mL por cada 4 g de levadura) y se adicionó 1µL de β-mercaptoetanol por cada 1 mL de amortiguador de sorbitol empleados, para resuspender la biomasa e incubar a 30°C por 10 min con agitación manual con ayuda de una varilla de vidrio. Posteriormente, se adicionó la enzima Zymoliasa 20T (50 U por cada gramo de levadura) para la obtención de esferoplastos y se incubó a 30°C con agitación cada 10 ó 15 min, midiendo la absorbencia a 660 nm en el espectrofotómetro Beckman-BU 50 de una alícuota de 50 µL de la muestra diluida en 3 mL de agua. Esta determinación se realizó desde antes de la adición de la enzima (t_0) y luego cada 15 min hasta que la lectura de la absorbencia fue de 0.1-0.2 (el tiempo aproximado fue de 2 h). Después se colocaron 40 mL de la solución de levaduras en un vaso de precipitados, manteniendo la muestra en hielo y se le agregaron 40 µL de la solución de PMSF 1M (recien preparada) y se realizó la sonicación de la muestra (pulsos de 15s de sonicación por 15s de descanso) por un tiempo de sonicación total de 1 min utilizando el equipo Branson Sonifier 250. Posteriormente se centrifugó la muestra a 3,500 rpm por 10 min a 4°C luego se descartó el precipitado y el sobrenadante se centrifugó a 12,000 rpm por 30 min a 4°C decantando el sobrenadante cuidadosamente, de tal forma que no se contaminara con las mitocondrias (que están presentes en el precipitado). Enseguida se centrifugó el sobrenadante a 18,000

rpm por 45 min a 4°C en el rotor 45-Ti de la ultracentrífuga Beckman XL-100K refrigerada, luego se descartó el sobrenadante para resuspender el precipitado con un volumen pequeño de EGTA 2 mM pH 7.2, utilizando un pincel de cerdas suaves. Se recolectaron todas las muestras y se ajustó en volúmen a 550 mL con amortiguador EGTA 2 mM pH 7.2. Este homogenizado se centrifugó a 18,000 rpm por 60 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante, recuperando el precipitado el cual se resuspendió en un volumen mínimo de EGTA 2 mM pH 7.2, utilizando para la resuspensión un pincel de cerdas suaves. Por ultimo se llevó acabo la recolección de las membranas plasmáticas colocando todas las muestras en un tubo falcon de 50 mL. Se determinó el volumen total, luego se tomó una alícuota de 20 µL que se agregó a 180 µL de EGTA 2 mM pH 7.2. Esta mezcla se utilizó para determinar proteína por el método de Lowry *et al* (1951) y actividad mediante un ensayo acoplado a enzimas; utilizando 20 µL para la determinación de proteína y 5 µL para la determinación de actividad. Todas las muestras se almacenaron a -72°C hasta su uso.

6.2 Purificación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática

La H⁺-ATPasa se purificó de las membranas plasmáticas de acuerdo al método empleado por Bowman *et al* (1981) y modificado por Guerra *et al* (1995), como se muestra en el diagrama de la figura 5. Las membranas plasmáticas se diluyeron a 2 mg/mL en amortiguador A y desoxicolato (0.1% p/v). La mezcla se incubó con agitación constante por 10 min a 4°C y después se centrifugó a 100,000g por 1 h a 4°C en el rotor 60-Ti de la ultracentrífuga. El paquete se resuspendió en menos de 10 mL de amortiguador B y se determinó la concentración de proteína. Posteriormente, se ajustó la concentración de proteína a 5 mg/mL empleando el amortiguador B y se adicionaron: azolectina (5 mg/mL) y zwittergent 3,14 (0.85 p/p, zwittergent/proteína). La suspensión se homogenizó y se centrifugó a 100,000g por 1 h a 4°C. El sobrenadante se colocó cuidadosamente en un gradiente discontinuo de trehalosa formado por alícuotas de 4 mL de 30, 35, 40, 45, y 50% de trehalosa (p/v) en Tris 10 mM, pH 7.0, EDTA 1 mM, 0.1% de

desoxicolato y asolectina 1 mg/mL) y se centrifugó a 100,000g por 14 h a 4°C. La H⁺-ATPasa se recolectó de la fracción de 45% de trehalosa, se diluyó 1:2 con EGTA 2 mM pH 7.2 y se centrifugó a 100,000g por 3 h. El paquete fue resuspendido en un pequeño volumen de EGTA 2 mM pH 7.2 y se almacenó a una temperatura de –70°C hasta su uso. En un gel de SDS-PAGE se determinó la presencia de la H⁺-ATPasa correspondiente a una banda de aproximadamente 100,000 M_r (≅ 90-95 % de la proteína total).

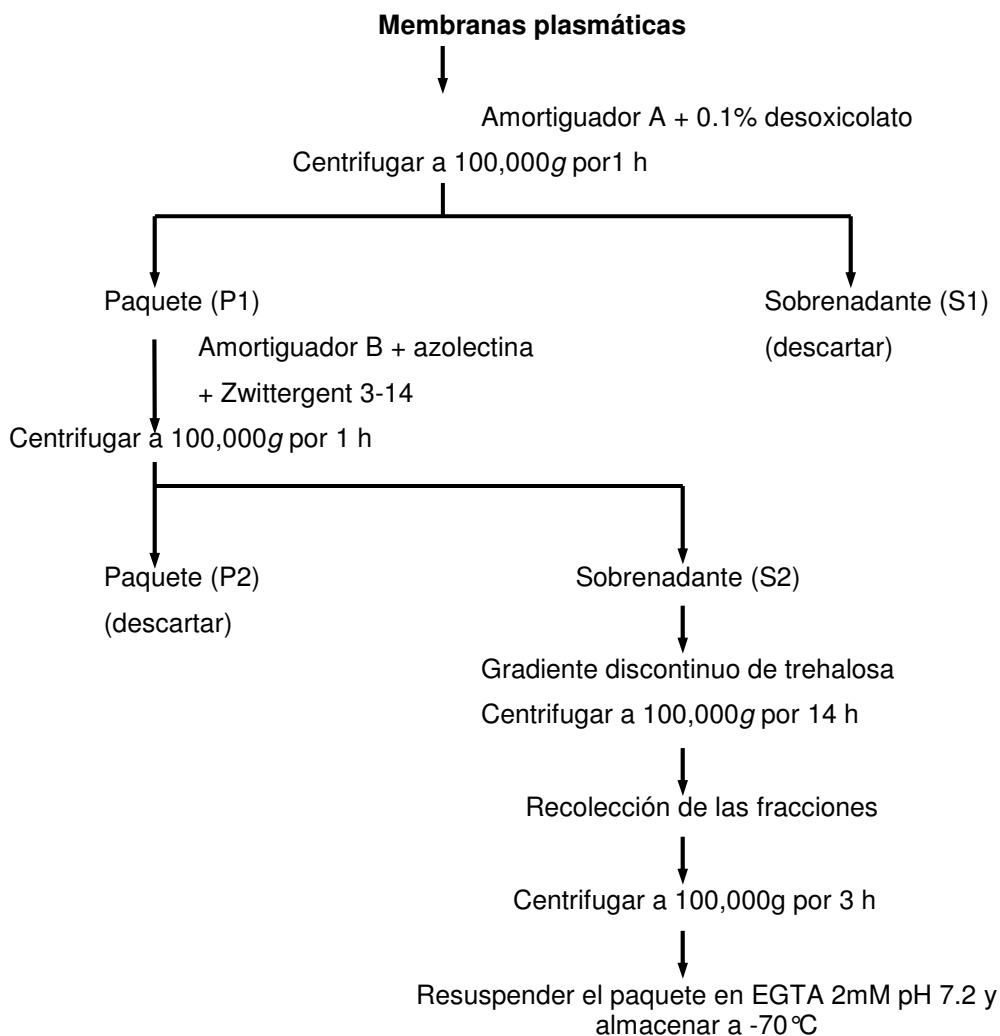


Figura 5. Diagrama de flujo de la purificación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de *K. lactis*.

6.3 Determinación de concentración proteica por el método de Lowry

El método de Lowry *et al* (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de proteínas. Las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin - Ciocalteu para dar un complejo de color azul, debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína. La intensidad del color depende del número de aminoácidos aromáticos presentes y enlaces peptídicos y varía según la concentración de proteína, según la ley de Lambert-Beer.

Se construyó una curva estándar de una solución de albúmina sérica bovina (stock de 1 mg/mL), tomando diferentes volúmenes (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 y 80 μ L). A partir de ésta se realizó la determinación de concentración proteica en 20 μ L de cada muestra agregando 40 μ L de desoxicolato y 2.5 mL de Solución C, luego de agitar se dejó en reposo durante 10 min para posteriormente agregar 0.25 mL de Solución D y después de 30 min se leyó la absorbencia en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2401PC a 660 nm, estos datos se analizaron por regresión no lineal y se determinó la concentración de proteínas en las muestras, expresando el resultado en mg/mL.

6.4 Medición de la actividad catalítica de la H⁺-ATPasa (Ensayo acoplado a enzimas)

La curva de saturación de ATP de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática se evaluó como se ha descrito para la Ca²⁺-ATPasa del retículo sarcoplásmico (Vrbjar *et al*, 1990) empleando el ensayo descrito por Anderson y Murphy (1983). La mezcla de reacción consistió en Pipes 10 mM, pH 7.0, KCl 80 mM, azida de sodio 5 mM, fosfoenolpiruvato 5 mM, NADH 200 μ M, 45 IU de piruvato cinasa, 10U de lactato deshidrogenasa y MgCl₂ 5 mM. Concentraciones crecientes de ATP se incluyeron como se indica en cada figura. El volumen final fue de 2 mL. La temperatura de ensayo fue de 30°C en la cual se equilibró la mezcla de reacción por 10 min antes de la adición de la enzima (en la cantidad dependiente de la concentración como se indica en cada figura). La absorbencia del NADH se registró continuamente a 340 nm en el espectrofotómetro Shimadzu con control de temperatura. Las velocidades

iniciales de hidrólisis de ATP se calcularon del valor de la pendiente empleando un coeficiente de absorción molar para el NADH de $6,200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Anderson y Murphy, 1983). La hidrólisis de ATP se expresa como $\mu\text{moles de ATP mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

6.5 Electroforesis en Geles de poliacrilamida

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional (Bollag *et al*, 1996). Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa (tamaño y forma), cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración.

En función del estado de las proteínas (nativo o desnaturizado), la electroforesis (PAGE=Polyacrylamide Gel Electrophoresis) se clasifica en nativa y en desnaturizante.

- Una electroforesis desnaturizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturizante más empleado es el dodecilsulfato de sodio (SDS); un detergente.
- Una electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos. El sistema amortiguador empleado en este caso es tris-glicina (rango de pH 8.3 a 9.5)

6.5.1 Electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE)

Se realizó un SDS-PAGE usando 10% de acrilamida en una cámara de electroforesis Mini Protean II, en la que se agregó la solución del gel separador y luego la del concentrador (colocando un peine de 5 pozos), las cuales se prepararon previamente en tubos de ensaye. Para la solución del gel separador se utilizaron 2.5 mL de una solución 30% de acrilamida/bisacrilamida, 0.95 mL de amortiguador tris base 0.3 M pH 8.8, 3.9 mL de agua, 200 μ L de SDS al 10% y por último 5 μ L de TEMED y 50 μ L de persulfato de amonio al 10%. La solución para gel concentrador se preparó con 0.4 mL de una solución 30% de acrilamida/bisacrilamida, 0.5 mL de amortiguador tris base 0.5 M pH 6.8, 1.8 mL de agua, 200 μ L de SDS al 10% y por último 5 μ L de TEMED y 50 μ L de persulfato de amonio al 10%.

Para la preparación de la muestra se calculó el volumen necesario para tener una cantidad de 40 μ g de proteína y se agregó el mismo volumen de amortiguador de muestra. La mezcla se incubó durante 10 min a 30°C, para posteriormente colocarlas en los pozos del gel. Una vez hecho esto, se corrió a 50 V durante 45 min y luego a 100 V 15 mA por 2 h aproximadamente hasta que el frente de corrimiento llegara al final del gel.

6.5.2 Electroforesis nativa en geles azules (BN-PAGE)

El uso de geles de poliacrilamida que tienen un gradiente creciente de concentración de acrilamida (en consecuencia un gradiente decreciente en el tamaño de poro) puede tener ventajas sobre los geles de concentraciones uniformes de acrilamida. Generalmente los gradientes se establecen entre el 3 y el 30% de acrilamida en gradientes lineales o cóncavos. El rango a emplear dependerá del tamaño de las proteínas a separar. En un gel en gradiente la proteína migra hasta que alcanza una zona donde el tamaño de poro impide cualquier avance.

Una vez que se alcanza el “límite de poro” no se produce una migración apreciable aunque no se detiene completamente. Una de las ventajas de este tipo de geles es que resuelve mejor las bandas pues las concentra en regiones muy estrechas. Otra es que incrementa el rango de pesos moleculares que se pueden resolver en un mismo gel comparado con los de una concentración fija. Además la adición de azul de Coomassie a la muestra y su unión a las proteínas genera una carga negativa y le dá movilidad a las proteínas en un campo electroforético (Schägger y Von-Jagow, 1991). De esta forma, se logra conservar la integridad de los complejos proteicos, pero se promueve su separación por tamaño en el campo electroforético.

Se realizó un BN-PAGE de 5 – 12% en una cámara de electroforesis Mini Protean II, en la que se preparó el gel separador utilizando un formador de gradientes con dos cilindros separados uno para alta concentración de acrilamida (15%) y otro para baja concentración (5%), el cual se colocó sobre un agitador magnético en una plataforma ajustable de modo que la salida del formador de gradientes estuviera arriba de 20 cm de las placas de vidrio. Para la solución de alta concentración de acrilamida se agregaron 0.87 mL de una solución de acrilamida 48.5% y bis-acrilamida 1.5%, 1.17 mL de amortiguador 3x, 1 mL de glicerol 80%, 0.44 mL de agua destilada, 6 µL de TEMED y 18 µL de persulfato de amonio al 10%. La solución de baja concentración consistió en: 0.36 mL de una solución de acrilamida 48.5% y bis-acrilamida 1.5%, 1.17 mL de amortiguador 3X, 0.25 mL de glicerol 80%, 1.7 mL de agua destilada, 6 µL de TEMED y 18 µL de persulfato de amonio al 10%. Una vez polimerizado se colocó un peine de 5 pozos y se agregó la mezcla para el gel concentrador al 4% (0.25 mL de una solución de acrilamida 48.5% y bis-acrilamida 1.5%, 1.0 mL de amortiguador 3X, 1.75 mL de agua destilada, 6 µL de TEMED y 18 µL de persulfato de amonio al 10%). Posteriormente se colocó en la cámara de electroforesis con los amortiguadores del cátodo y del ánodo, manteniendo la temperatura a 4°C hasta que se cargaran las muestras para evitar la desnaturalización enzimática.

Para la preparación de la muestra se calculó el volumen necesario para tener una concentración de 4 µg de proteína de cada pico obtenido de la cromatografía en columna y se ajustó a 100 µL agregando el volumen necesario de amortiguador de muestra, con 0.1% de dodecil-maltósido y 0.025% de una solución de azul de Coomassie. En el pozo No. 1 se cargaron 10 µL de estándares para geles nativos de una dilución 1:50, utilizando una jeringa Hamilton. Se cargaron también las muestras en los otros pozos de gel y se corrió en una cámara de electroforesis a 4°C en 2 pasos: al primero a 100 V 15 mA durante 20 min y luego a 250 V 15 mA por 1 h 20 min.

6.6 Tinción de geles de poliacrilamida

6.6.1 Tinción con Azul de Coomassie

Este método es sencillo, rápido y puede detectar hasta 0.1 µg de proteína por banda. El método de tinción a elegir entre Azul de Coomassie ó Tinción de plata depende de la sensibilidad deseada.

Se utilizaron guantes para evitar transferir huellas dactilares al gel, que pudieran afectar la sensibilidad en la tinción. Se sumergió el gel en una cantidad suficiente de solución para teñir (20 mL aproximadamente) con agitación moderada y constante durante por lo menos 20 min, teniendo cuidado de no romperlo. Posteriormente se retiró esta solución y se enjuagó con 2 ó 3 cambios de agua para enseguida agregar la solución desteñidora (aproximadamente 50 mL), cambiando la solución las veces que fuera necesario hasta visualizar las bandas claramente y un fondo desteñido. De aquí se colocó el gel en agua para conservarlo.

Para desteñir completamente, se mantuvo en solución desteñidora y con agitación moderada durante toda la noche. Este último paso solo fue necesario en el caso de BN-PAGE cuando se utilizó tinción doble para proceder enseguida con la tinción de plata.

6.6.2 Tinción de plata

Este método de tinción puede detectar cantidades tan pequeñas como 2 ng de proteína por banda (Giulian *et al*, 1983)

Utilizando guantes para manipular el gel sin dejar huellas dactilares que pudieran afectar la sensibilidad, se le colocó en una solución de 50% de metanol y 10% de ácido acético durante más de una hora, e incluso durante toda la noche, cambiando la solución por lo menos 3 veces. De la misma manera se enjuagó durante 30 min con 3 cambios de agua, enseguida se sumergió en solución C durante 15 min con agitación constante y moderada, enjuagando posteriormente durante 2 min para después revelar en solución D, y una vez que aparecieron las bandas (cerca de los 5 min), se detuvo la reacción enjuagando en ácido acético al 1%. Por último se sumergió el gel en agua por más de una hora, con 3 cambios de agua y este medio también sirvió para almacenarlo.

6.7 Densitometría

Se midió la intensidad de las bandas observadas en la fracción de 45% de trehalosa obtenida en la sección 6.2 en el gel desnaturizante por medio de densitometría. Se obtuvo la imagen fotográfica del gel en el equipo Alpha Innotech (USA) y ésta se analizó con el programa Alpha Digi Doc RT2. El parámetro que se empleó para el análisis fue el número de píxeles correspondientes a cada una de las bandas, expresando el resultado en porcentaje.

6.8 Cromatografía en Columna

La cromatografía es la técnica que separa una mezcla de solutos basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual es sólida en este caso (Bollag *et al*, 1996). Para la cromatografía en columna se utiliza un tubo cilíndrico, en cuyo interior se coloca la fase estacionaria y a través de él se hace pasar la fase móvil. El flujo de la fase móvil

a través de la estacionaria se consigue: 1) por presión, 2) por capilaridad, 3) por gravedad.

Se utilizó amortiguador MES-KOH 20 mM pH 6.5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 1 mM, dodecilmaltósido 0.05% y glicerol al 10% filtrado y degasificado para empacar y equilibrar una columna de 11/500 mm con Superosa 6 (Amersham-Biosciences) y posteriormente se reguló la velocidad de flujo a 0.3 mL/min, utilizando una bomba peristáltica y se cargó la H⁺-ATPasa en una dilución 1:1.5 (100 µL de enzima y 50 µL de amortiguador de elución MES) y se recolectaron 72 fracciones de 0.9 mL. Todo esto se llevó a cabo a 4°C y posteriormente se leyó la absorbencia de cada una a 280 nm en el espectrofotómetro Shimadzu.

6.9 Apagamiento de la fluorescencia de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática.

Se llevó a cabo incubando la enzima (3.22 µg de proteína en 2 mL) a 25°C en amortiguador de fosfato de potasio 20 mM, pH 6.8 y MgCl₂ 5 mM. El espectro de fluorescencia se midió entre 310 – 405 nm con una longitud de onda de excitación a 275 nm en un espectrofluorómetro Shimadzu RF5300 y se prepararon soluciones madre de ADP y AMP-PCP (análogo de ATP) que se adicionan gradualmente (como se indica en cada figura) realizándose un barrido de fluorescencia cada minuto antes de la adición del nucleótido, hasta alcanzar la estabilidad (aproximadamente a los 6 min) y después de cada adición.

6.10 Análisis de datos:

La velocidad de hidrólisis de ATP (que se determinó de la pendiente dada por la absorbencia de la oxidación del NADH), se graficó contra la concentración de sustrato y los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación de Hill (Ec. 1) por regresión no lineal y utilizando el programa iterativo Microcal™ Origin 6.0® (Northampton, MA), como se describe antes (Sampedro *et al*, 2002).

$$v = \frac{V_{\max} \cdot S^n}{S_{0.5}^n + S^n} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde v es la velocidad inicial, V_{\max} es la velocidad máxima, S es la concentración de sustrato, $S_{0.5}$ es la concentración de sustrato donde $v=0.5V_{\max}$ y n es el número de Hill.

La disminución en la fluorescencia de la H⁺-ATPasa inducida por la presencia de AMP-PCP y ADP fue analizada graficando la fluorescencia en estado estacionario contra la concentración de nucleótido. Los datos de fluorescencia fueron ajustados a la ecuación 2 por regresión no lineal, utilizando el programa iterativo Microcal™ Origin 6.0® (Northampton, MA) como se describe para otros nucleótidos unidos a proteínas (Liu y Sharom, 1997). La ecuación 2 describe la interacción de sustrato con un solo sitio de unión.

$$(F_0 - F) = \frac{\Delta F_{\max} \cdot S}{K_d + S} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde ΔF representa el cambio en la intensidad de la fluorescencia en el estado estacionario de la ausencia F_0 a la presencia F de una concentración dada de nucleótido S . ΔF_{\max} es el cambio máximo en la intensidad de la fluorescencia en el estado estacionario inducida por la unión del sustrato, y K_d es la constante de disociación.

7. RESULTADOS

7.1 Purificación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de *Kluyveromyces lactis*

Se modificó ligeramente el método de purificación de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de *K. lactis*. Esencialmente se usó el método empleado por Bowman *et al* (1981) y modificado por Guerra *et al* (1995) pero se utilizó además un gradiente discontinuo de trehalosa (Fig. 5). En un gel de SDS-PAGE se determinó la presencia de la H⁺-ATPasa correspondiente a una banda de aproximadamente 100 kDa, mostrando en cada carril las fracciones recolectadas a cada concentración de trehalosa (30, 35, 40 y 45% respectivamente). Las fracciones obtenidas con 30 y 35% de trehalosa muestran varias bandas contaminantes (Fig. 6, Carriles 1 y 2). En el carril tres, se observa que la banda de la H⁺-ATPasa es casi tan pura como en el cuatro, aunque se nota una banda de peso ligeramente menor a la H⁺-ATPasa (Fig. 6, carril 3). En la fracción de 45% de trehalosa se observó que la banda de la H⁺-ATPasa eluyó con una alta pureza (de 90.4%, determinada por densitometría), lo que es una mejora notable con respecto a lo obtenido con el método original (Fig. 6, carril 4); esta fracción es la que se utilizó en todos los experimentos posteriores.

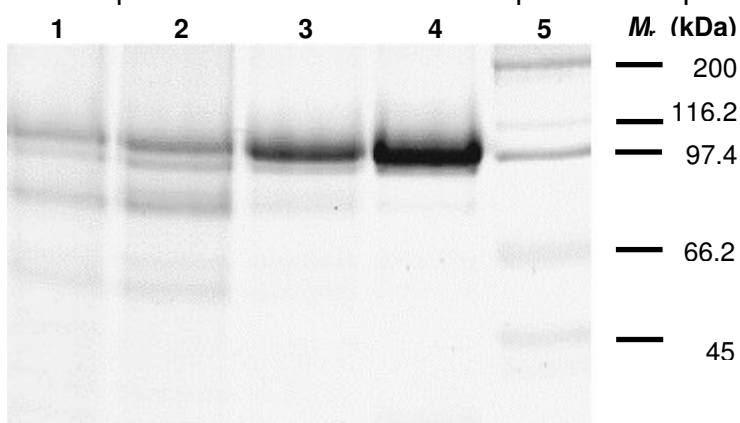


Figura 6. SDS PAGE de H⁺-ATPasa aislada de membrana plasmática de *K. lactis*. Las diferentes fracciones se obtuvieron por centrifugación en un gradiente discontinuo de trehalosa. Para teñir el gel, se utilizó la tinción de Coomassie como se describe en la metodología. Carril 1, Fracción de trehalosa 30%; Carril 2, Fracción de trehalosa 35%; Carril 3, Fracción de trehalosa 40%; Carril 4, Fracción de trehalosa 45%; Carril 5, estándares de peso molecular: Miosina (200,000), β-galactosidasa (116,250), fosforilasa B (97,400), albúmina sérica (66,200) y ovalbúmina (45,000). En los carriles 1-4, la proteína H⁺-ATPasa de membrana plasmática corresponde a M_r de 100,000.

7.2. Determinación de la estructura oligomérica de la H⁺-ATPasa

Para separar los agregados de proteína, se utilizó una cromatografía por exclusión molecular. Se usó una columna de Superosa 6 utilizando n-dodecil β-D-maltósido como detergente solubilizador, en base a lo reportado por Morsomme *et al* (2002). Se observó que se eluyeron dos picos de proteína (Fig. 7A), el pico I comprendió las fracciones 13 a 20 con un pico máximo en la fracción 16 (absorbencia de 1.08), la cual corresponde también a la fracción con mayor actividad (Pico 1, Fig. 7B). Por otra parte, el pico II incluyó las fracciones 21 a 28 con un máximo en la fracción 23 (absorbencia de 0.73) que sin embargo mostró una actividad baja, respecto a la fracción número 21 que presentó la mayor actividad en este segundo pico (Fig. 7B).

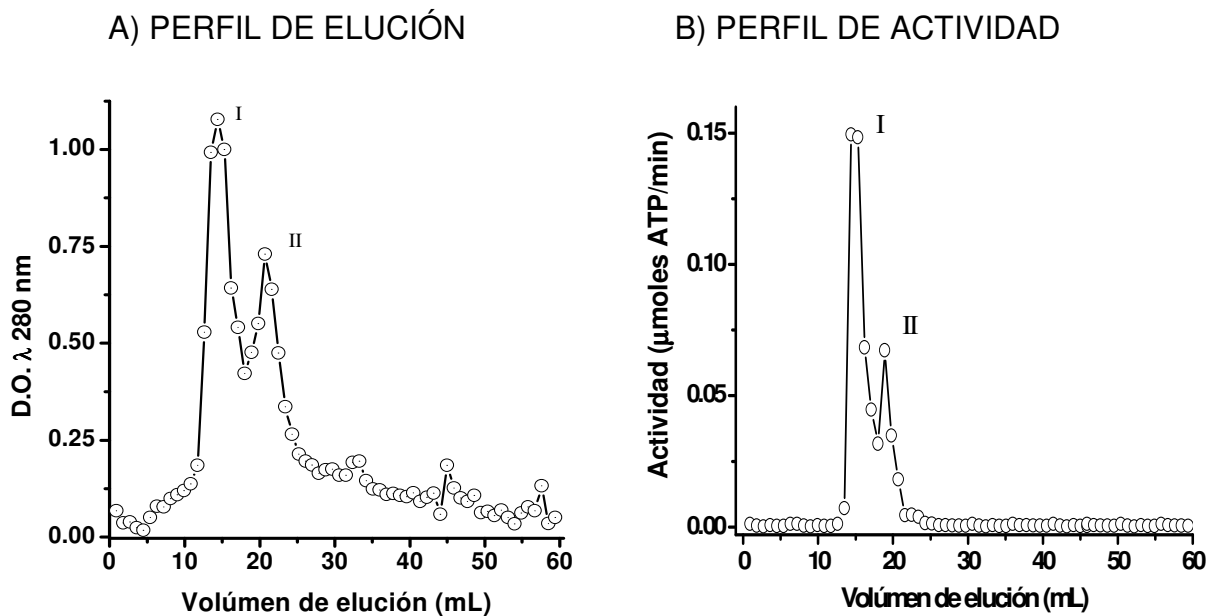


Figura 7. Cromatografía por exclusión molecular de la H⁺-ATPasa aislada de membrana plasmática de *K. lactis*. **A)** Perfil de elución: Los agregados de proteína fueron separados utilizando una columna de Superosa 6 como se describe en la metodología. El perfil de elución muestra principalmente dos picos máximos de absorbencia (I y II) a 280 nm. **B)** Perfil de actividad: Para la determinación de la actividad se utilizaron 75 μL de cada fracción y la velocidad de reducción de NAD⁺ se leyó a 340 nm como se describe en la metodología.

7.3 Identificación de los estados oligoméricos de la H⁺-ATPasa obtenida.

Para determinar los estados oligoméricos de la H⁺-ATPasa se utilizó la electroforesis en geles nativos de poliacrilamida en gradiente (BN-PAGE), como lo describen Schägger y Von-Jagow (1991) y con una modificación en la preparación del amortiguador 3x, en el cual se utilizó trehalosa 0.3 M en vez de ácido aminocaproico, para favorecer la conservación de la estructura cuaternaria (Sampedro *et al*, 1998). Cuando se usó trehalosa en lugar de ácido aminocaproico se observó que el pico I mostraba una sola banda con un peso aproximado de 600 kDa, lo cual sería compatible con una estructura de hexámero (Fig. 8, Carril 2). En contraste, cuando se hizo la electroforesis del pico II de la cromatografía, se identificaron varias bandas con pesos moleculares aproximados de 600 kDa, 400 kDa, 200 kDa y 100 kDa, lo que sugiere que este pico contenía una mezcla de hexámero, tetrámero, dímero y monómero (Fig. 8, Carril 3) por lo que se decidió estudiar las características de cada pico.

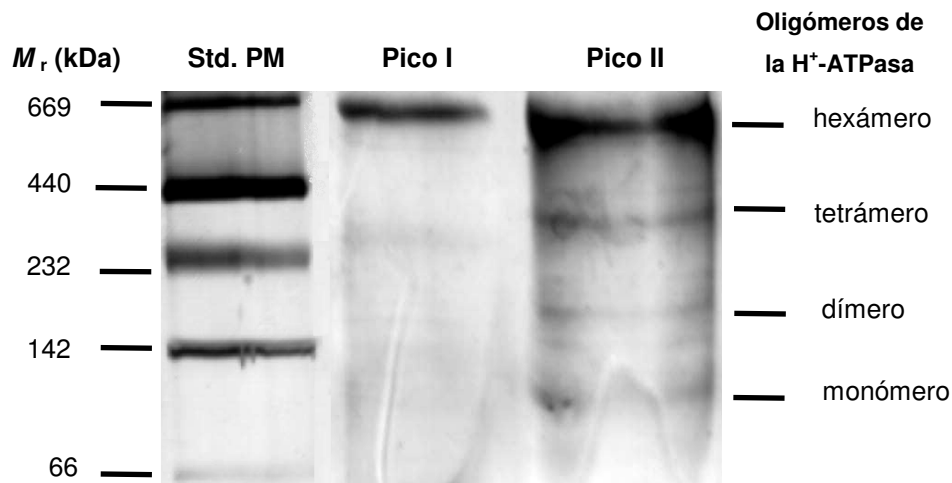


Figura 8. BN-PAGE análisis de los diferentes estados oligoméricos de H⁺-ATPasa. Para teñir el gel, se utilizó la tinción doble (con Coomassie y luego tinción de plata) como se describe en la metodología. Carril 1, estándares de peso molecular: tiroglobulina (669,000), ferritina (440,000), catalasa (232,000), lactato deshidrogenada (140,000) y albúmina sérica (66,000). Los carriles 2 y 3 contienen 4 µg de proteína de los picos obtenidos de la cromatografía en columna. El carril del pico I muestra una banda considerada como hexámero (600 kDa) de la H⁺-ATPasa. El carril para el pico II muestra la H⁺-ATPasa en diferentes estados oligoméricos que de acuerdo a su peso molecular se observan como hexámero (600 kDa), tetrámero (400 kDa), dímero (200 kDa) y monómero (100 kDa).

7.4 Estudio de los parámetros cinéticos de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática.

7.4.1 H⁺-ATPasa previa a la cromatografía en columna.

La cinética de saturación de la H⁺-ATPasa purificada de membrana plasmática de *K lactis*, mostró una dependencia sigmoidea con respecto a la concentración de ATP (Fig. 9), de acuerdo a lo reportado anteriormente (Sampedro *et al*, 2002). La actividad de hidrólisis de ATP se ajustó a la ecuación de Hill (Ec. 1) y los valores de los parámetros cinéticos a 30°C fueron: $V_{\max} = 7.53 \pm 0.09 \mu\text{moles ATP mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $S_{0.5} = 0.33 \pm 0.01 \text{ mM ATP}$ y $n = 1.82 \pm 0.06$ (Fig. 9, recuadro).

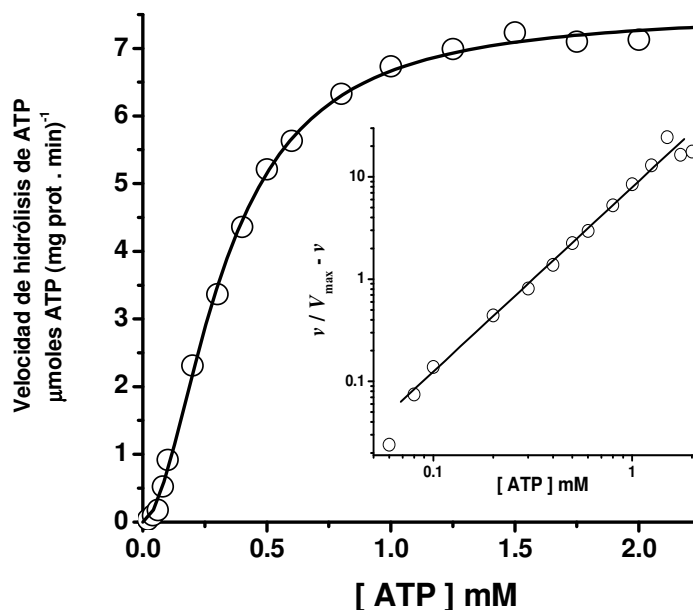


Figura 9. Cinética de saturación con sustrato de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática a 30°C que se obtuvo del gradiente de trehalosa. Se midió la velocidad de hidrólisis de ATP mediante un ensayo acoplado a enzimas como se describe en los métodos. La reacción se inicia agregando la H⁺-ATPasa a una concentración final de 7.39 μg de proteína. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill por regresión no-lineal. $V_{\max} = 7.53 \pm 0.09 \mu\text{moles ATP mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $S_{0.5} = 0.33 \pm 0.01 \text{ mM ATP}$ y $n = 1.82 \pm 0.06$. Recuadro: Gráfico de Hill. Las líneas son el resultado de la regresión lineal de los datos.

7.4.2 H⁺-ATPasa del pico I.

En este caso también la cinética se determinó utilizando un ensayo acoplado a enzimas. La H⁺-ATPasa de este pico mostró de igual forma una dependencia sigmoidea con respecto a la concentración de sustrato (Fig. 10). La actividad de hidrólisis de ATP se ajustó a la ecuación de Hill (Ec. 1) obteniendo los parámetros cinéticos $V_{\max} = 17.68 \pm 0.67 \mu\text{moles ATP mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $n = 1.98 \pm 0.21$ y $S_{0.5} = 0.33 \pm 0.02 \text{ mM}$. (Fig. 10, recuadro)

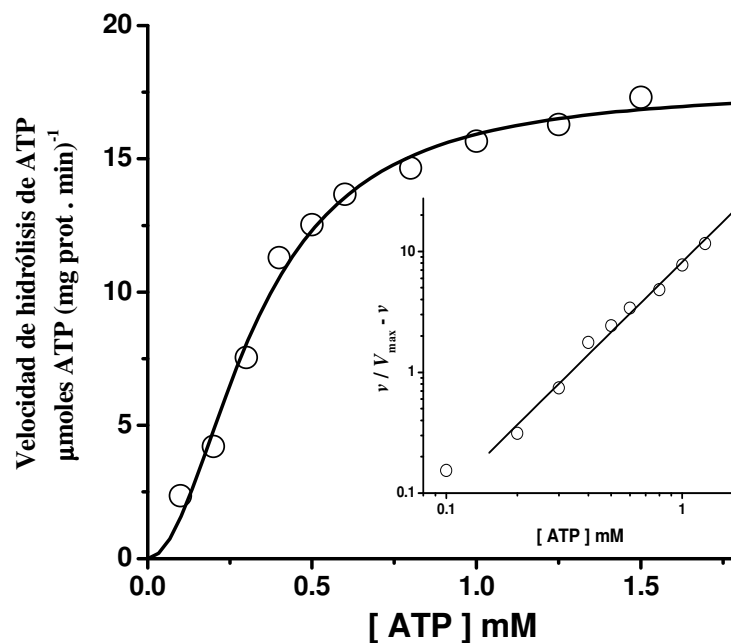


Figura 10. Cinética de saturación con sustrato de la H⁺-ATPasa del pico I resultante de la cromatografía en columna. Se midió la velocidad de hidrólisis de ATP mediante un ensayo acoplado a enzimas como se describe en los métodos. La reacción se inicia agregando la H⁺-ATPasa a una concentración final de 2.05 μg de proteína. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill por regresión no-lineal. $V_{\max} = 17.68 \pm 0.67 \mu\text{moles ATP mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $S_{0.5} = 0.33 \pm 0.02 \text{ mM ATP}$ y $n = 1.98 \pm 0.21$. Recuadro: Gráfico de Hill. Las líneas son el resultado de la regresión lineal de los datos.

7.4.3 H⁺-ATPasa del pico II

La cinética de saturación del pico II obtenido de la cromatografía en columna de la H⁺-ATPasa, mostró una dependencia sigmoidea con respecto a la concentración de ATP (Fig. 11). Los datos de la actividad de hidrólisis de ATP a 30 °C con el ensayo acoplado a enzimas se ajustaron a la ecuación de Hill (Ec. 1) y del cálculo de los parámetros cinéticos por regresión no-lineal se determinó una $V_{\max} = 5.19 \pm 0.26 \mu\text{moles ATP mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $n = 1.82 \pm 0.22$ y $S_{0.5} = 0.36 \pm 0.03 \text{ mM ATP}$ (Fig. 11, recuadro).

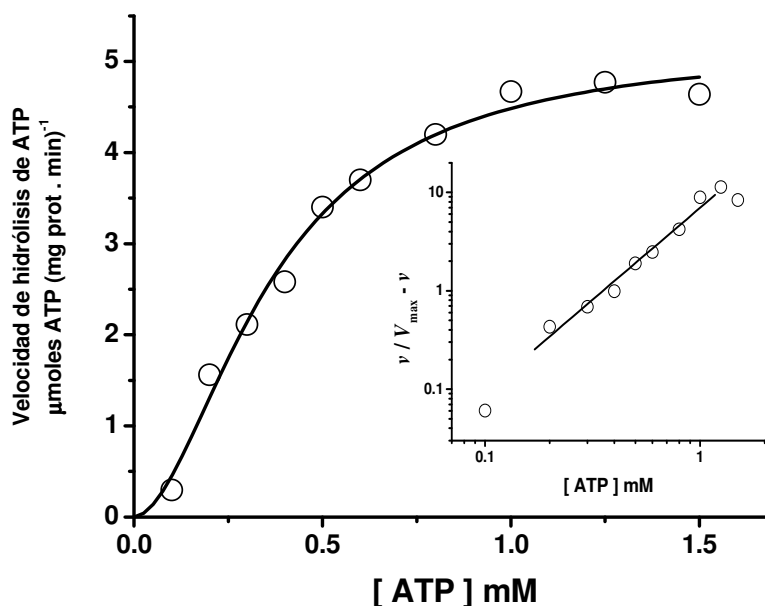


Figura 11. Cinética de saturación con sustrato de la H⁺-ATPasa del pico II resultante de la cromatografía en columna. Se midió la velocidad de hidrólisis de ATP mediante un ensayo acoplado a enzimas como se describe en los métodos. La reacción se inicia agregando la H⁺-ATPasa a una concentración final de 2.48 μg de proteína. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill por regresión no-lineal. $V_{\max} = 5.19 \pm 0.26 \mu\text{moles ATP mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $S_{0.5} = 0.36 \pm 0.03 \text{ mM ATP}$ y $n = 1.82 \pm 0.22$
Recuadro: Gráfico de Hill. Las líneas son el resultado de la regresión lineal de los datos.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de *K. lactis*.

	Número de Hill	V_{\max}	$S_{0.5}$
	n	$\mu\text{moles ATP mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$	mM ATP
H⁺-ATPasa (previa a la cromatografía)	1.82± 0.06	7.53± 0.09	0.33± 0.01
Pico I	1.98± 0.21	17.68± 0.67	0.33± 0.02
Pico II	1.82± 0.22	5.19± 0.26	0.36± 0.03

Tabla 4. Grado de afinidad por sustrato en la H⁺-ATPasa de membrana plasmática y sus diferentes estados oligoméricos.

	K_d (ADP)	K_d (AMP-PCP)
	mM	mM
H⁺-ATPasa (previa a la cromatografía)	0.28 ± 0.01	0.22 ± 0.01
Pico I	0.20 ± 0.01	0.13 ± 0.01
Pico II	0.24 ± 0.01	0.17 ± 0.01

7.5 Espectro de fluorescencia de la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de *K. lactis*.

El espectro de fluorescencia intrínseca para el pico I, II y la suspensión proteica previa a la cromatografía se obtuvo después de la incubación de 3.22 µg de enzima por 6 min a 25°C en amortiguador de fosfato de potasio 20 mM, pH 6.8 y 5 mM de MgCl₂. El espectro de fluorescencia se obtuvo realizando un barrido entre 310 – 405 nm con una longitud de onda de excitación a 275 nm. El espectro de fluorescencia intrínseca del pico I fue tres veces más intensa que la fluorescencia del pico II que a su vez fue similar a la H⁺-ATPasa antes de pasarla por la cromatografía en columna (Fig. 12)

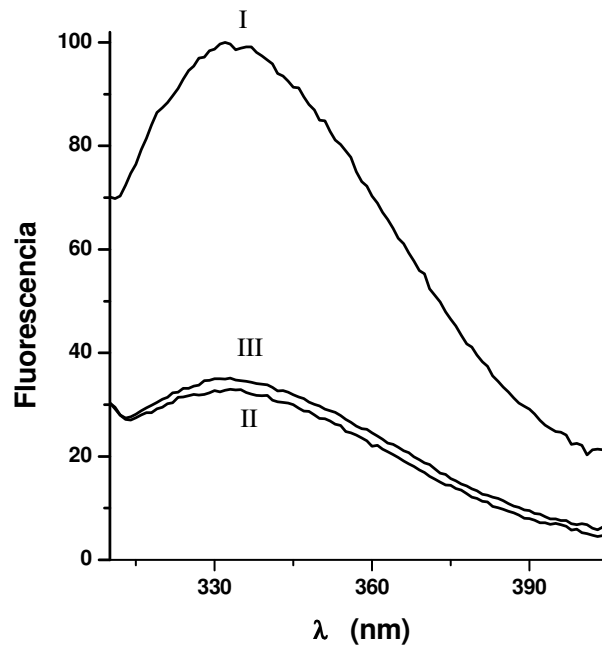


Figura 12. Espectro de fluorescencia de la H⁺-ATPasa. (A) pico I de la cromatografía en columna, (B) pico II de la cromatografía en columna, (C) H⁺-ATPasa antes de la cromatografía. Se incubaron 3.22 µg de enzima a 25°C en amortiguador de fosfato de potasio 20 mM, pH 6.8 y 5 mM de MgCl₂. El espectro de fluorescencia se midió entre 310 – 405 nm con una longitud de onda de excitación a 275 nm.

7.6 Apagamiento de la fluorescencia de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática por la unión de ADP y AMP-PCP

7.6.1 H⁺-ATPasa previa a la cromatografía.

La H⁺-ATPasa (obtenida del gradiente de trehalosa) se tituló con concentraciones crecientes de ADP y de AMP-PCP. Después de la adición de los nucleótidos se observó un apagamiento de la fluorescencia mostrando una dependencia hiperbólica con la concentración del sustrato (Fig.13). El valor para la constante de disociación (K_d) se calculó por regresión no lineal de acuerdo a la ecuación de Hill, esta fue de $K_d = 0.28 \pm 0.01$ mM de ADP y 0.22 ± 0.01 mM de AMP-PCP; por lo que existe una mayor afinidad para el ATP que para el ADP (Tabla 4).

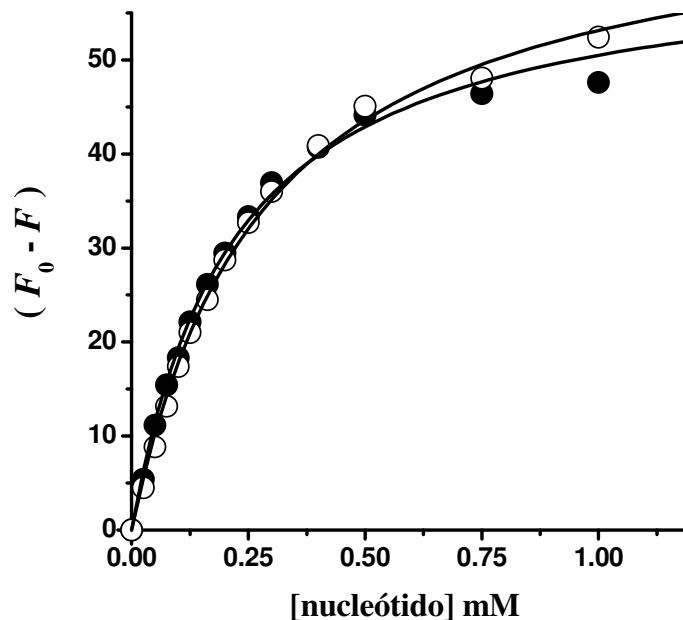


Figura 13. Apagamiento de la fluorescencia de la H⁺-ATPasa en presencia de diferentes concentraciones de ○ADP y ●AMP-PCP. Estos datos se analizaron por regresión no lineal, de acuerdo a la ecuación de Hill y se calculó el valor para la constante de disociación (K_d) que fue de 0.28 ± 0.01 mM para ADP y 0.22 ± 0.01 mM para AMP-PCP.

7.6.2 H⁺-ATPasa del pico I.

La H⁺-ATPasa del pico I también presentó un apagamiento de la fluorescencia intrínseca con una dependencia hiperbólica en la concentración del sustrato (Fig. 14). Las constantes de disociación (K_d) del sitio de unión para el ATP y ADP fueron calculadas de la misma manera; $K_d=0.13\pm 0.01$ mM para AMP-PCP y $K_d=0.20\pm 0.01$ mM para ADP. De igual manera el sitio de unión presentó una mayor afinidad para el ATP que para el ADP (Tabla 4).

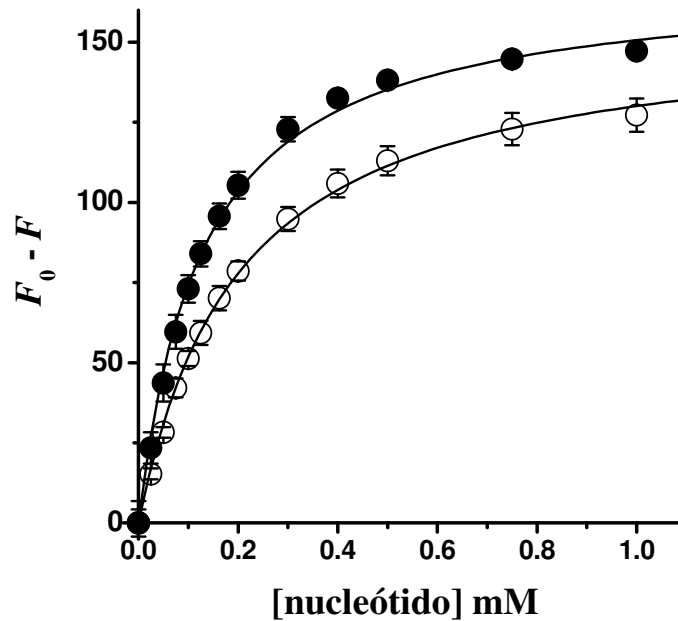


Figura 14. Apagamiento de la fluorescencia de la H⁺-ATPasa del pico I en presencia de diferentes concentraciones de nucleótido ○ADP y ●AMP-PCP. Estos datos se analizaron por regresión no lineal, de acuerdo a la ecuación de Hill y se calculó el valor para la constante de disociación (K_d) que fue de 0.20 ± 0.01 mM para ADP y 0.13 ± 0.01 mM para AMP-PCP.

7.6.3 H⁺-ATPasa de pico II.

El apagamiento de fluorescencia intrínseca por la unión de sustratos también se analizó para el pico II y se observó una dependencia hiperbólica con respecto a la concentración del nucleótido (Fig. 15). Las K_d calculadas fueron de 0.24 ± 0.01 mM para el ADP y 0.17 ± 0.01 mM para AMP-PCP. De igual manera el sitio de unión presentó una mayor afinidad para el ATP que para el ADP (Tabla 4).

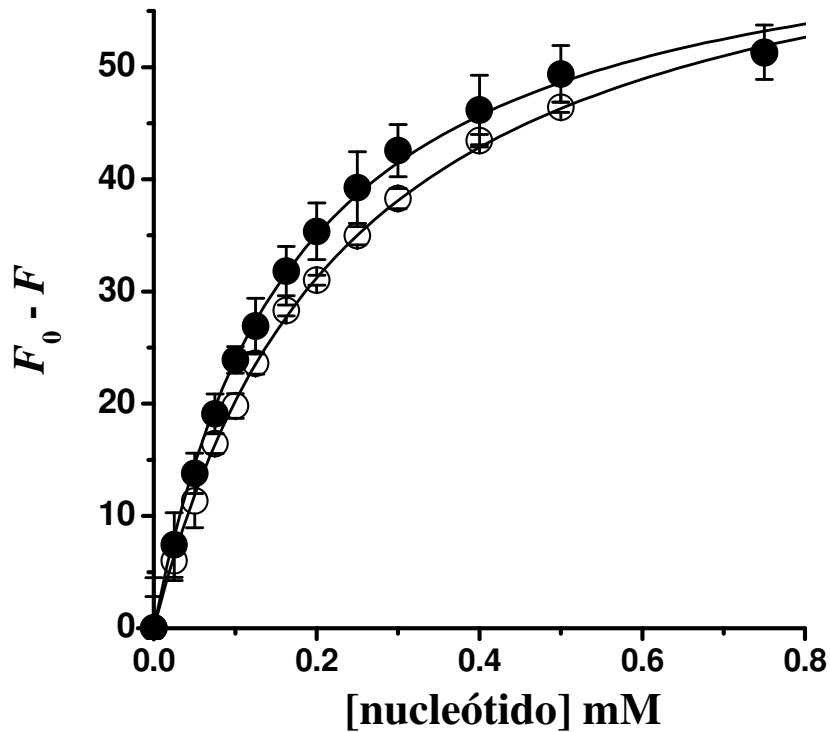


Figura 15. Apagamiento de la fluorescencia de la H⁺-ATPasa del pico II en presencia de diferentes concentraciones ○ADP y ●AMP-PCP. Estos datos se analizaron por regresión no lineal, de acuerdo a la ecuación de Hill y se calculó el valor para la constante de disociación (K_d) que fue de 0.24 ± 0.01 mM para ADP y 0.17 ± 0.01 mM para AMP-PCP.

8. DISCUSION

El aislamiento de las enzimas de membrana es una tarea compleja debido al carácter hidrofóbico de estas proteínas, ya que tienden a la formación de agregados (Hilger *et al*, 2005). Especialmente en las P-ATPasas no se ha reportado una metodología que permita obtener estas proteínas con alta pureza; el rendimiento típico para la H⁺-ATPasa es sólo de 35-55% de pureza (Guerra *et al*, 1995).

La H⁺-ATPasa es una enzima lábil que se inactiva/desnaturaliza con ligeros cambios en las condiciones del medio (Sampedro *et al*, 2001). Estudios recientes de la inactivación de la H⁺-ATPasa en presencia de diferentes carbohidratos demostraron que el disacárido trehalosa es capaz de estabilizarla en condiciones de estrés (Sampedro *et al*, 2001). El disacárido trehalosa es sintetizado en diversos organismos como respuesta al estrés, se ha propuesto que el papel de este carbohidrato es el de proteger las estructuras celulares en condiciones adversas (Sampedro *et al*, 1998 y 2002). Se ha demostrado que la trehalosa estabiliza diversas proteínas y que disminuye la pérdida de su actividad enzimática (Pan *et al*, 2005; Sampedro y Uribe, 2004; Kaushik y Bhat, 2003; Melo *et al*, 2001; Carninci *et al*, 1998; Colaco *et al*, 1992). Por lo anterior, proponemos que es posible emplear trehalosa durante la purificación de enzimas optimizando el proceso gracias a su poder estabilizador.

En este trabajo se modificó el método de purificación de la H⁺-ATPasa. Como resultado, se obtuvo una enzima con alta pureza (Fig. 6, carril 4) y actividad adecuada (Fig. 9). Esencialmente se utilizó el método empleado por Bowman *et al* (1981) y modificado por Guerra *et al* (1995) pero se utilizó además un gradiente discontinuo de trehalosa (Fig. 5).

Se ha reportado que la trehalosa no se une a las proteínas, aún a altas concentraciones, de hecho se establece un estado de hidratación preferencial (Lin y Timasheff, 1996). Es decir, la trehalosa es excluida preferentemente de la capa de hidratación y favorece un estado mas compacto de la proteína (Sampedro *et al*,

2002). Probablemente esto es lo que permite una mejor purificación de la enzima ya que al compactarse, logra una separación mas definida en cada gradiente de trehalosa (como se observa en la Fig. 6, carriles 1 al 4). En resumen, la ATPasa fue aislada con una pureza de 90.4% en la fracción de 45% de trehalosa (Fig. 6, carril 4)

En contraste con otras P-ATPasas, la H⁺-ATPasa de la membrana plasmática de la levadura es una enzima cuya estructura cuaternaria aún se desconoce (Morsomme *et al*, 2000; Ferreira *et al*, 2001). Se han reportado diferentes estados oligoméricos, como es el caso de la H⁺-ATPasa de *Schizosaccharomyces pombe* que se puede encontrar en octámeros y decámeros después de la solubilización con detergentes (Morsomme *et al*, 2000). La enzima de *Neurospora crassa*, aunque se puede obtener en forma activa como monómero (Goormaghtigh *et al*, 1986), se le ha observado también como dímero (Bowman *et al*, 1985) e incluso bajo ciertas condiciones formar hexámeros estables (Chadwick *et al*, 1987; Cyrklaff *et al*, 1995). Sin embargo, aún cuando se dice que la oligomerización no es necesaria para la actividad (Briskin *et al*, 1995), se sabe también que la estructura proteica puede ser modificada para optimizar su función (Fields, 2001)

En este trabajo evaluamos la posible presencia de diferentes estados oligoméricos de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática de *K. lactis*. Inicialmente, se observaron grandes agregados proteicos mediante análisis por dispersión de luz (resultados no mostrados), debido probablemente a la naturaleza hidrofóbica de la enzima (Hilger *et al*, 2005). Sin embargo, logramos su resolución mediante cromatografía por exclusión molecular, utilizando una columna de Superosa 6 de acuerdo a lo reportado anteriormente para la P-ATPasa de *Methanococcus jannaschii* (Morsomme *et al*, 2002). Observamos 2 picos de elución (I y II) a 280 nm (Fig. 7A) que posteriormente se analizaron en un BN-PAGE con tinción doble (con azul de Coomassie y con plata). A diferencia de los geles comunes de poliacrilamida, el uso de BN-PAGE permite la identificación de complejos moleculares de proteínas de membrana (Schägger y Von-Jagow, 1991) y sus estados oligoméricos (Schägger *et al*, 1994). En este caso, adicionalmente utilizamos trehalosa 0.3M en sustitución

del ácido aminocaproico pensando que así se favorecería la conservación de la estructura cuaternaria (Sampedro *et al*, 1998). De esta manera pudimos observar que el pico I de la cromatografía descrita en la figura 7 consistía únicamente de una banda con un peso aproximado de 600 kDa, lo cual sería compatible con una estructura de hexámero para esta H⁺-ATPasa (Fig. 8, Carril 2). En contraste, el pico II contenía una mezcla de agregados, sugiriendo la presencia de hexámeros, tetrámeros, dímeros y monómeros en las bandas con pesos moleculares aproximados de 600, 400, 200 y 100 kDa, respectivamente (Fig. 8, Carril 3). De esta forma, creemos que el patrón de oligomerización de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática de *K. lactis* se da a partir del dímero y que la asociación de estos dímeros conduce a la formación de tetrámeros y hexámeros, sugiriendo además que éste último es el mayor estado oligomérico en el que se puede encontrar la enzima; es decir, como un trímero de dímeros.

El análisis de los 2 picos obtenidos de la cromatografía en columna nos permitió comprobar que la H⁺-ATPasa de *K. lactis* muestra una cinética de saturación sigmoidea con respecto a la concentración de ATP, tanto en su forma de hexámero (Fig. 10), como en la mezcla de los estados oligoméricos (Fig. 11), así como en la enzima recién purificada (antes de pasarla por cromatografía) (Fig 9); que coincide con la cinética reportada anteriormente (Sampedro *et al*, 2002; Nakamoto y Slayman, 1989). Lo anterior nos lleva a proponer que la H⁺-ATPasa posee dos sitios de unión no equivalentes (diferentes estados conformacionales) de diferente afinidad o bien; dos o más sitios que interactúan cooperativamente (Bowman, 1983; Koland y Hammes, 1986)

Los datos obtenidos de la actividad de hidrólisis de ATP se ajustaron a la ecuación de Hill (Ec. 1) y el cálculo de los parámetros cinéticos a 30°C para la enzima recién purificada fue: $V_{\max} = 7.53 \pm 0.086 \mu\text{moles ATP mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $S_{0.5} = 0.326 \pm 0.007 \text{ mM ATP}$ y $n = 1.824 \pm 0.064$ (Fig. 9, recuadro). Estos datos fueron similares a los del pico II de la cromatografía en columna (Tabla 3) donde obtuvimos una $V_{\max} = 5.194 \pm 0.256 \mu\text{moles ATP mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $n = 1.823 \pm 0.218$ y $S_{0.5} = 0.364 \pm$

0.028 mM ATP (Fig. 11, recuadro), éste último similar incluso al del hexámero ($S_{0.5}=0.329\pm 0.019$ mM ATP) pero los otros 2 parámetros fueron diferentes en contraste con lo observado en el pico I, que presentó una $V_{max}=17.682\pm 0.671$ μ moles ATP mg prot⁻¹ min⁻¹ significativamente mayor, y un número de Hill ligeramente mayor ($n=1.977\pm 0.214$) (Fig. 10, recuadro y tabla 3), Nótese que el valor del número de Hill es cercano a 2, lo que nos indicaría una asociación probable en forma de dímeros, además del valor de la $S_{0.5}$ que siendo similar en todos los casos, contrasta únicamente con los valores de la V_{max} que sin duda es mucho mayor para el hexámero.

La H⁺-ATPasa de *K. lactis* posee un residuo de triptofano en la parte citoplasmática; específicamente en el dominio de unión del ATP; dominio N (Radresa *et al*, 2002; Serrano *et al*, 1986). Este triptofano se localiza en una asa estructural flanqueado por dos estructuras β , cuyo movimiento permite la unión del sustrato (Hilge *et al*, 2003). Por lo que la unión del ATP o del ADP resulta en el apagamiento de la fluorescencia de la enzima.

El espectro de fluorescencia se midió entre 310 – 405 nm con una longitud de onda de excitación a 275 nm. Notablemente, la fluorescencia intrínseca del pico I (considerado como la forma hexamérica) fue tres veces más intensa que la fluorescencia del pico II la cual fue similar a la H⁺-ATPasa antes de pasarla por la cromatografía en columna (Fig. 12)

Mediante análisis de fluorescencia intrínseca evaluamos los cambios estructurales en la enzima cuando lleva a cabo la unión de sustrato (ADP o ATP). Utilizamos un análogo de ATP no hidrolizable: adenosina 5'-[β,γ -metilene]trifosfato (AMP-PCP) (Blum, 1977 y 1979; Thaddeus y Tomaszek, 1986).

El apagamiento de la fluorescencia mediante ambos nucleótidos ADP y AMP-PCP, fue considerablemente mayor (superior al 90%) en contraste con lo observado en estudios similares con la Ca²⁺- y Na⁺, K⁺-ATPasas, que es solo del 1-4% (Lacapere *et al*, 1990; Dupont *et al*, 1988; Dupont *et al*, 1982). Asimismo se observó

una dependencia hiperbólica (saturable) respecto a la concentración de sustrato (Figs. 13, 14 y 15) y es importante hacer notar que el grado de apagamiento de fluorescencia por AMP-PCP fue mayor en el pico I, en contraste con el pico II y la H⁺-ATPasa previa a la columna.

Los datos obtenidos se analizaron por regresión no lineal y se ajustaron a la ecuación 2 que describe la interacción de sustrato con un solo sitio de unión, obteniendo para la H⁺-ATPasa previa a la cromatografía en columna, una K_d de 0.281 ± 0.014 mM para ADP y 0.216 ± 0.010 mM para AMP-PCP, estos datos fueron mas cercanos a los encontrados en el pico II donde se observó una afinidad para el ADP de 0.238 ± 0.005 mM y para AMP-PCP 0.174 ± 0.008 mM, en contraste con el pico I que presentó un mejor grado de afinidad para ambos nucleótidos ($K_d = 0.129 \pm 0.003$ mM para AMP-PCP y $K_d = 0.202 \pm 0.006$ mM para ADP) con respecto a las otras muestras. En todos los casos, pico I, pico II y H⁺-ATPasa previo a la columna se observó una mayor afinidad para el ATP que para ADP (Tabla 4).

9. CONCLUSIONES

1. La trehalosa puede ser utilizada en el protocolo de purificación de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática de levadura para mejorar el rendimiento y la pureza.
3. Los diferentes estados oligoméricos en que se puede encontrar la H⁺-ATPasa de membrana plasmática de levadura son: hexámero (600 kDa), tetrámero (400 kDa), dímero (200 kDa) y monómero (100 kDa)
4. El hexámero presenta una fluorescencia cerca de 3 veces mayor que los estados oligoméricos, así como una mejor afinidad para el ATP y ADP y una velocidad máxima mayor (tres veces).

10. BIBLIOGRAFÍA

- Amory, A. y Goffeau, A. (1982) Characterization of the β -aspartil phosphate intermediate formed by the H1 translocating ATPase from the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.*, 257:4723-4730.
- Anderson, K.W. y Murphy A.J. (1983) Alterations in the structure of the ribose moiety of ATP reduce its effectiveness as a substrate for the sarcoplasmic reticulum ATPase. *J. Biol. Chem.*, 258:14276-14278.
- Axelsen, K.B. y Palmgren, M.G. (1998) Evolution of substrate specificities in P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.*, 46:84-111.
- Barth, A. y Zscherp, C. (2000) Substrate binding and enzyme function investigated by infrared spectroscopy. *FEBS Lett.*, 477:151-156.
- Benaroudj, N., Lee, D.H. y Goldberg, A.L. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.*, 276:24261-24267.
- Bergman, M.P., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmelk, B.J., D'Ellos, M.M., Amedei, A., Azzurri, A., Benagiano, M. y Del Prete, G. (2005) The story so far: *Helicobacter pylori* and gastric autoimmunity. *Int. Rev. Immunol.*, 24:63-91.
- Bollag, M. D., Rozycki M. D. y Edelstein S. J. (1996) *Protein Methods.*, 2nd Edition. (ed) Wiley-Liss, New York, NY, USA. pp:107-172, 271-299.
- Bowman, B.J., Berenski, C.J. y Jung, C.Y. (1985) Size of the plasma membrane H^+ -ATPase from *Neurospora crassa* determined by radiation inactivation and comparison with the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase from skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 260:8726-8730.
- Bowman, B. J. (1983) Kinetic evidence for interacting active sites in the *Neurospora crassa* plasma membrane ATPase. *J. Biol. Chem.*, 258:13002-13007.
- Bowman, B.J., Blasco, F. y Slayman, C.W. (1981) Purification and characterization of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, 256:12343-12349.

- Briskin, D. P., Basu, S. y Assmann, S. M. (1995) Characterization of the Red Beet Plasma Membrane H⁺-ATPase Reconstituted in a Planar Bilayer. *System Plant Physiol.*, 108:393–398.
- Burman, P., Karlsson, F.A., Loof, L., Axelsson, C.K., Szesci, P.B. y Borch, K. (1991) H⁺,K⁺-ATPase antibodies in autoimmune gastritis: observations on the development of pernicious anemia. *Scand. J. Gastroenterol.*, 26:207-214.
- Butler, S.L. y Falke, J.J. (1996) Effects of protein stabilizing agents on thermal backbone motions: a disulfide trapping study. *Biochemistry*, 35:10595-10600.
- Carninci, P., Nishiyama, Y., Westover, A., Itoh, M., Nagaoka, S., Sasaki, N., Okazaki, Y., Muramatsu, M. y Hayashizaki, Y. (1998) Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:520-524.
- Cartwright, C.P., Veazey, F.J. y Rose, A.H. (1987) Effect of ethanol on activity of the plasma-membrane ATPase in, and accumulation of glycine by, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 133:857-865.
- Chadwick, C.C., Goormaghtigh, E. y Scarborough, G.A. (1987) A hexameric form of the *Neurospora crassa* plasma membrane H⁺-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 252:348-356.
- Colaco, C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S. y Roser, B. (1992) Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnol.*, 10:1007-1011.
- Coote, P.J., Jones, M.V., Seymour, I.J., Rowe, D.L., Ferdinando, D.P. McArthur, A.J. y Cole, M.B. (1994) Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 140:1881-1890.
- Cordone, L. Galdja, P. Vitrano, E. Gassman, A. Osterman, A. y Parak, F. (1998) A reduction of protein specific motions in co-ligated myoglobin embedded in a trehalose glass. *Eur. Biophys. J.*, 27:173-176.

- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Carpenter, J.F., y Aurell, C. (1987) Stabilization of dry phospholipids bilayers and proteins by sugars (Review article). *Biochem. J.*, 242:1-10.
- Cyrklaff, M., Auer, M., Kuhlbrandt, W. y Scarborough, G. A. (1995) 2-D structure of the *Neurospora crassa* plasma membrane ATPase as determined by electron microscopy. *EMBO J.*, 14:1854-1857.
- Demchenko, A.P., Ruskyn, O.I. y Saburova, E.A. (1989) Kinetics of the lactate dehydrogenase reaction in high-viscosity media. *Biochim. Biophys. Acta*, 998:196-203.
- Dupont, Y., Guillain, F. y Lacapere, J.J. (1988) Fluorimetric detection and significance of conformational changes in Ca²⁺-ATPase. *Methods Enzymol.*, 157:206-219.
- Dupont, Y., Chapron, Y. y Pougeois, R. (1982) Titration of the nucleotide binding sites of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase with 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate and 5'-diphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 106:1272-1279.
- Ferreira, T., Mason, A.B. y Slayman, C.W. (2001) The yeast Pma1 proton pump: a model for understanding the biogenesis of plasma membrane proteins. *J. Biol. Chem.*, 276:29613-29616.
- Fields, P.A. (2001) Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 129:417-431.
- Fiske, C.H. y Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorous. *J. Biol. Chem.*, 66:375-400.
- Frauenfelder, H., Fenimore, P.W. y McMahon, B.H. (2002) Hydration slaving and protein function. *Biophys. Chem.*, 98:35-48.
- Frauenfelder, H., Parak, F. y Young, R.D. (1988) Conformational substates in proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 17:451-479.

- Goormaghtigh, E., Chadwick, C. y Scarborough, G.A. (1986) Monomers of the *Neurospora* plasma membrane proton ATPase catalyze efficient proton translocation. *J. Biol. Chem.*, 261:7466-7471.
- Guerra, G., Uribe, S. y Pardo, J.P. (1995) Reactivity of the H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis* to sulfhydryl reagents. *Arch. Biochem. Biophys.*, 321:101-107.
- Giulian, G.G., Moss, R.L. y Greaser, M. (1983) Improved methodology for analysis and quantitation of proteins on one-dimensional silver-stained slab gels. *Anal. Biochem.*, 129:277-287.
- Gums, J.G. (2004) Magnesium in cardiovascular and other disorders. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 61:1569-1576.
- Haran, G., Haas, E., Szpikowska, B.K. y Mas, M.T. (1992) Domain motions in phosphoglycerate kinase: determination of interdomain distance distributions by site-specific labeling and time-resolved fluorescence energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:11764-11768.
- Haouz, A., Glandières, J.M. y Alpert, B. (2001) Involvement of protein dynamics in enzyme stability. The case of glucose oxidase. *FEBS lett.*, 506:216-220.
- Hilge, M., Siegal, G., Vuister, G. W., Guntert, P., Gloor, S. M., y Abrahams, J. P. (2003) ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na⁺,K⁺-ATPase. *Nat. Struct. Biol.*, 10:468-474.
- Hilger, D., Jung, H., Padan, E., Wegener, C., Vogel, K. P., Steinhoff, H. J., y Jeschke, G. (2005) Assessing Oligomerization of Membrane Proteins by Four-Pulse DEER: pH-Dependent Dimerization of NhaA Na⁺/H⁺ Antiporter of *E. Coli*. *Biophys. J.*, 89:1328-1338.
- Hottiger, T., Boller, T. y Wiemken, A. (1987a) Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS lett.*, 220:113-115.
- Ishima, R. y Torchia, D.A. (2000) Protein dynamics from NMR. *Nat. Struct. Biol.*, 7:740-743.

- Kaushik, J.K. y Bhat, R. (2003) Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalosa. *J. Biol. Chem.*, 278:26458-26465.
- Koland, J. G. y Hammes, G. G., (1986) Steady state kinetic studies of purified yeast plasma membrane proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.*, 261:5936-5942.
- Lacapere, J.J., Bennett, N., Dupont, Y. y Guillain, F. (1990) pH and magnesium dependence of ATP binding to sarcoplasmic reticulum ATPase. Evidence that the catalytic ATP-binding site consists of two domains. *J. Biol. Chem.*, 265:348-353.
- Lin, T. Y. y Timasheff, S. N. (1996) On the role of surface tension in the stabilization of globular proteins. *Protein Sci.* 52:372-81.
- Liu, R., y Sharom, F. J. (1997) Fluorescence studies on the nucleotide binding domains of the P-glycoprotein multidrug transporter. *Biochemistry*, 36:2836-2843.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275.
- Melo, E.P., Faria, T.Q., Martins, L.O., Goncalves, A.M. y Cabral, J.M. (2001) Cutinase unfolding and stabilization by trehalose and mannosylglycerate. *Proteins*, 42:542-552.
- Miranda, M., Ramírez, J., Peña, A. y Coria, R. (1995) Molecular cloning of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: A single nucleotide substitution in the gene confers ethidium bromide resistance and deficiency in K⁺ uptake. *J. Bacteriol.*, 177:2360-2367.
- Morsomme, P., Chami, M., Marco, S., Nader, J., Ketchum, K., Goffeau, A. y Rigaud, J. (2002) Characterization of a Hyperthermophilic P-type ATPase from *Methanococcus jannaschii* Expressed in Yeast. *J. Biol. Chem.*, 277:29608-29616.
- Morsomme, P., Slayman, C.W. y Goffeau, A. (2000) Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H(+)-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1469:133-157.
- Nakamoto, R.K. y Slayman, C.W. (1989) Molecular properties of the fungal plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 21:621-632.

- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd edition, (ed) Worth publishers, U. S. A., pp:417
- Pan, J., Chen, X.L., Shun, C.Y., He, H.L. y Zhang, Y.Z. (2005) Stabilization of Cold-Adapted Protease MCP-01 Promoted by Trehalose: Prevention of the Autolysis. *Protein Pept. Lett.*, 12:375-378.
- Panaretou, B. y Piper, P.W. (1992) The plasma membrane of yeast acquires a novel heat-shock protein (hsp30) and displays a decline in proton-pumping ATPase levels in response to both heat shock and the entry to stationary phase. *Eur. J. Biochem.*, 206:635-640.
- Parrou, J.L., Teste, M.A. y Francois, J. (1997) Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Sccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology*, 143:1891-1900.
- Perlin, D.S., Kasamo, K., Brooker, R.J. y Slayman, C.W. (1984) Electrogenic H⁺ translocation by the plasma membrana of *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, 259:7884-7892.
- Radresa, O., Ogata, K., Wodak, S., Ruyschaert, J. M. y Goormaghtigh E. (2002) Modeling the three-dimensional structure of H⁺-ATPase of *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.*, 269:5246-5258.
- Sampedro, J.G. y Uribe, S. (2004) Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol. Cell. Biochem.*, 256-257:319-327.
- Sampedro, J. G. (2002) Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sampedro, J. G., Muñoz-Clares, R. A., y Uribe, S. (2002) Trehalose-mediated inhibition of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: dependence on viscosity and temperature. *J. Bacteriol.*, 184:4384-4391.
- Sampedro, J.G., Cortés, P., Muñoz-Clares, R.A., Fernández, A., y Uribe, S. (2001) Thermal inactivation of the plasma membrane H⁺-ATPase from

- Kluyveromyces lactis*. Protection by trehalose. *Biochim. Biophys. Acta*, 1544:64-73.
- Sampedro, J.G., Guerra, G., Pardo, J.P., y Uribe, S. (1998) Trehalose-mediated protection of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis* during freeze-drying and rehydration. *Cryobiology*, 37:131-138.
 - Scarborough GA. (2002) Molecular mechanism of the P-type ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 34:235-250.
 - Schägger, H., Cramer, W. A. y Von-Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 217:220-230.
 - Schägger, H. y Von-Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, 199:223-231.
 - Schweigert, I.D., Roehrig, C., da Costa, F., Scheibel, F., Gottfried, C.J., Rotta, L.N., Goncalves, C.A., Souza, D.O. y Perry, M.L. (2004) High extracellular K⁺ levels stimulate acetate oxidation in brain slices from well and malnourished rats. *Neurochem. Res.*, 29:1547-1551.
 - Serrano, R. (1993) Structure, function and regulation of plasma membrane H⁺-ATPase. *FEBS Lett.*, 325:108-111.
 - Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C. y Fink, G.R. (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (2Na⁺,K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature*, 319:689-693.
 - Sharma, S.C. (1997) A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 152:11-15.
 - Shils, M. E., Olson, J. A., Shike M., Ross A. C. (2002) *Nutrición en salud y enfermedad*, 9ª edición, Vol. 1, (ed) Mc. Graw Hill, México, D. F. pp: 136-138, 169-174
 - Singer, M.A. y Lindquist, S. (1998a) Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell.*, 1:639-648.

- Singer, M.A. y Lindquist, S. (1998b) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.*, 16:460-468.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. y Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*, 405:647-655.
- Viegas, C.A., Sebastião, P.B., Nunes, A.G. y Sã-Correia, I. (1995) Activation of plasma membrane H(+)-ATPase and expression of *PMA1* and *PMA2* genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells grown at supraoptimal temperatures. *Appl. Env. Micr.*, 61:1904-1909.
- Vrbjar, N., Simatos, G.A. y Keough, K.M. (1990) Temperature dependence of kinetic parameters of (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase in rabbit and winter flounder sarcoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta*, 1030:94-100.
- Wasserman, R. H., Chandler, J. S., Meyer, S. A., Smith, C. A., Brindak, M. E., Fullmer, C. S., Penniston, J. T., Kumar, R. (1992) Intestinal calcium transport and calcium extrusion processes at the basolateral membrane. *J. Nutr.*, 122:662-671

11. ANEXOS

En la preparación de las soluciones se utilizó agua de alta pureza (grado reactivo).

11.1 SOLUCIONES PARA PURIFICACIÓN DE H⁺-ATPasa

Amortiguador sorbitol:

Sorbitol 1.0 M

KH₂PO₄ 50 mM

EDTA (sal de sodio) 1.0 mM

EGTA (sal tetrasódica) 5.0 mM

Ajustar pH = 7.0 con KOH

Medio YPD

1% Extracto de levadura

1% Peptona de gelatina

2% Glucosa

Amortiguador EGTA:

EGTA sal tetrasódica 2.0 mM

MOPS 10 mM

Ajustar a pH 7.2 con NaOH

Amortiguador A (3x):

KCl 0.6 M

EDTA 6 mM

EGTA 1 mM

TRIS 75 mM, pH 7.2

Amortiguador B:

KCl 0.3 M

45% Glicerol

EDTA 2 mM

TRIS 25 mM, pH 7.5

11.2 SOLUCIONES PARA METODO DE LOWRY

Solución A :

0.5 g de Sulfato de Cobre pentahidratado

1 g de Citrato dihidratado

Agua c. b. p. 100 mL

Solución B:

20 g de Carbonato de Sodio

4 g de Hidróxido de Sodio

Agua c. b. p. 1 L

Solución C:

1 mL de Solución A

50 mL de Solución B

Solución D:

10 mL Folin-Ciocalteu

10 mL de agua destilada

11.3 SOLUCIONES PARA SDS-PAGE

Solución de 30% de acrilamida/2.67% de bisacrilamida:

29.2 g de acrilamida

0.8 g de bisacrilamida

Amortiguador de corrimiento: consistió de Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0.1% con un pH aproximado de 8.3.

Amortiguador de muestra: se preparó con 4.8 mL de agua, 1.2 mL de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 1 mL de glicerol, 2 mL de SDS al 10% (p/v) y 0.5 mL de azul de bromofenol al 0.1%. A esta mezcla se le agregó un 5% de β -mercaptoetanol al momento de emplearla.

11.4 SOLUCIONES PARA BN-PAGE

Amortiguador 3x:

Imidazol 75 mM

Trehalosa 300 mM

pH 7.0

Amortiguador de muestra:

Imidazol 25 mM

Trehalosa 0.3 M

pH 7.0

Soluciones de corrimiento:

Amortiguador del cátodo (superior)

Tricina 50 mM

Imidazol 7.5 mM

Azul de Coomassie 0.02%

Agua c. b. p. 1 L

Amortiguador del ánodo (inferior)

Imidazol 25 mM

Agua c. b. p. 1 L

Ajustar pH a 7.0 con HCl

11.5 SOLUCIONES PARA TINCIÓN DE PLATA

Solución A:

0.8 g de AgNO_3 en 4 mL de H_2O

Solución B:

21 mL de NaOH 0.36%

1.4 mL de Hidróxido de Amonio 14.8 M (30%)

Solución C: Se agregó lentamente la solución A a la Solución B con agitación constante, hasta aclarar el precipitado café formado. Se agregó agua c. b. p. 100 mL y se utilizó dentro de los 15 min después de su preparación.

Solución D: Se mezclaron 0.5 mL de ácido cítrico 1% con 50 μL de formaldehído 38% y agua c. b. p. 100 mL.

11.6 SOLUCIONES PARA TINCION CON AZUL DE COOMASSIE

Solución para teñir:

1 g de Azul de Coomassie R-250

450 mL de Metanol

450 mL de Agua

100 mL de Ácido Acético Glacial

Solución desteñidora:

100 mL de Metanol

100 mL de Ácido Acético Glacial

800 mL de Agua