

03081
13
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado
del Colegio de Ciencias y Humanidades. Sede Instituto de Fisiología Celular.

**EFEECTO DE REACTIVOS ESPECIFICOS PARA CISTEINAS EN LA
H⁺ATPasa DE LA MEMBRANA PLASMATICA DE *Kluyveromyces lactis*.**

DOCTORADO DE INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

Presenta:

M. en C. María Guadalupe Guerra Sánchez.

Ciudad Universitaria Octubre de 1995.

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ABSTRACT.

The H⁺ATPase (EC 3.6.1.35) from *Kluyveromyces lactis* was assayed in the presence of increasing concentrations of N-ethylmaleimide (NEM), IAEDANS and methylmethane tiosulfonate (MMTS). N-ethylmaleimide inhibited the H⁺ATPase with a second rate constant of 200 M⁻¹min⁻¹. H⁺ATPase was partially protected by MgADP. Low concentrations of Mg protected ATPase from the effects of NEM, while high Mg sensitized ATPase to NEM. The reaction of ¹⁴C-NEM with the native enzyme modified three cysteine residues/monomer, two of which were involved in 80% of the inactivation of the enzyme. In the presence of Mg-ADP, NEM binding to the first residue had only a slight effect on the activity (10-20% inhibition). After further incubation, the modification of a second cysteine residue (probably cys-221) inactivated the ATPase. There seems to be at least one cys (probably cys-532) at, or near, the nucleotide binding site of the H⁺ATPase. Modification of a second cysteine residue (cys-221) also resulted in inactivation by NEM; this residue was not protected by ADP and thus probably is not at the ATP binding site. IAEDANS reacted with the H⁺ATPase exhibiting a pseudo-first order of inactivation which was partially dependent on the pH. This inhibition was not prevented by MgADP or by magnesium. MMTS reacted with the enzyme without causing inhibition. Instead, there was a partial protection by MMTS against IAEDANS inhibition, and NEM resistant H⁺ATPase. The MMTS-resistant inhibition elicited by IAEDANS was not pH dependent, although it was mildly sensitive to MgADP. It is suggested that, the residue involved in the reaction between the MMTS derived enzyme and IAEDANS is not a cysteine or histidine, but probably a methionine.

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
(Bioquímica)**

El trabajo experimental fue realizado en el laboratorio No. 305 ote. del Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con la asesoría del Dr. Salvador Uribe Carvajal.

Este proyecto recibió los siguientes apoyos:
Beca para estudios de Doctorado. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).
Donativos: DGAPA-PAPIID UNAM; PADEP (UNAM).

Agradecimientos:

A los Dres. Georges Dreyfus C., Herminia Pasantes M. y Juan Pablo Pardo V. miembros del comité tutorial, por la confianza y apoyo que me brindaron durante el doctorado.

Al Dr. Juan Pablo Pardo por la lectura crítica a este manuscrito.

A los miembros del jurado, que con sus sugerencias y correcciones, contribuyeron a mejorar este trabajo.

Miembros del H. Jurado:

Dr. Antonio Peña D.

Dr. Armando Gómez P.

Dra. Marina Gavilanes

Dr. Edgardo Escamilla M.

Dr. Salvador Uribe C.

Dr. Rafael Moreno S.

Dr. Federico Martínez M.

ABSTRACT.

The H⁺ATPase (EC 3.6.1.35) from *Kluyveromyces lactis* was assayed in the presence of increasing concentrations of N-ethylmaleimide (NEM), IAEDANS and methylmethane tiosulfonate (MMTS). N-ethylmaleimide inhibited the H⁺ATPase with a second rate constant of 200 M⁻¹min⁻¹. H⁺ATPase was partially protected by MgADP. Low concentrations of Mg protected ATPase from the effects of NEM, while high Mg sensitized ATPase to NEM. The reaction of ¹⁴C-NEM with the native enzyme modified three cysteine residues/monomer, two of which were involved in 80% of the inactivation of the enzyme. In the presence of Mg-ADP, NEM binding to the first residue had only a slight effect on the activity (10-20% inhibition). After further incubation, the modification of a second cysteine residue (probably cys-221) inactivated the ATPase. There seems to be at least one cys (probably cys-532) at, or near, the nucleotide binding site of the H⁺ATPase. Modification of a second cysteine residue (cys-221) also resulted in inactivation by NEM; this residue was not protected by ADP and thus probably is not at the ATP binding site. IAEDANS reacted with the H⁺ATPase exhibiting a pseudo-first order of inactivation which was partially dependent on the pH. This inhibition was not prevented by MgADP or by magnesium. MMTS reacted with the enzyme without causing inhibition. Instead, there was a partial protection by MMTS against IAEDANS inhibition, and NEM resistant H⁺ATPase. The MMTS-resistant inhibition elicited by IAEDANS was not pH dependent, although it was mildly sensitive to MgADP. It is suggested that, the residue involved in the reaction between the MMTS derived enzyme and IAEDANS is not a cysteine or histidine, but probably a methionine.

CONTENIDO.

I. RESUMEN.

II. INTRODUCCION.

- II.1.** Las ATPasas de la membrana plasmática.
- II.2.** La ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.
- II.3.** Modelo topológico de la ATPasa de H⁺.
- II.4.** Modificación química. Estudios realizados sobre la ATPasa de H⁺ de hongos y levaduras
 - II.4.1. Modificación con Isotiocianato de Floresceína.
 - II.4.2. Modificación con reactivos para cisteínas.
 - II.4.3. Modificación con fenilglioxal y 2-butanodiona.
 - II.4.4. Modificación con dicitclohexilcarbodiimida.
 - II.4.5. Modificación con dietilpirocarbonato.
- II.5.** Importancia de las levaduras.
- II.6.** *Kluyveromyces lactis*. Taxonomía.
- II.7.** Utilización de *K luyveromyces lactis*

III. OBJETIVOS.

- III.1.** Objetivo general.
- III.2** Objetivos particulares.

V. MATERIALES Y METODOS

- IV.1.** Reactivos.
- IV.2.** Obtención de la membrana plasmática de levadura.
- IV.3.** Purificación de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.
- IV.4.** Ensayo de la actividad de la ATPasa de H⁺.
- IV.5.** Inhibición por reactivos específicos para sulfhidrilo.
- IV.6.** Efecto de Mg²⁺, Na⁺, K⁺ o MgADP sobre la ATPasa de H⁺ durante la inactivación por reactivos para sulfhidrilo.
- IV.7.** Efecto del pH sobre la inhibición con reactivos para sulfhidrilo.
- IV.8.** Modificación de la ATPasa de H⁺ por MMTS.
- IV.9.** Estequiometría de la reacción de la ATPasa de H⁺ con ¹⁴C-NEM.
- IV.10.** Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

V. RESULTADOS.

- V.1.** Purificación de la ATPasa de H⁺ de *Kluyveromyces lactis*.
- V.2.** Efecto de la N-etilmaleimida sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ de la de

K. lactis.

- V.2.1. Efecto de iones Na^+ y K^+ sobre la inactivación de la ATPasa de H^+ por NEM.
 - V.2.2. Efecto de iones Mg^{2+} sobre la inactivación de la ATPasa de H^+ mediada por NEM.
 - V.2.3. Efecto del pH sobre la inactivación de la ATPasa de H^+ mediada por NEM.
 - V.2.4. Efecto del MgADP sobre la inactivación de la H^+ ATPasa mediada por NEM.
 - V.2.5. Estequiometría de la reacción de NEM con cisteínas de la ATPasa de H^+ .
- V.3. Efecto de la yodoacetamida sobre la actividad de la ATPasa de H^+ . Modulación por NEM.
- V.4. Inactivación de la ATPasa de H^+ por IAEDANS. Modulación de la actividad por Mg^{2+} .
- V.4.1. Efecto del Mg^{2+} sobre la inactivación de la ATPasa de H^+ por IAEDANS.
 - V.4.2. Efecto del MgADP sobre la inactivación de la ATPasa de H^+ mediada por IAEDANS.
- V.5. Interacción del MMTS con la ATPasa de H^+ .
- V.5.1. Complejo ATPasa-MMTS. Modulación por NEM o IAEDANS.
 - V.5.2. Complejo ATPasa-MMTS. Efecto de concentración de IAEDANS
 - V.5.3. Complejo ATPasa-MMTS. Efecto de Mg^{2+} sobre la inactivación por IAEDANS.
 - V.5.4. La ATPasa de H^+ nativa y la ATPasa-MMTS. Efecto del pH sobre la inactivación por IAEDANS.

VI. DISCUSION.

- VI.1. Purificación de la ATPasa de H^+ .
- VI.2. Inhibición mediada por la NEM.
- VI.3. Interacción de la ATPasa de H^+ con el IAEDANS.
- VI.4. Inhibición del complejo de la ATPasa-MMTS con el IAEDANS.
- VI.5. Perspectivas

VII. CONCLUSIONES.

VIII. ABREVIATURAS.

IX. BIBLIOGRAFIA.

X. APENDICE.

I. RESUMEN.

La membrana plasmática de la levadura *Kluyveromyces lactis* contiene una ATPasa de protones similar a las ATPasas transportadoras de cationes de otros organismos eucariontes. La N-etilmaleimida (NEM), es un reactivo específico para grupos SH, ha sido utilizada en el estudio del posible papel de las cisteínas en la actividad catalítica de las enzimas. En este trabajo, utilizamos los reactivos metilmetano tiosulfonato (MMTS), N-etilmaleimida (NEM), yodoacetamida, y el ácido N-yodoacetil-N'-(sulfo-1-naftil) etilendiamina (IAEDANS), para explorar la reactividad de las cisteínas de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática de *K lactis*. La modificación de la enzima con los reactivos más voluminosos como la NEM y el IAEDANS inhibió a la ATPasa con cinéticas de pseudo-primer orden a tiempos cortos. La constante de inactivación de segundo orden para NEM fue un orden de magnitud mayor que la del IAEDANS. En ambos casos, la ATPasa de H⁺ se protegió parcialmente por el MgADP. La estequiometría de la reacción con NEM, utilizando ¹⁴C-NEM, indicó que tres residuos de cisteína fueron modificados por el reactivo y sólo uno de ellos fue protegido por el MgADP.

En contraste, la inhibición por yodoacetamida fue muy pobre (cerca del 10%), y con MMTS la enzima mantuvo su actividad. El bloqueo de los residuos de cisteína por MMTS se confirmó, pues el complejo enzima-MMTS fue resistente a la acción de la NEM o del IAEDANS. Estos resultados sugieren que ninguna de las cisteínas es esencial para la actividad de la enzima.

El estudio de la interacción de la enzima-MMTS con IAEDANS sugiere la presencia de otro residuo que participa en la reacción con el inhibidor. La independencia relativa de la reacción de

inhibición con respecto al pH permite suponer que este residuo corresponde a una metionina.

Los resultados obtenidos de la modificación química de las cisteínas de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática de *K lactis* por reactivos para sulfhidrilo se aparta del comportamiento descrito para otras ATPasas de la misma familia. Es probable que la diferencia de sensibilidad hacia reactivos para sulfhidrilo de esta ATPasa con respecto a la misma ATPasa de H⁺ en *N crassa*, sea debida a la diferente distribución de las cisteínas en la cadena de aminoácidos de cada una de estas ATPasas.

II. INTRODUCCION.

Las ATPasas de H^+ son proteínas integrales de la membrana. En la célula, estas ATPasas participan en dos tipos de reacciones: a) La síntesis de ATP durante la fosforilación oxidativa, catalizada por la ATPasa mitocondrial (F_1/F_0) y , b) la hidrólisis del ATP realizada por las V-ATPasas y P-ATPasas con el fin de generar un gradiente químico que se utiliza para el transporte de iones y otros metabolitos. Las ATPasas mitocondriales y las V-ATPasas (vacuolares) son enzimas de alto peso molecular (de 450-640 kDa) y están formadas por múltiples subunidades (Foster y Fillingame, 1979; Forgac, 1989). Por el contrario, las P-ATPasas (localizadas en la membrana plasmática), son de menor tamaño, y están formadas por una sola cadena polipeptídica de aproximadamente 100 kDa (Goffeau y Slayman, 1981; Bowman y Bowman 1986).

II.1. Las ATPasas de la membrana plasmática.

Las P-ATPasas son enzimas esenciales que se encargan de bombear iones hacia el exterior de la célula (Serrano y cols, 1986). Se encuentran en la membrana plasmática de bacterias (una ATPasa de potasio), hongos (una ATPasa de protones), en el retículo sarcoplásmico (una ATPasa de Ca^{2+}), en la mucosa gástrica (una ATPasa de H^+/K^+), en los glomérulos renales y la mayoría de las células de mamíferos (una ATPasa de Na^+/K^+) y en las plantas superiores (una ATPasa de protones) (Pedersen y Carafoli, 1987). A pesar de la diferencia que existe en la especificidad y estequiometría de los cationes transportados, esta familia de ATPasas comparte características comunes como son: a) están compuestas por una unidad catalítica de 100 kDa con 8-10 segmentos transmembranales, b) son fosforiladas transitoriamente por el ATP en un residuo de aspartato conservado en todas las P-ATPasas (Dame y Scarborough, 1980), c) durante el proceso catalítico

adquieren dos conformaciones, conocidas como E_1 y E_2 (Amory y cols, 1982) (Figura 1), y d) son inhibidas por concentraciones micromolares de ortovanadato (Bowman y cols, 1978). Además, son insensibles a 10 mM de azida de sodio y pueden ser inhibidas en su totalidad por cantidades micromolares de p-hidroximercuri benzoato (Goffeau y Slayman, 1981).

II.2. La H^+ ATPasa de la membrana plasmática de la levadura.

La ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de la levadura pertenece a la familia P de las ATPasas; constituye entre el 7-10% de las proteínas de la membrana plasmática y produce la hidrólisis de cerca del 25-40% del ATP total de la célula (Grandman y cols, 1978). El gradiente generado a través de la membrana por las ATPasas de H^+ se utiliza para la toma de nutrientes e iones, para la regulación del pH y para la generación de señales de transducción (Serrano, 1988).

El estudio de la ATPasa de H^+ se ha enfocado hacia la comprensión de la relación estructura-función y del fenómeno de transducción de energía. Esta enzima no se ha logrado cristalizar, por lo que, durante la última década, se han realizado grandes esfuerzos para producir un modelo que permita comprender el mecanismo por medio del cual se realiza la hidrólisis del ATP y el transporte de electrones.

II. 3. Modelo Topológico de la ATPasa de H^+ .

Las ATPasas de H^+ de la membrana plasmática de *Neurospora crassa* y *Saccharomyces cerevisiae* se han sido los principales modelos de estudio. Los datos obtenidos a través de la modificación química, proteólisis parcial, y estudios con anticuerpos (Pardo y Slayman 1988; Mandala y Slayman, 1989; Chang y Slayman, 1990) se han combinado con el alineamiento de las

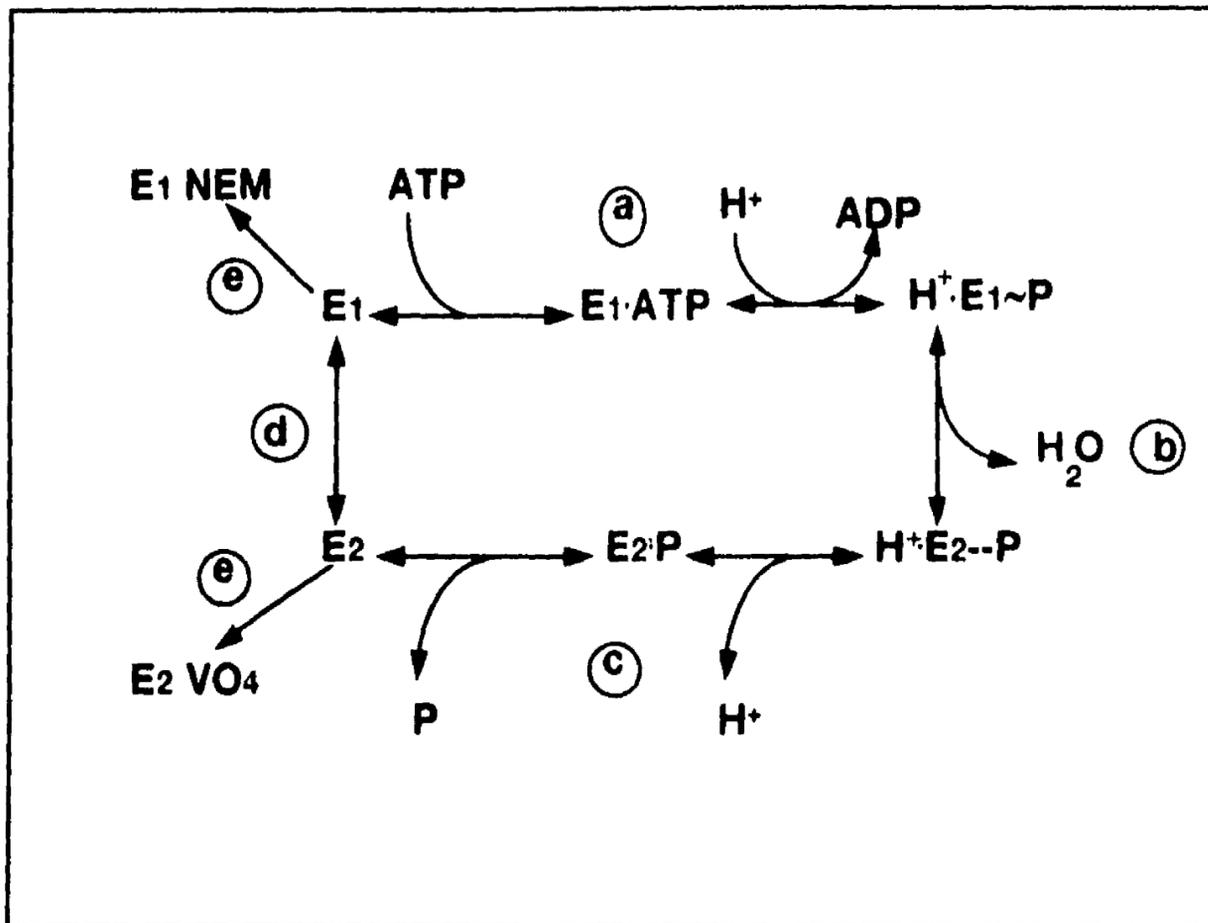


Figura 1. Ciclo catalítico de las P-ATPasas. Diagrama modificado de los pasos de reacción propuestos para la ATPasa de H⁺ de *Neurospora crassa* (Slayman y Zuckier, 1989): **a)** La enzima en la forma E₁ se une al ATP. Un protón del interior se une al sitio de reconocimiento para los protones, sale el ADP, y se forma un intermediario de alta energía. **b)** Una reacción de hidrólisis produce la formación del intermediario aspartil-fosfato, y se induce un cambio conformacional de la enzima a la forma E₂. **c)** La forma E₂ permite la salida del protón al otro extremo de la membrana y el P_i es liberado. **d)** La enzima, regresa de nuevo a su forma E₁ para iniciar un nuevo ciclo. En **e)** la enzima queda atrapada en su forma E₁ o E₂ por la NEM y el vanadato, respectivamente.

secuencias (Wach y cols., 1992), el análisis de hidropatía y la predicción de la estructura secundaria (Serrano 1988; Nakamoto y cols, 1989). Estos estudios han llevado a proponer el modelo topológico que se muestra en la figura 2.

En este modelo, propuesto para *Saccharomyces cerevisiae* (Serrano, 1988), la cadena polipeptídica está organizada en segmentos hidrofílicos que se alternan con segmentos hidrofóbicos. A partir del extremo amino terminal se encuentran cuatro segmentos transmembranales conectados por dos pequeñas asas extracelulares. Dos asas citoplásmicas centrales que se continúan hacia el extremo del carboxilo terminal a través de seis segmentos transmembranales (figura 2). La mayor parte de la cadena polipeptídica se encuentra en el citosol y contiene varios fragmentos importantes: el extremo amino terminal (formado por 120 residuos) y dos asas, una de 130 aminoácidos y otra de 340 residuos (Ghislain y cols, 1987). El asa menor se encuentra entre los segmentos transmembranales 2 y 3, y se considera que contiene la actividad de fosfatasa (Serrano y Portillo 1990). En el asa de 340 residuos se encuentra el dominio de fosforilación, que contiene el residuo de aspartato que se fosforila y lo que se considera como el sitio de unión con el nucleótido (Serrano, 1988; Taylor y Green, 1989, Rao y cols, 1989). Este segmento del asa corresponde a la región más conservada entre las ATPasas de tipo P (figura 2). Los extremos amino y carboxilo terminal están localizados en el citosol para las ATPasas de H^+ de *N crassa* y *S cerevisiae* (Mandala y Slayman, 1989; Serrano 1988). El segmento del amino terminal contiene en su mayoría aminoácidos ácidos cuya función se desconoce, mientras que en el segmento del carboxilo terminal se encuentra un dominio inhibitorio que interactúa con el sitio de unión para el ATP y está involucrado en la modulación de la actividad de la ATPasa por glucosa (Eraso y Gancedo 1987; Portillo y Serrano 1989; Portillo y cols 1989). Los segmentos hidrofóbicos fijan a la proteína en la membrana y se cree

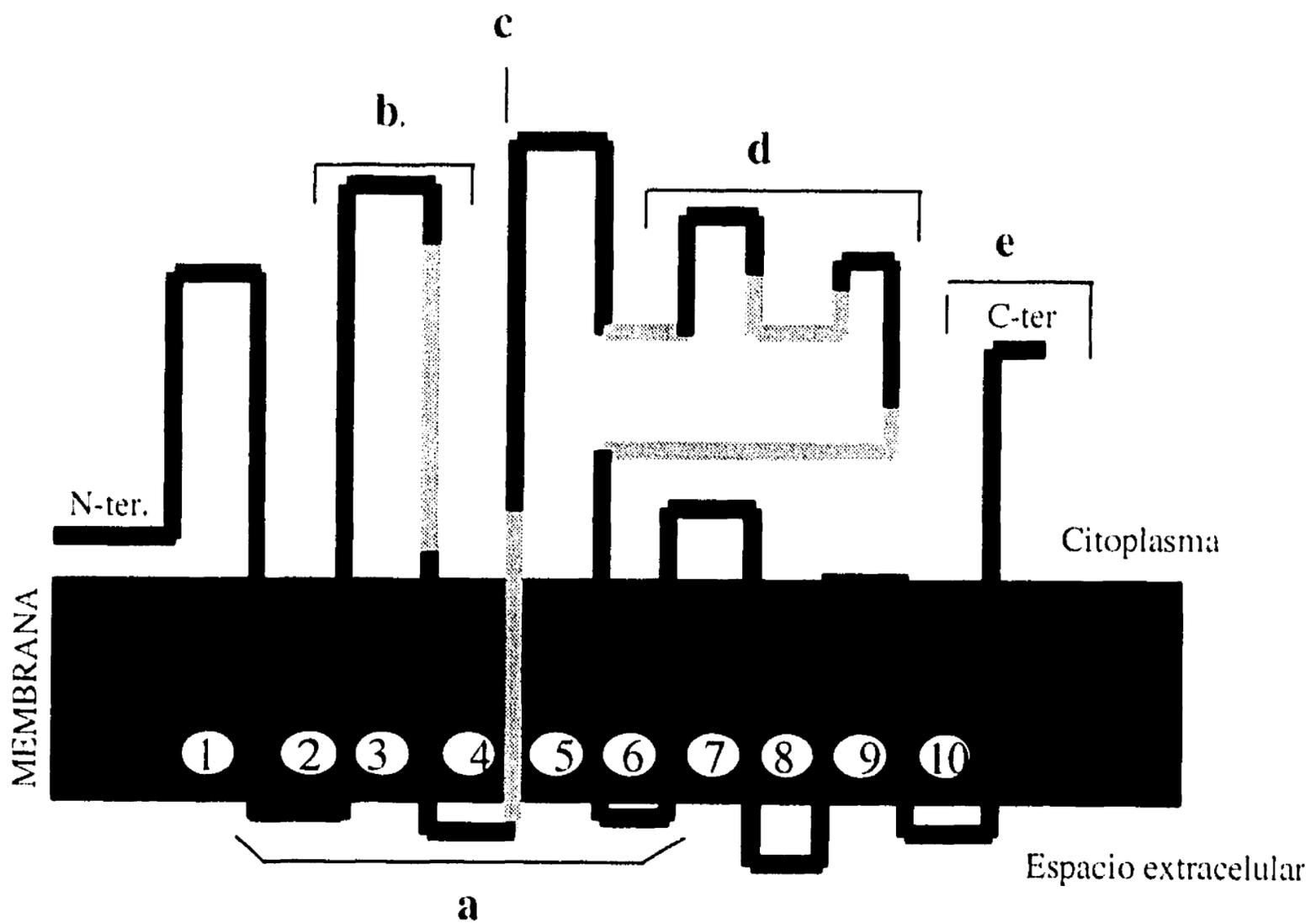


Figura 2. Modelo topológico de la H⁺ATPasa de *S. cerevisiae*. La figura es una adaptación del modelo propuesto por Serrano y Portillo (1990). Los segmentos transmembranales han sido numerados del 1 al 10 y contienen el canal para el protón (segmentos del 1 al 7); la porción citoplásmica contiene los siguientes dominios: **a)** entrada del canal por donde pasa el protón, **b)** dominio de fosfatasa, **c)** dominio de fosforilación y transducción, **d)** dominio de unión con el ATP y actividad de cinasa y **e)** dominio regulatorio.

que se encuentran ensamblados formando un canal a través del cual pasa el catión. El cuarto segmento transmembranal es el más conservado y se ha propuesto que forma parte de la ruta para la transducción de la energía (Shull y cols., 1985). Este modelo se ha utilizado para el análisis de la relación estructura-función a través de mutagénesis dirigida (Serrano y Portillo 1990).

En este sentido, los estudios con modificaciones químicas han proporcionado información sobre los aminoácidos esenciales para la actividad de esta enzima, pero no han sido completamente explotados, y podrían, junto con los estudios por mutagénesis dirigida, contribuir al esclarecimiento de la relación estructura-función de la ATPasa de H⁺.

II.4. Modificación química. Estudios realizados sobre las ATPasas de H⁺ de hongos y levaduras.

La modificación química puede definirse como cualquier alteración de la estructura covalente de una proteína producida por la introducción o eliminación de un grupo químico. Para que esto sea de utilidad, se requiere que la reacción química sea específica para un aminoácido. Los residuos de aminoácidos más reactivos son: el glutámico, el aspártico, la lisina, la arginina, la histidina, la cisteína, la tirosina y la metionina. Los de poca reactividad incluyen a la serina, la treonina, la asparagina y la glutamina. En contraste, los aminoácidos no polares son inertes a la mayoría de los agentes químicos (Imoto y Yamada, 1990).

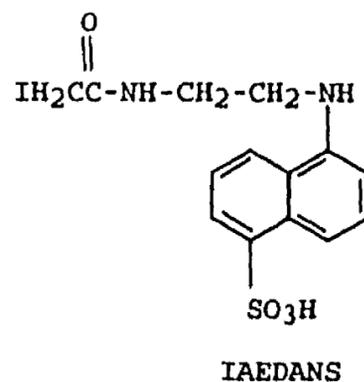
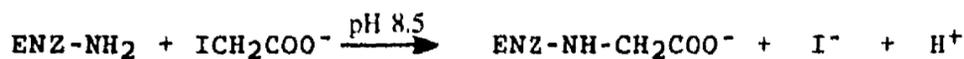
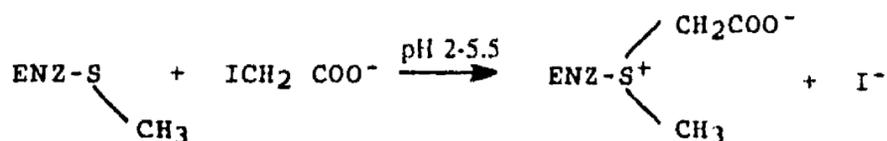
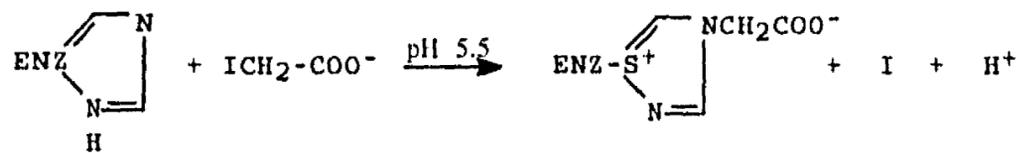
La modificación química es una herramienta poderosa, no sólo para identificar los aminoácidos esenciales para la actividad de una enzima, sino también para sondear el microambiente en el que se encuentra el residuo (Young y Kaplan, 1990). Cuando se conoce la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica se puede conocer el residuo que ha sido modificado.

Utilizando la modificación química en la ATPasa de H⁺ de *N crassa* y *S cerevisiae*, se han identificado algunos residuos que están relacionados con la unión del nucleótido, ya que se encuentran localizados en el segmento hidrofílico central y la actividad se protege por ATP (o ADP) (Addison y Scarborough, 1986; Davenport y Slayman, 1988; Pardo y Slayman, 1989). Los reactivos utilizados en los estudios de modificación química de la ATPasa de H⁺ son los siguientes:

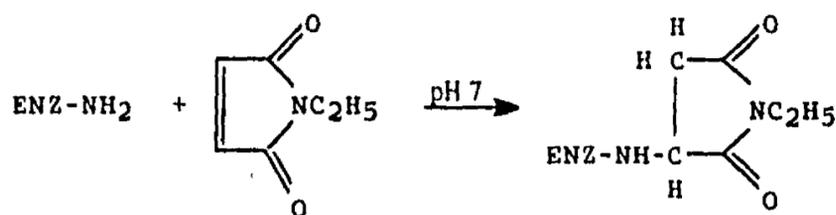
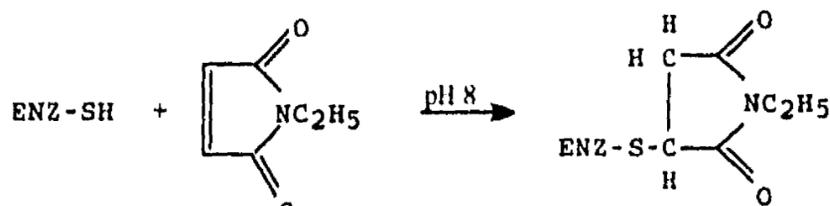
II.4.1. Modificación con isotiocianato de fluoresceína (FITC). El FITC reacciona con los grupos ε-amino de las lisinas. En *N crassa*, el FITC produce la inactivación irreversible de la enzima. La cinética de inactivación es de pseudo primer-orden en los primeros diez minutos, depende del pH y de la concentración de Mg²⁺. El Mg-ADP protege parcialmente contra la inhibición por FITC, lo cual sugiere que hay dos tipos de lisinas reactivas: la que se protege por la presencia de Mg-ADP (lis474), y aquella cuya reactividad no se altera por la presencia del nucleótido (Pardo y Slayman, 1989). Se ha propuesto que la lisina 474, residuo con el que reacciona el FITC, interactúa con la adenosina del ATP en el sitio activo de la enzima (Bowman y cols, 1978); también se le considera como un estabilizador electrostático del intermediario que se forma con el ATP durante la catálisis (Pardo y Slayman, 1988).

II.4.2. Modificación con reactivos para Cisteínas. Entre los reactivos más comunes utilizados para la modificación de las cisteínas se encuentran: yodoacetamida y sus derivados como el ácido N-yodoacetil-N'-(sulfo-1-naftil) etilén diamino (IAEDANS), N-etilmaleimida (NEM) y metilmetanotiosulfonato (MMTS) (Brocklehurst, 1979). Los derivados de yodoacetamida son muy estables en las condiciones que se usan para producir la proteólisis y durante el análisis de

A. Reaccion con yodoacetato (o IAEDANS).



B. Reaccion con N-etilmaleimida



C. Reaccion con Metilmetano tiosulfonato.

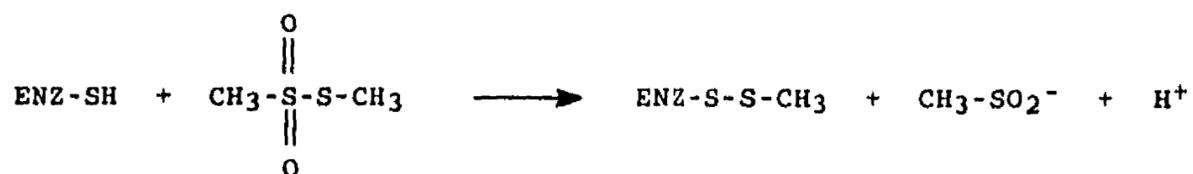


Figura 3. Reacciones de los reactivos para sulfhidrilo utilizados para el estudio de las cisteínas.

Los agentes alquilantes son el IAEDANS (A) y la NEM (B); El IAEDANS es un derivado del yodoacetato con características fluorescentes. C) El metilmetano tiosulfonato reacciona a través de un intercambio tiol-disulfuro, y discrimina eficientemente en favor de los grupos tioles.

aminoácidos (Bell y Bell, 1988). La reacción de los residuos de cisteína con estos reactivos se muestra en la figura 3.

La ATPasa de H^+ de *Neurospora crassa* posee ocho cisteínas (Hager y cols, 1986); la inhibición con NEM es irreversible, sigue una cinética de pseudo-primer orden (Brooker y Slayman, 1982) y la enzima se protege con MgATP. Con ^{14}C -NEM se logró identificar dos cisteínas: la cisteína "rápida", que reacciona rápidamente con NEM y no se protege por MgADP, y la cisteína "lenta", que reacciona lentamente y cuya modificación resulta en la inhibición de la enzima, y puede ser bloqueada por MgADP (Davenport y Slayman, 1988; Pardo y Slayman, 1989). Se ha concluido que estas cisteínas se encuentran en un medio hidrofóbico porque la yodoacetamida, que es un reactivo hidrofílico, no causa inhibición y el pKa para la cisteína "lenta" es mayor de 9. Adicionalmente, estos dos sitios reaccionan con inhibidores hidrofóbicos como lo son: N-pirenilmaleimida, N-naftilmaleimida y ditiobisnitrobenzoato (Davenport y Slayman, 1988). La reacción de estas cisteínas con reactivos menos voluminosos como el metilmetano tiosulfonato (MMTS), no inactiva a la ATPasa de H^+ lo que indica que no son esenciales para la actividad de la enzima. La inactivación causada por la NEM, por tanto, parece ser de carácter estérico.

La fluorescencia de reactivos como el IAEDANS ha sido aprovechada para la identificación de las cisteínas reactivas (Pardo y Slayman, 1989). Este reactivo forma complejos covalentes estables con las cisteínas hidrofílicas de la enzima. Los péptidos trípticos de la enzima marcados con IAEDANS se purificaron por HPLC y fueron secuenciados. Se identificó a la cisteína "rápida" como la 545 y a la cis 532 como la cisteína "lenta" que se protege por MgADP. Ambos residuos se encuentran cerca del dominio de fijación para el MgATP, lo que explica la protección de la cisteína lenta por el MgADP. Sólo en *N crassa* ha sido posible identificar la cisteína que se protege por el

nucleótido.

En general, la alquilación por NEM de las cisteínas de las ATPasas tipo P procede con cinética de pseudo primer orden, lo cual sugiere la participación de un residuo (o varios, cinéticamente iguales), cuya modificación que ocasiona la pérdida completa de la actividad. Sin embargo, en experimentos de protección con MgATP o MgADP en contra de la inactivación por NEM, la protección puede ser total, como sucede en la ATPasa de H⁺ de *N. crassa*, en la ATPasa de [Na⁺/K⁺] y en la ATPasa de Ca²⁺ (Brooker y Slayman, 1982; Winslow, 1981; Panet y Selinger, 1970) o parcial, como en el caso de la ATPasa de H⁺ de raíz de avena (Katz y Sussman, 1987). Estos resultados sugieren que existe alguna diferencia en la posición de las cisteínas, que manifiesta una accesibilidad diferente de las cisteínas debido a un cambio conformacional ocasionado por la entrada del nucleótido (Winslow 1981).

II.4.3. Modificación con fenilglioxal y 2-butanodiona. Estos reactivos reaccionan con las argininas (Lundbald y Noyes, 1984). En *N. crassa*, la ATPasa de H⁺ se inactiva por fenilglioxal y 2-butanodiona con una cinética de pseudo-primer orden (Kasher, 1986), se protege por MgADP y la inhibición se acelera por iones Mg²⁺.

La protección ejercida por el MgADP contra la inhibición por fenilglioxal o 2-butanodiona puede deberse a cambios conformacionales de la enzima inducidos por el nucleótido. Alternativamente, la arginina reactiva puede encontrarse en el sitio de fijación del MgADP y el nucleótido produce un impedimento estérico que evita la reacción de la ATPasa de H⁺ con el fenilglioxal o la butanodiona. La estequiometría de la reacción indica que dos moles de fenilglioxal reaccionan con cada ATPasa de H⁺ para producir 100% de inactivación. No ha sido posible identificar a esta arginina en la estructura primaria de la enzima.

II.4.4. Modificación con dicitohexilcarbodiimida. Este reactivo reacciona con los grupos carboxilo de las cadenas laterales del ácido aspártico o glutámico. Se ha utilizado para inhibir ATPasas P, V y F (Pedersen y Carafoli, 1987). La inhibición está relacionada con la translocación del protón o ion (Sussman y Slayman, 1983). En *N crassa*, la ATPasa de H⁺ se inactiva por DCCD, con una cinética de pseudo-primer orden. La inhibición completa de la enzima ocurre con una estequiometría de 0.4 moles de DCCD por mol de monómero de ATPasa. El residuo de aminoácido que reacciona con el DCCD para producir la inhibición, es el glutámico 129, que se localiza en el extremo amino terminal, a la mitad del primer segmento hidrofóbico que atraviesa la membrana. Es probable que este residuo forme parte del canal de protones de la enzima (Sussman y cols, 1987).

Otro reactivo para carboxilos que se ha utilizado es el N-(etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinoleina) (EEDQ). En *N crassa* este reactivo inhibe irreversiblemente la hidrólisis del ATP con una cinética de pseudo primer orden y una estequiometría de 1 mol de EEDQ por mol de ATPasa. La reacción con EEDQ ocurre con un pKa cercano a 7, propio de un carbonilo en un ambiente hidrofóbico. La inhibición probablemente involucra la activación de un grupo carboxilo seguido por un ataque nucleofílico por un grupo funcional vecinal de la cadena polipeptídica, y la producción de un entrecruzamiento intramolecular (posiblemente entre un carboxilo y una lisina vecinal). La enzima se protege de la inhibición por el EEDQ con el MgATP y el vanadato, combinación que mantiene a la enzima en la forma E₂, pero no con el MgADP. Esto sugiere que uno (o ambos) de los residuos involucrados en la reacción de entrecruzamiento participan en la transferencia del fosfato gamma del ATP (Addison y Scarborough, 1986).

II.4.5. Modificación con Dietilpirocarbonato (DEP). Este reactivo reacciona con residuos de histidina a pH neutro o ligeramente ácido, produciendo inhibición de la ATPasa de H⁺ de *N crassa*

(Morjana y Scarborough, 1989). La inhibición por DEP es muy rápida ($k = 385\text{-}420 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$), y sigue una cinética de pseudo primer orden; la inactivación se previene por MgADP, lo que sugiere que el residuo se encuentra localizado cerca del sitio de unión del nucleótido. La posición de la histidina reactiva no se identificó en este estudio.

II. 5. Importancia de las levaduras.

Las levaduras han sido utilizadas por el hombre, desde tiempos antiguos, en procesos fermentativos. Algunas levaduras tienen una larga historia en la producción de fármacos y derivados alimenticios para el humano. Los productos obtenidos de las levaduras carecen de los problemas de pirógenos o endotoxinas que se derivan del uso de células procarióticas, además de abatir los costos de producción a escala industrial (Swinkels y cols, 1993). Por otra parte, por ser eucarionte, las levaduras realizan los mismos procesos postranscripcionales y modificaciones que ocurren en la célula de mamíferos.

Las técnicas de recombinación de DNA desarrolladas en la actualidad y la universalidad del código genético a través del reino animal y vegetal, proporciona la oportunidad de lograr la expresión de genes heterólogos. *Saccharomyces cerevisiae* ha sido utilizado como modelo de estudio debido a la facilidad de su manipulación genética y su uso a escala industrial. Sin embargo, el sistema de *S cerevisiae* tiene limitaciones, como son la baja productividad y la secreción ineficiente (Kingsman y cols., 1987), hiperglicosilación (Innis, 1989), inestabilidad de las cepas y dificultades con fermentaciones de alta densidad (da Silva y Bailey, 1991a; 1991b). Algunas de estas limitaciones han podido superarse a través de la biología molecular (Fleer, 1992). Una alternativa más es el uso de otras levaduras como sistemas de expresión, cuyas características favorezcan altos niveles de

secreción y/o una fuerte regulación por promotores. Existen cerca de 600 especies de levaduras que no han sido exploradas para usos industriales (Swinkels y cols., 1993). Un ejemplo de ello representa el uso de la levadura *Kluyveromyces lactis*, que se utiliza a escala industrial para la producción de lactasa (Hussein y cols, 1989). Esta levadura es pariente cercano de *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que se pueden aplicar las mismas técnicas de genética molecular, con la ventaja de tener buenos niveles de secreción, baja glicosilación y vectores episomales estables de 2 μ m (Falcone y cols, 1986).

II.6. *Kluyveromyces lactis*. Taxonomía.

La levadura que conocemos como *Kluyveromyces lactis* originalmente se le nombró como *Saccharomyces lactis*. Sin embargo, debido a que *K lactis* no entrecruza con *S cerevisiae*, la especie se agrupó bajo el género de *Kluyveromyces* en 1965 y se le renombró como *Kluyveromyces lactis* (van der Walt, 1970). Posteriormente, en 1984, se reclasificaron las especies y se clasificó como *Kluyvermyces marxianus* var. *lactis*. Por simplicidad se le continúa nombrando como *Kluyveromyces lactis* (van der Walt y Johannson, 1984).

II.7. Utilización de *Kluyveromyces lactis*.

La habilidad de *K lactis* para utilizar a la lactosa como fuente de carbono ha permitido la producción industrial de β -galactosidasa, enzima utilizada en preparaciones comerciales de lácteos bajos en lactosa, que son empleadas en poblaciones intolerantes a este azúcar (Hussein y cols, 1989).

Independientemente del aspecto industrial, *Kluyveromyces lactis* ha sido explorada a nivel genético (Brunner y cols., 1973; Celis y cols., 1975; Johnston y cols., 1988) y también se conocen

los efectos de ciertos inhibidores sobre la biogénesis de las mitocondrias (Del Giudice y Brunner, 1977), la actividad de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa (Brunner y cols, 1987; Brunner y cols, 1977; Brunner y Tuena de Cobos, 1980).

En este trabajo, utilizamos levaduras de *Kluyveromyces lactis* para el estudio de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática. El gene *pmal* que codifica para la ATPasa de H⁺ de *K lactis* ha sido clonado (Miranda y cols, 1995). La comparación de las secuencias alineadas del gene *pmal* de la ATPasa de H⁺ de *K lactis* y *S cerevisiae* muestran una similitud del 93% y una identidad del 85% . Adicionalmente, ambas ATPasas contienen 9 residuos de cisteína en su molécula, prácticamente en la misma posición, con la excepción de la C312 en *S cerevisiae* y la C840 en *K lactis*.

En experimentos preliminares en nuestro laboratorio, observamos que una ventaja más de utilizar *K lactis* sobre *S cerevisiae*, es la de tener un mejor rendimiento de membrana plasmática y mayor actividad específica de la enzima purificada. Debido a la gran similitud entre las ATPasas de H⁺ de *S cerevisiae* (Wach y cols 1992) y *K lactis* (Miranda y cols. 1995) los resultados obtenidos con una pueden ser válidos para las otra enzima.

III. OBJETIVOS.

III.1. Objetivo General.

Caracterizar el papel que juegan las cisteínas en la actividad de la ATPasa de H^+ de la membrana plasmática de *Kluyveromyces lactis* a través de su modificación con reactivos específicos para grupos sulfhidrilo.

III.2. Objetivos particulares.

1. Estudiar la cinética de inhibición de la ATPasa de H^+ con a los siguientes reactivos específicos para grupos sulfhidrilo: N-etilmaleimida, yodoacetamida, IAEDANS y metilmetano tiosulfonato.
2. Estudiar el efecto de los iones monovalentes y divalentes sobre la inhibición de la ATPasa de H^+ por los reactivos para sulfhidrilo.
3. Estudiar la protección específica por el MgADP contra la inhibición mediada por los reactivos para sulfhidrilos.
4. Determinar la estequiometría de la inactivación de la ATPasa con la NEM.

IV. MATERIALES Y METODOS.

IV.1. Reactivos.

Todos los reactivos utilizados en los experimentos fueron de grado analítico. Los reactivos para sulfhidrilos: N-etilmaleimida (NEM), metilmetanotiosulfonato (MMTS), el ácido N-yodoacetil-N'-(sulfo-1-naftil) etilén diamino (IAEDANS), y otros reactivos y enzimas como la piruvato cinasa, ATP monosódico (libre de vanadato), ADP disódico, fosfoenol piruvato (sal de monociclohexil amonio), N-2-(hidroxietil) piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico) (Hepes), ácido piperazina-N-N'-bis [2-etanosulfónico] (Pipes), ácido etilén glicol-bis-(β -aminoetil eter) N,N,N',N'-tetra acético (EGTA), azida de sodio, 2-mercaptoetanol, asolectina, ácido etilén diamino tetra acético (EDTA), desoxicolato de sodio (DOC), ácido 3-(1,1-dimetil-2-hidroxietil) amino-2-hidroxiopropilén sulfónico (AMPSO), y la Liticasa, Zimoliasa se obtuvieron de Sigma St. Louis Mo. EUA. El detergente Zwittergent 3-14 se obtuvo de Calbiochem, USA. Las sales de $MgSO_4$ y NaCl se adquirieron de J.T. Baker de México. Las membranas para transferencia PVDF (membranas de difluoruro de polivinilideno) se adquirieron de Millipore Co. EUA. La ^{14}C -N-etilmaleimida se obtuvo de NEN research products, Dupont Co. Wilmington DE, EUA.

IV.2. Obtención de la membrana plasmática de la levadura.

Se utilizaron levaduras de *Kluyveromyces lactis* cepa WM27. Se incubaron en un litro de medio estéril que contenía peptona 5%, extracto de levadura al 5% y glucosa al 10%, durante aproximadamente 20 hs a 30°C. Las levaduras se cosecharon al final de la fase logarítmica por centrifugación a 3 500xg durante 5 min a 4°C; se lavaron con agua bidestilada y se centrifugaron de

nuevo en las mismas condiciones. Se determinó el peso húmedo de las levaduras (rendimiento promedio: 14 g/l) y se resuspendieron a una relación de 200 g/l en una solución amortiguadora que contenía: sorbitol 1 M pH 7.4, con K_2HPO_4 50 mM, EDTA 1mM y 2-mercaptoetanol 5 mM y que se ajustó a pH 7.4 con tris. Las levaduras se incubaron por 10 minutos a 30° C y se adicionó la Liticasa (500 u/g de levadura), o Zimoliasa (0.6mg/g de levadura). Se incubaron a las levaduras con la enzima por 60 minutos a 30° y luego se adicionó el p-metil-sulfonil-fluoruro 1 mM para inhibir la actividad de las proteasas. La suspensión se sonicó a intervalos de 15 seg, por cuatro veces (1 min en total), a 4°C. El material insoluble, (células intactas, núcleos y mitocondrias) se sedimentó en una centrífuga Sorvall RC5B refrigerada a 15,000 xg durante 10 minutos a 4°C, en un rotor GSA; el sobrenadante que contenía las membranas plasmáticas, se centrifugó nuevamente a 30 000xg durante 45 min a 4 °C y el sedimento se resuspendió en EGTA-Tris 1 mM pH 7.2 en el volumen original con el propósito de lavar las membranas. Finalmente, las membranas plasmáticas se sedimentadas por centrifugación a 30 000 xg durante 75 min a 4°C y se resuspendieron en un volumen mínimo de EGTA-Tris 1 mM pH 7.2, y se separaron en alícuotas que se mantuvieron a -70° C hasta su utilización. En cada preparación de membrana plasmática, la contaminación mitocondrial se determinó por la relación de la actividad de ATPasa a pH de 6.25 en presencia de azida de sodio y la diferencia de actividades de ATPasa a pH 8 en ausencia y presencia de azida, de sodio. En una preparación típica de membrana plasmática, la contaminación mitocondrial es del orden del 5% . La actividad de la ATPasa de H⁺ en la membrana plasmática fue de 1.5-4 $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$

IV.3. Purificación de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática.

La purificación de la ATPasa de la membrana plasmática de *K lactis* se realizó siguiendo el

método descrito por Bowman (1981), con las siguientes modificaciones: la membrana plasmática se diluyó a 2 mg/ml con el amortiguador A (tris 75 mM pH 7.2, KCl 0.6 M, y EDTA 6 mM) y EGTA 1 mM ajustado a pH 7.2 con tris. Se adicionó el desoxicolato de sodio (DOC) hasta alcanzar una concentración final de 0.09% (p/v). El DOC se añadió lentamente con la muestra en agitación constante a 4°C, y se incubó durante 10 min.; este paso es crítico debido a que la relación DOC/proteína determina la efectividad del lavado y el rendimiento. La preparación se centrifugó a 100 000xg durante 1 h a 4°C en una ultracentrífuga Beckman refrigerada. En este paso el sobrenadante (SN₁) se descartó y la pastilla sedimentada (P₁) se resuspendió en un volumen pequeño (< 10 ml) en el amortiguador B (KCl 0.3M, glicerol 45%, EDTA 2 mM Tris 25 mM pH 7.5) y se homogenizó utilizando un vástago de teflón (Potter- Evillheim). En este paso, la concentración de la proteína se determinó por el método de Lowry modificado por Bensadoun y Weinstein (1976). La concentración de proteína de P₁ se ajustó a 6.5 mg/ ml con el amortiguador B y se adicionó asolectina al 10% hasta alcanzar una concentración final de 5 mg/ml. Se añadió el Zwittergent 3-14 lentamente hasta obtener una relación final Zwittergent/proteína (p/p) de 0.85. La suspensión se homogenizó en un homogenizador de vidrio con 4-5 golpes con vástago de teflón, manteniéndola en baño de hielo. La preparación se centrifugó a 100 000xg durante 1 h a 4°C (rotor 60Ti) en una ultracentrífuga Beckman refrigerada. El sobrenadante (SN₂) se centrifugó nuevamente sobre un gradiente de glicerol discontinuo (65%, 60%, 55% y 50% de glicerol en Tris 10mM pH 7, EDTA 1 mM, 0.1% desoxicolato, 1 mg asolectina/ml) a 100 000xg por 14 h a 2°C en un rotor 60 Ti. Aproximadamente la mitad superior del sobrenadante se descartó, y el resto se diluyó al 50 % con EGTA-Tris 1 mM pH 7. La suspensión se centrifugó a 100 000xg por dos horas. El sedimento, que contiene la ATPasa de H⁺, se resuspendió en un volumen pequeño de EGTA-Tris 1mM pH 7.2 y se

mantuvo congelado a -70°C en alícuotas de $100\ \mu\text{l}$ hasta su uso. En un experimento típico a partir de $180\ \text{g}$ de membrana plasmática, se obtuvieron $10\text{-}15\ \text{mg}$ de ATPasa con una actividad específica de $25\text{-}30\ \mu\text{mol Pi}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

IV.4. Ensayo de la actividad de la ATPasa de H^+ .

La mezcla de reacción para el ensayo de la actividad de la ATPasa contenía los siguientes reactivos: ATP $5\ \text{mM}$ (Na_2ATP), MgSO_4 $5\ \text{mM}$, MES $10\ \text{mM}$, azida de sodio $5\ \text{mM}$ y fosfoenol piruvato $5\ \text{mM}$, y se ajustó el pH a 6.25 con NaOH . Como sistema regenerador del ATP, se adicionó piruvato cinasa de músculo de conejo ($21\ \mu\text{g}/\text{ml}$ resuspendida en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por lo que la concentración final de NH_4^+ en el ensayo es de $22\ \text{mM}$. Se diluyeron alícuotas de $5\text{-}10\ \mu\text{l}$ de la ATPasa incubada con el reactivo para sulfhidrilo en $250\ \mu\text{l}$ de la mezcla de reacción para ATPasa y se dejaron reaccionar durante $10\ \text{min}$ a 30°C . La reacción de ATPasa se detuvo por la adición de $50\ \mu\text{l}$ de ácido tricloroacético al 30% (concentración final 6% p/v) y los tubos se colocaron en un baño de hielo para evitar la hidrólisis del ATP. La concentración de fosfato inorgánico se determinó por el método de Fiske-Subarow (1925), que consiste en la formación de un complejo de molibdato-fosfato (de color amarillo) que se reduce con el sulfato de p-metil amino fenol (ELON), y produce una coloración azul. La coloración del complejo reducido se confirmó por la absorción de la luz a una longitud de onda de $660\ \text{nm}$. Se hizo una curva patrón de fosfato por duplicado en cada determinación.

IV.5. Inhibición por reactivos específicos para sulfhidrilo.

Para los experimentos cinéticos con N-etilmaleimida, metilmetanotiosulfonato, yodoacetamida

e IAEDANS, la ATPasa de H⁺ (0.5-0.6 mg/ml) se resuspendió a 30°C, durante 2-5 min en un amortiguador Hepes/NaOH 50 mM pH 7.5 con MgSO₄ 1 mM, volumen final 50µl; En todos los casos, los inhibidores se adicionaron de una solución recién preparada: NEM, MMTS y la yodoacetamida se disolvieron en agua destilada. El IAEDANS se disolvió en Hepes 150 mM pH 7.5. La reacción de inhibición se inició con la adición del reactivo para sulfhidrilos y la mezcla de ATPasa se mantuvo a 30°C. Se tomaron alícuotas de 5-10 µl a diferentes intervalos y se diluyeron 50 veces en la mezcla para ensayo de la actividad de ATPasa. El fosfato liberado se determinó como se mencionó anteriormente. Para obtener líneas rectas, se graficó, en escala semilogarítmica el porcentaje de la actividad residual contra el tiempo. La pendiente de cada línea corresponde a la constante a la constante de velocidad inicial de inactivación (k). Las constantes de inactivación específicas para cada concentración de inhibidor, se graficaron contra la concentración del inhibidor para obtener los valores de la constante de segundo orden de la reacción de inactivación (Bell y Bell, 1988).

IV.6. Efecto del Mg²⁺, Na⁺, K⁺ o MgADP sobre la ATPasa de H⁺ durante la inactivación por reactivos para sulfhidrilos.

En estos experimentos, la enzima (0.6 mg/ml) se resuspendió en Hepes 50 mM pH 7.5 en presencia de diferentes concentraciones de MgSO₄, Na⁺, K⁺ o MgADP y se preincubó a 30°C por 5 min. Se inició la reacción de inactivación con la adición del reactivo para sulfhidrilos a la concentración indicada en cada experimento. En experimentos en los que no se midió la participación del sodio, la concentración de este ión se ajustó a 100 mM con la adición de NaCl. Se tomaron alícuotas y la determinación de la actividad residual se realizó como se indicó anteriormente.

IV.7. Efecto del pH sobre la inhibición con reactivos para sulfhidrilos.

Con el fin de determinar la dependencia de la reacción con respecto a la concentración de protones, primero se estimó la estabilidad de la actividad enzimática a valores de pH mayores que 7.0. La enzima (0.6mg/ml) se incubó a 30°C en amortiguador Hepes o AMPSO 50 mM al pH indicado, en presencia de MgSO₄ 1 mM. Se tomaron alícuotas de 5-10 µl a diferentes tiempos y se diluyeron en la mezcla para ensayo de actividad de ATPasa. La actividad de la enzima se determinó como se indicó arriba.

Para determinar el efecto del pH en la inhibición de la ATPasa por la N-etilmaleimida, la enzima se incubó en los siguientes amortiguadores: Hepes (pH 6.5, 7.0, 7.5, 8.0) o AMPSO (pH 8.5, 9.0, 9.5, 10.0), 50 mM con MgSO₄ 1 mM al pH indicado. La reacción de inhibición se inició por la adición de NEM (0.2-0.5 mM) y la actividad residual se determinó como se indicó arriba.

Para la inhibición por IAEDANS, la enzima se incubó, dependiendo del pH, en 50 mM de los siguientes amortiguadores: Mes a pH 5.5, 6.0 y 6.5; Pipes a pH 6.5 y 7.0, y Hepes a pH 7.25, 7.5, 8.0 y 8.3. La concentración de Mg²⁺ libre se ajustó a 1 mM por la adición de MgSO₄. El IAEDANS, a una concentración de 100 mM se disolvió en agua con la ayuda de 2 µl de KOH 5 N. El pH de la solución stock del inhibidor fue de 10-11, pero su adición a la mezcla de incubación no modificó el pH final. La concentración final del IAEDANS en estos experimentos fue de 10 mM.

IV. 8. Modificación de la ATPasa de H⁺ por MMTS.

La ATPasa de H⁺ se incubó en presencia de MMTS 5 mM. La mezcla de incubación contenía Hepes 50 mM, pH 7.5, MgSO₄ 1 mM y ATPasa a una concentración de 0.5-1 mg/ml. La reacción se inició por la adición de MMTS 5 mM recién preparado y se incubó a 30°C durante 40 min. La reacción se detuvo por filtración a través de columnas de Penefsky (1977) que contenían Sephadex

G-50 equilibradas con Hepes 50 mM pH 7.5. La enzima modificada se utilizó de inmediato en los experimentos de inhibición con NEM, IAEDANS, y para analizar el efecto del Mg^{2+} sobre la inhibición con IAEDANS.

Para los experimentos de pH con la ATPasa modificada con MMTS, 2 mg de la enzima fueron resuspendidos en Hepes 50 mM, pH 7.5, $MgSO_4$ 1 mM y 5 mM de MMTS durante 40 min a 30°C. Para detener la reacción, la mezcla se diluyó 10 veces con 10 mM Hepes 50 mM, pH 7.5, glicerol 10% y asolectina 1mg/ml. La suspensión resultante se centrifugó a 100 000xg por 60 min a 4°C. La pastilla sedimentada fue resuspendida en EGTA 1 mM-Tris pH 7.25 con asolectina al 1mg/ml La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (1951) y la actividad se midió como se describe en Materiales y Métodos. La actividad específica de la ATPasa-MMTS fue de 18.0 $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$

IV.9. Estequiometría de la reacción de la ATPasa de H^+ con ^{14}C -NEM.

La ^{14}C -N-etilmaleimida (actividad específica 39 mCi/mmol) se transfirió de pentano a agua por la adición de 500 μl de agua al solvente original. La muestra se sometió a evaporación con una corriente de nitrógeno. La recuperación de la ^{14}C -N-etilmaleimida fue de 85-90%.

La mezcla de reacción típica contenía Hepes 50 mM, pH 7.5, $MgSO_4$ 1 mM, y la ATPasa 0.6 mg/ml, en presencia o ausencia de MgADP 10 mM. La reacción de inhibición se inició por la adición de ^{14}C -NEM 360 μM (39mCi/mmol) en un volumen final de 1.25 ml. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de 5 μl para la determinación de la actividad residual de la ATPasa y de 70 μl que se diluyeron en 3 ml con Hepes 50 mM, pH 7.5, ditiotreitól (DTT) 50 mM. La proteína se recuperó por centrifugación a 100 000 xg por 1 h a 4°C y se resuspendió en un pequeño volumen de SDS al

1 % y DTT 50 mM. La preparación se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970), y el gel se tiñó y destiñó como se indica abajo. La concentración de proteína asociada a la banda de la ATPasa se determinó de acuerdo con el método de Ball (Ball, 1986). Las bandas se cortaron e incubaron por 24 h a 37°C en 1 ml de SDS al 3%, isopropanol al 50% . El Coomassie eluido se leyó a 595 nm. Paralelamente se estableció una curva patrón con albúmina de suero de bovino preparada bajo las mismas condiciones experimentales. La medición de la radiactividad asociada a la ATPasa se realizó en los segmentos del gel que contenían a la ATPasa. Estos se colocaron en un vial de vidrio y se incubaron a 80°C en 1 ml de H₂O₂ al 30 % hasta su disolución completa. La radioactividad se midió en 10 ml de líquido de centelleo. Para determinar la incorporación máxima de ¹⁴C-NEM a la enzima, la ATPasa de H⁺ se desnaturizó con SDS al 1% y se incubó en presencia de ¹⁴C-NEM 1 mM durante 3 h a 30°C, y se trató como se describió arriba.

IV.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

La electroforesis se realizó de acuerdo con el método de Laemmli (1970). El gel separador consistió de acrilamida al 10%, bisacrilamida al 0.27%, tris/HCl 0.5M, pH 8.8 y SDS al 0.1%. El gel concentrador contenía acrilamida al 4%, bisacrilamida al 0.1%, Tris/HCl 0.125 M pH 6.8 y SDS al 0.1%. La polimerización se inició con la adición de persulfato de amonio al (0.067%) y TEMED (0.33%). El amortiguador de corrida contenía glicina 0.2M, Tris 25mM, SDS al 0.1% y tioglicolato 1 mM. Los geles se corrieron a 100 V por 3 h y se tiñeron con una solución de azul de Coomassie al 0.25%, metanol al 40% y ácido acético glacial al 7%; la destinción de los geles se realizó con una solución de metanol al 40% y ácido acético al 7%. Los geles se secaron y se realizó la autoradiografía por 3-4 días a -70°C con una película Kodak X-Omat, o se procesaron para la determinación de

proteína y radiactividad como se describió anteriormente.

V. RESULTADOS.

V.1. Purificación de la ATPasa de H⁺ de *Kluyveromyces lactis*.

Una preparación típica de ATPasa de H⁺ purificada por el método descrito mostró el patrón electroforético que se muestra en la figura 4. La pureza de la preparación, determinada por densitometría del gel de poliacrilamida con SDS fue de alrededor de un 70%. La actividad específica fué de 25-30 $\mu\text{molas Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Esta preparación se utilizó para los experimentos cinéticos de modificación con reactivos específicos para sulfhidrilo. Para los experimentos de estequiometría de la reacción con la ¹⁴C-NEM, la banda de 100 kDa de la ATPasa de H⁺ conteniendo la marca se seccionó del gel de poliacrilamida con SDS y la radiactividad asociada a la proteína se determinó como se indicó en los Métodos.

V.2. Efecto de la N-etilmaleimida sobre la actividad de la ATPasa de H⁺ de *K lactis*.

La inactivación de la ATPasa de H⁺ mediada por NEM fue dependiente del tiempo y de la concentración del reactivo (Figura 5A). Durante los primeros 6 minutos de incubación con NEM 0.5 mM, la actividad descendió un 40 % con respecto al control, y siguió una cinética de inactivación de pseudo primer orden. A concentraciones mayores, la cinética fue lineal sólo en los primeros minutos de incubación, y a tiempos largos la inactivación fué completa a tiempos largos (datos no mostrados). La gráfica de las constantes de velocidad de inactivación inicial de inactivación (k) contra la concentración de NEM, produjo una relación lineal, indicativa de una reacción de segundo orden entre los grupos SH de la enzima y la NEM. De la pendiente de esta gráfica, se calculó la constante de velocidad de segundo orden, con un valor de $200 \text{ M}^{-1} \text{min}^{-1}$ (Figura 5B).

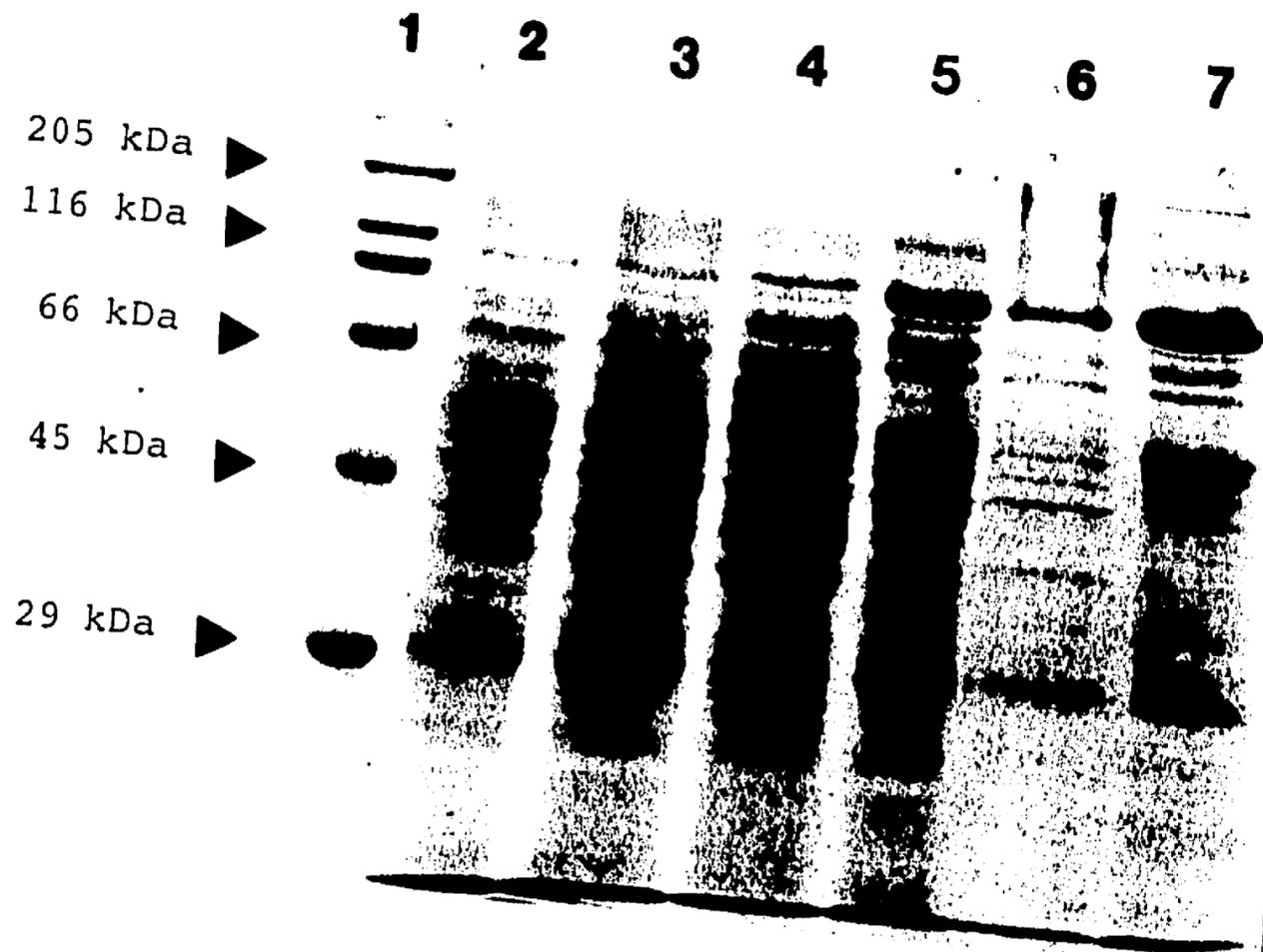
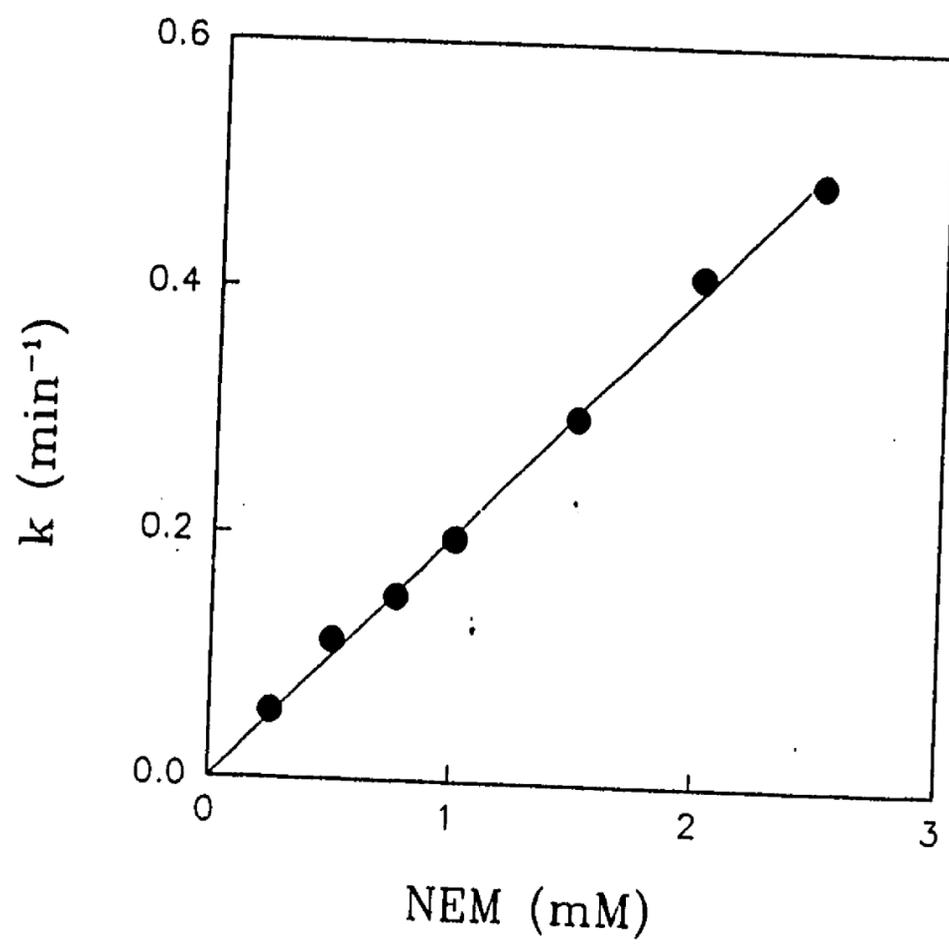
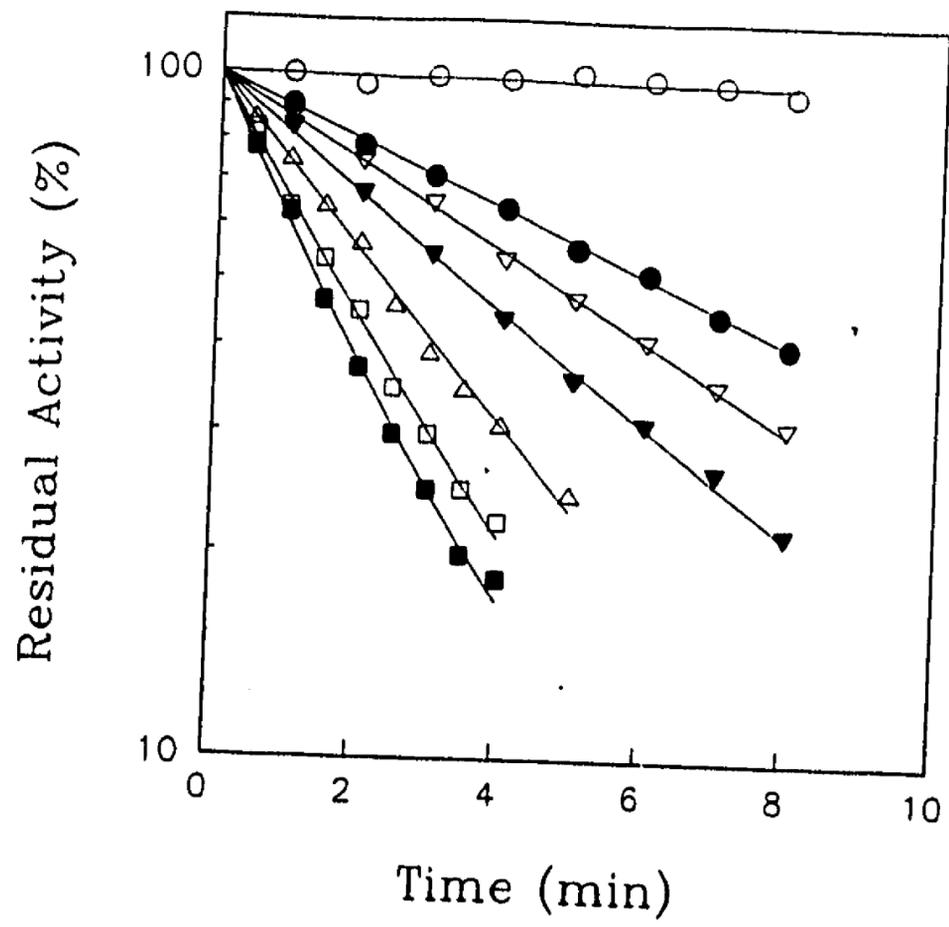


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS de las fracciones obtenidas del procedimiento de purificación. El carril 1 contenía 5 μg de una mezcla de proteínas de los siguientes pesos moleculares: anhidrasa carbónica (29 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), albúmina de bovino (66 kDa), Fosoforilasa B (97.4 kDa), β -galactosidasa (116 kDa) y miosina (205 kDa). Carril 2: membrana plasmática (20 μg). Carril 3: membranas plasmáticas digeridas por DOC (16 μg). Carril 4: SN₁ (12 μg). Carril 5: P₁ (20 μg). Carril 6: SN₂ (ND). Carril 7: ATPasa purificada en gradiente de glicerol (20 μg).

Figura 5. Inactivación de la ATPasa por la N-etilmaleimida. A. Curso temporal de la inactivación de la ATPasa por NEM. La enzima (0.6 mg/ml) se incubó a 30°C, en 50 mM de HEPES pH 7.5, MgSO₄ 1mM, en presencia de las siguientes concentraciones de NEM: (○) 0 mM, (●) 0.5 mM, (▽) 0.75 mM, (▼) 1.0 mM, (Δ) 1.5 mM, (□) 2.0 mM y (■) 2.5 mM. El panel **B** muestra que la constante de velocidad de inactivación de pseudo primer orden depende linealmente de la concentración de NEM.



V.2.1. Efecto de los iones Na⁺ y K⁺ sobre la inactivación de la ATPasa de H⁺ por NEM.

Se ha descrito que el Na⁺ y el K⁺ aumentan o inhiben la actividad de la ATPasa de H⁺ de diferentes fuentes (Dufour y Goffeau, 1980; Alhers, 1984), lo que sugiere la presencia de sitios de unión para cationes monovalentes en estas ATPasas. Se examinó el efecto de los iones Na⁺ y K⁺ sobre la inactivación de la ATPasa de H⁺ de *K lactis* mediada por NEM. Como se muestra en la figura 6, las constantes de velocidad de inactivación aumentaron con la concentración de los iones siguiendo una cinética de saturación del tipo de Michaelis-Menten. La constante de velocidad de inactivación máxima correspondió a un valor de 0.27 min⁻¹ y la K_d de 56 mM. El efecto fue similar para el Na⁺ y el K⁺. Este resultado sugiere que la enzima contiene un sitio de baja afinidad para estos iones. Para eliminar los efectos del catión monovalente, en los experimentos donde la concentración del sodio pudiera variar en función de la concentración del ligando, (por ejemplo, con en el MgADP-Na₂⁺), la concentración del sodio se ajustó a 100 mM.

V.2.2. Efecto de iones Mg²⁺ sobre la inactivación de la ATPasa de H⁺ por NEM. El magnesio se requiere para la hidrólisis del ATP por las P-ATPasas (Alhers, 1981). Además, el Mg²⁺ puede modular la inactivación por NEM en algunas ATPasas de H⁺ (Brooker y Slayman 1983). En este experimento, examinamos el efecto de diferentes concentraciones de Mg²⁺ durante la inactivación de la ATPasa de H⁺ de *K lactis* por NEM. Como se muestra en la figura 7A, la inhibición por NEM disminuyó en presencia de concentraciones bajas de Mg²⁺, pero aumentó cuando la concentración del Mg²⁺ se incrementó por encima de 1 mM. La obtención de las curvas hiperbólicas a partir de esta curva compleja se realizó graficando la diferencia entre las constantes de inactivación aparentes en ausencia y en presencia del ligando (Δk). Los regálicos de esta relación se ilustran en las figuras 7B

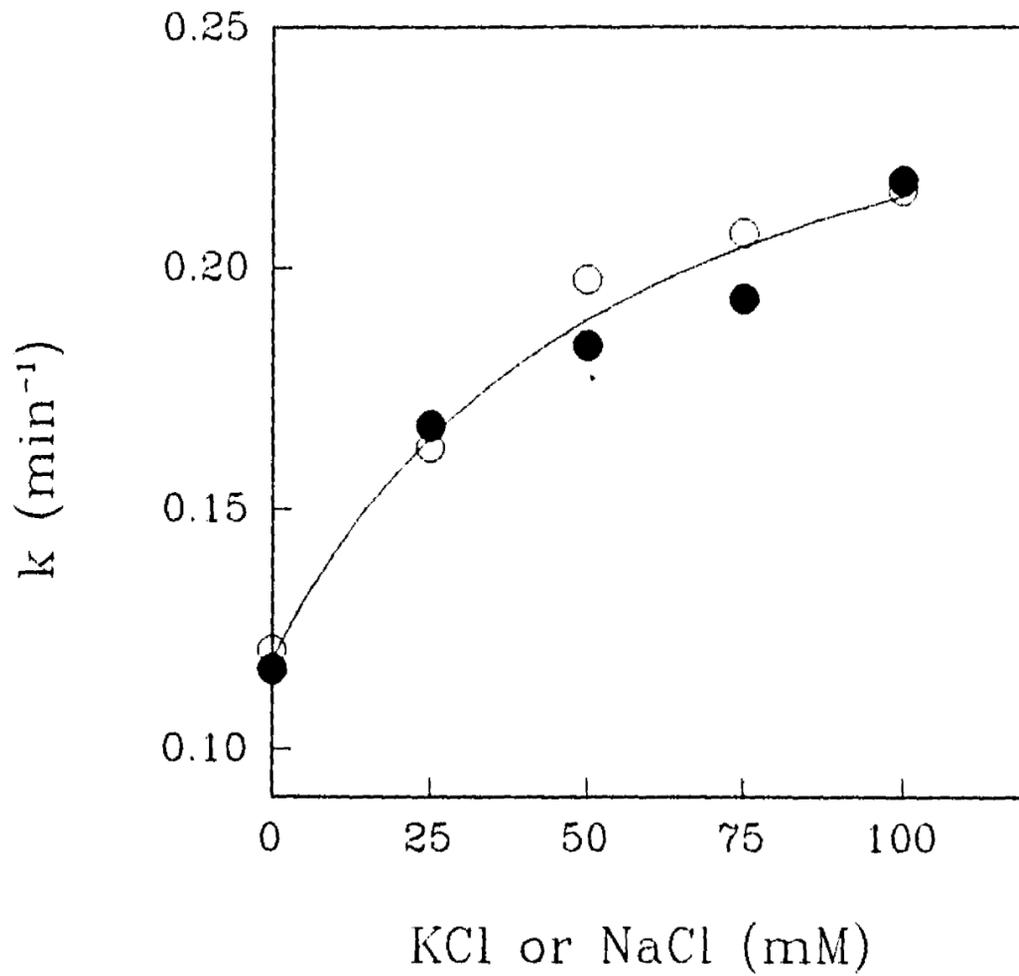


Figura 6. Inhibición de la ATPasa de H⁺ mediada por NEM. Efecto del Na⁺ y K⁺. La enzima (0.6 mg/ml) se incubó como se describió en la figura 5, excepto que la concentración de NEM se mantuvo en 1 mM. Diferentes concentraciones de Na⁺ (○) o K⁺ (●) estuvieron presentes en el medio de incubación. La curva hiperbólica denota un sitio de baja afinidad para el sodio o el potasio. La Kd para Na⁺ o K⁺ se obtuvo por medio de regresión no lineal.

y 7C apoyan la existencia de dos sitios para el Mg, uno de alta afinidad ($K_d = 190 \pm 69 \mu\text{M}$) y otro con afinidad baja ($K_d = 4.9 \pm 1.2 \text{ mM}$) que modulan la reactividad de la enzima hacia la NEM.

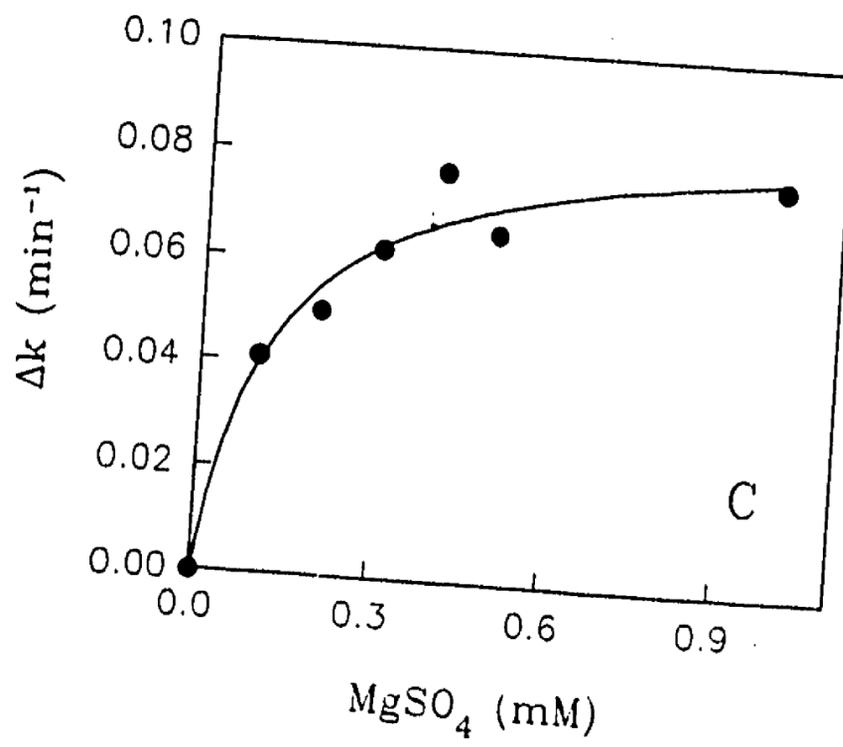
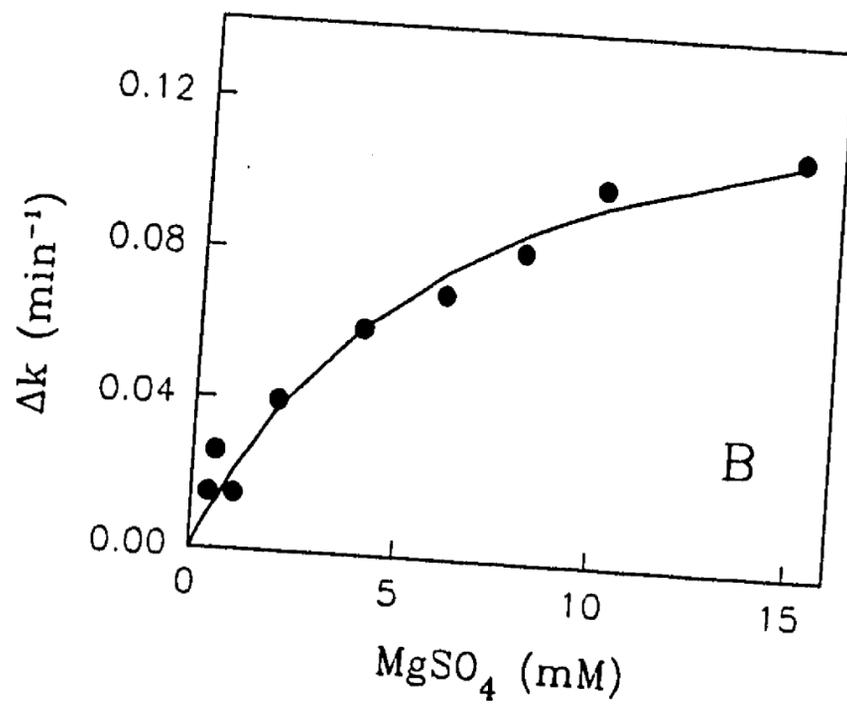
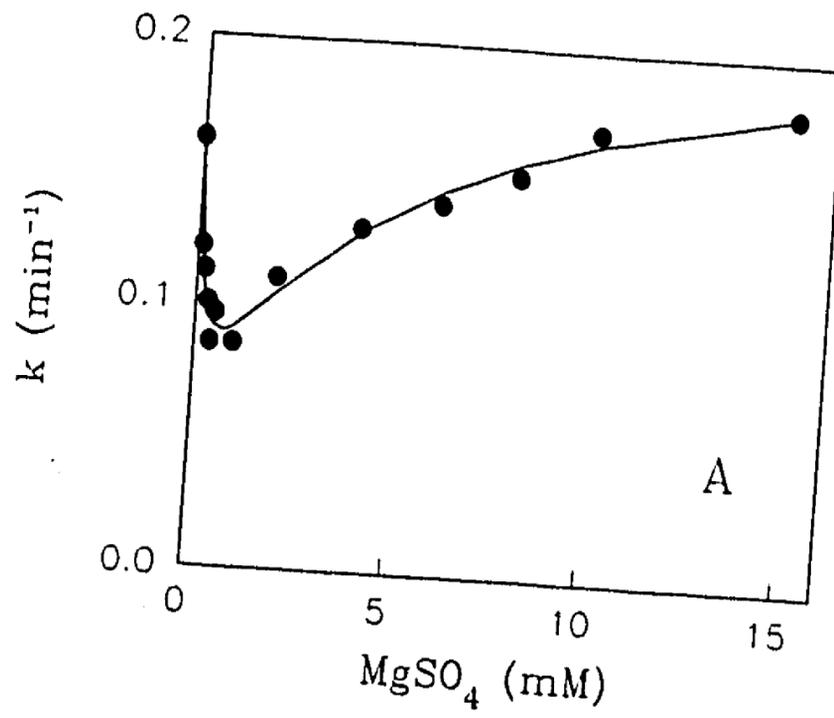
V.2.3. Efecto del pH sobre la inactivación de la ATPasa de H^+ mediada por NEM. Para este experimento se precisó estudiar primero la estabilidad de la enzima dentro de los límites de pH de 7-10. La enzima se incubó a 30°C , por 9 minutos, a las diferentes concentraciones de H^+ . La ATPasa mantuvo su estabilidad hasta un pH de 9.0 (Tabla I). Inclusive a pH de 10, la ATPasa retiene la mayor parte de su actividad al término de los 9 minutos, por lo que el pH más alto que se estudió fue de 10.

Tabla I. Estabilidad de la ATPasa de H^+ en función del pH. La enzima (0.6 mg/ml) se incubó en Hepes 50 mM o AMPPO 50 mM a los pHs indicados, en presencia de MgSO_4 1 mM. La reacción se dejó proceder hasta los 9 minutos y se midió actividad a la enzima como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Los valores están dados en porcentaje de la actividad residual del control ($25 \mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

pH	7.0	8.0	9.0	9.5	10
Actividad	100 %	98 %	98 %	90 %	60%

Para determinar el pH al que se observa el 50% de disociación (pK_a) del residuo que reacciona con la NEM en la ATPasa de H^+ de *K lactis*, el pH del medio se varió entre 6.5 y 10 (Figura 8). La inhibición por NEM a pH por debajo de 7 fue marginal, y aumentó drásticamente por

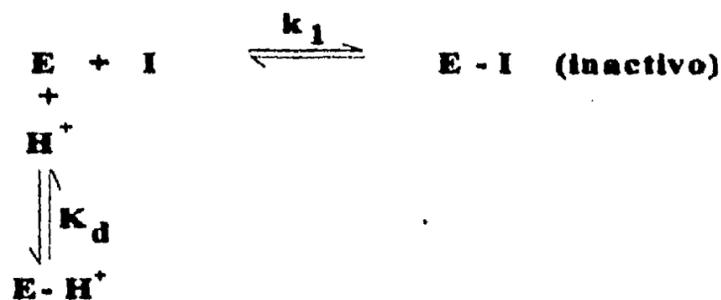
Figura 7. Efecto del Mg^{2+} sobre la inhibición de la ATPasa de H^+ por NEM. La enzima (0.6mg/ml) se incubó como se describió en Materiales y Métodos, en presencia de diferentes concentraciones de $MgSO_4$ (0-15 mM). La reacción de inhibición inició por la adición de NEM 1 mM y se tomaron alícuotas para el ensayo de ATPasa. El **panel A** muestra la dependencia de las constantes de inactivación de pseudo primer orden con respecto a la concentración de Mg. Los **paneles B y C** son regráficos de los datos a concentraciones altas y bajas de magnesio respectivamente. El Δk se calculó como se indica en el texto.



arriba de ese pH. Este comportamiento es típico de la reacción de la NEM con la cisteína desprotonada a través de una adición nucleofílica con el doble enlace de la NEM (Lundbald y Noyes, 1984). Los efectos del pH sobre la inactivación de la ATPasa de H⁺ por NEM pueden describirse por la siguiente ecuación (1)

$$k = \frac{K_a \cdot k^*}{K_a + [H^+]} \quad (1)$$

en donde k* es la constante de velocidad de inactivación de segundo orden, independiente del pH, y Ka es la constante de disociación ácida. Esta ecuación se dedujo de un modelo en el cual el inhibidor reacciona con un solo grupo desprotonado de la enzima (o varios grupos con el mismo pKa), lo que conduce a la inhibición de la actividad.



Este modelo pudo ser aplicado sólo cuando los límites del pH experimental utilizados fueron de 6.5 y 8.5; los parámetros obtenidos fueron pKa= 9.04± 0.07 y k= 4.38± 0.55 mM⁻¹ y los puntos experimentales mostraron un buen ajuste teórico (Recuadro, figura 8). Cuando la inactivación se determinó en un intervalo de pH de 6.5 a 9.0, 9.5 o 10, el pKa varió dependiendo de los límites

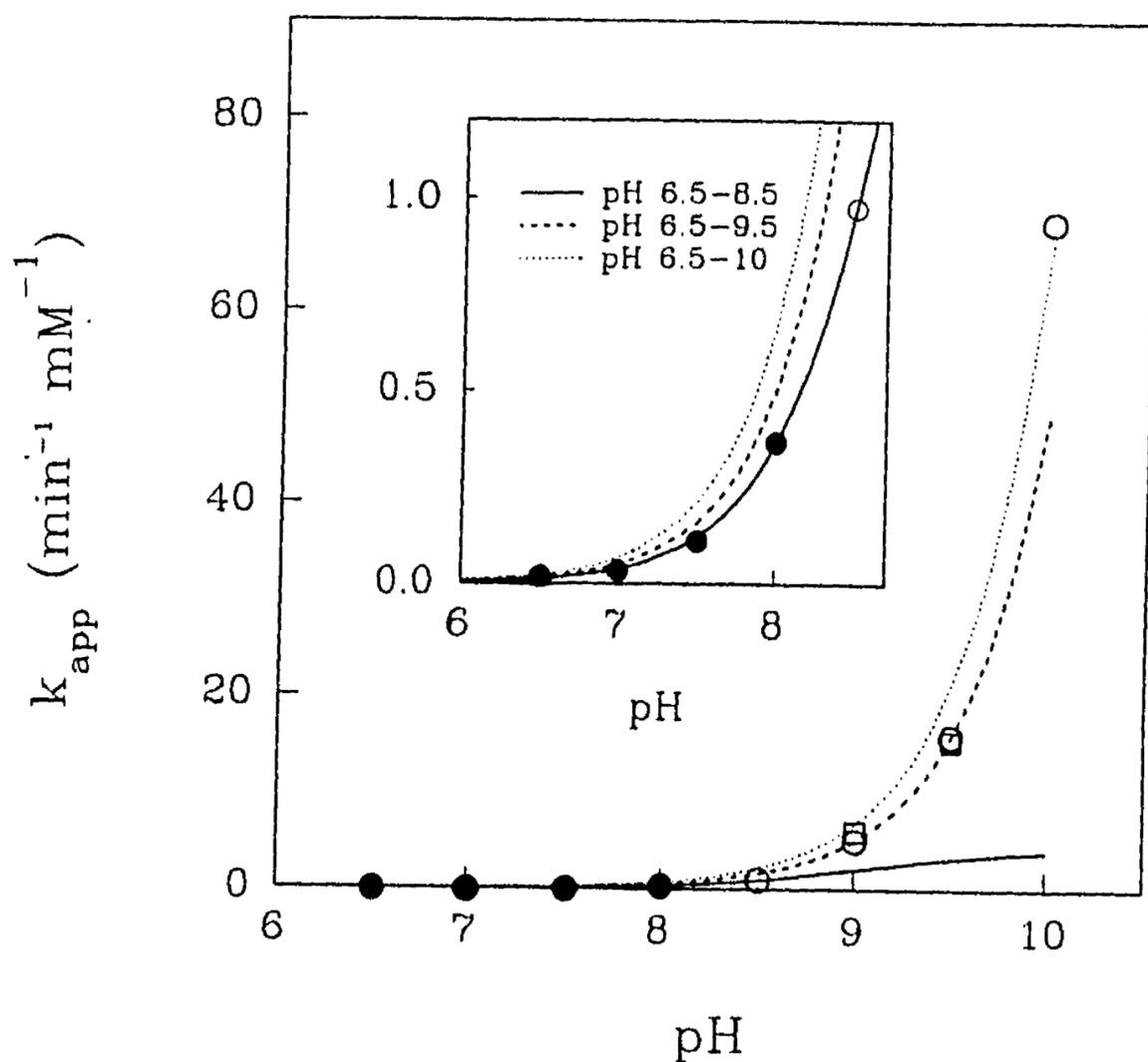
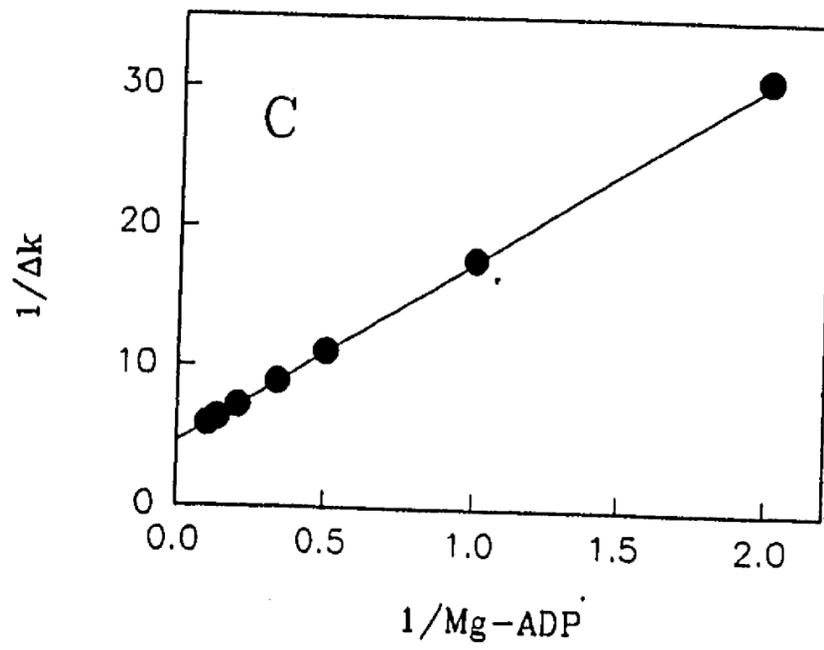
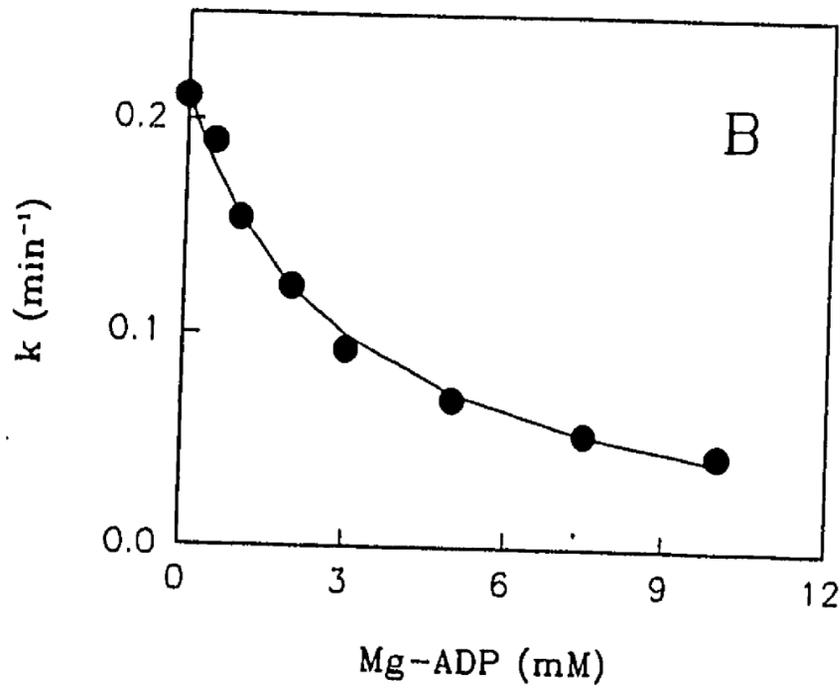
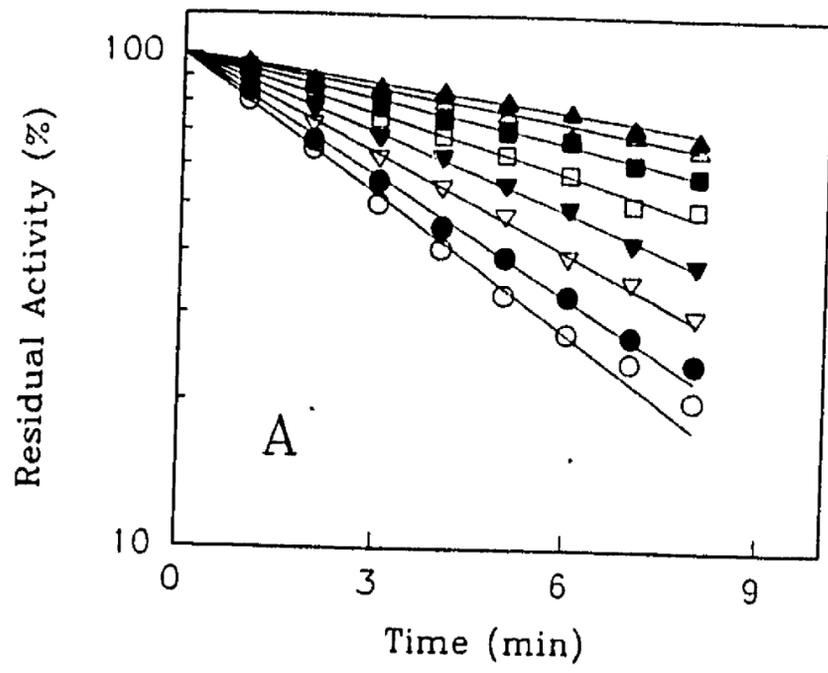


Figura 8. Efecto del pH sobre la inhibición de la ATPasa de H⁺ por la NEM. La enzima (0.6 mg/ml) se incubó a 30°C a diferentes pHs, en presencia de MgSO₄ 1 mM y diferentes concentraciones de NEM dependiendo del valor del pH. Los amortiguadores (50 mM) fueron: Hepes, pH 6.5 a 8.0 (●); AMPSO pH 8.5 a 10.0 (○); TAPS pH de 9.0 y 9.5 (□). Las curvas de titulación muestran la dependencia teórica de las constantes de velocidad de segundo orden en función del pH (ecuación 1) usando los límites de pH indicados: (—) 6.5 a 9.5; (-----) 6.5 a 9.0; (.....) 6.5 a 10.0. El recuadro presenta una ampliación de la gráfica entre 6.5 y 8.5, que muestran el ajuste de los puntos experimentales a cada curva.

escogidos: cuando el valor superior del pH fue de 9.0, los parámetros calculados fueron: un $pK_a = 11.45 \pm 34.5$ y $k = 1385 \pm 108400$; cuando el valor del pH incluyó al $pH = 9.5$ como límite superior, los nuevos resultados fueron $pK_a = 11.69 \pm 5.2$ y $k = 2476 \pm 27820$. Cuando el intervalo de pH seleccionado incluyó un pH de 10, el pK_a que se obtuvo fue de 12.34 ± 14.6 . Es decir, si se incluyen los pHs de 9.0 y superiores, la desviación estándar asociada a los parámetros fue muy grande, y se obtuvo una sobreestimación del valor de k (curva teórica) en comparación con la curva experimental. Esto produjo un ajuste pobre de los datos experimentales (recuadro figura 8); los resultados sugieren que a un pH de 9.0 y por arriba de este valor, otros grupos se desprotonaron y reaccionaron con la NEM, lo cual complicó la reacción. Por otro lado, cuando el margen de pH fue de 6.5 a 8.5, se obtuvo un mejor ajuste teórico, con desviaciones estándar mínimas. Por consiguiente, es probable que el o los grupos que reaccionan con la NEM para producir la inactivación de la enzima, tengan un pK_a cercano a 9.04 ± 0.07 .

V.2.4. Efecto del MgADP sobre la inactivación de la ATPasa de H^+ mediada por la NEM. En algunas enzimas, la presencia de ligandos fisiológicos puede afectar en gran medida la inactivación mediada por NEM (Brooker y Slayman, 1982; Katz y Sussman 1987; Carter, 1986; Winslow, 1981). En la ATPasa de H^+ de *K lactis*, el MgADP, inhibidor competitivo de la enzima, se seleccionó para explorar si la unión del ligando protegía a la enzima de la inactivación por NEM. En presencia de MgADP, la velocidad de inactivación disminuyó (figura 9A). La protección fue parcial aún a 20 mM de MgADP. La figura 9B ilustra la protección parcial que se obtiene en presencia del nucleótido. Los datos se ajustaron a la siguiente ecuación (2):

Figura 9. Efecto de MgADP sobre la inhibición de la ATPasa mediada por la NEM. La ATPasa (0.6mg/ml) se incubó con NEM 1 mM y NaCl 100 mM, en presencia de las siguientes concentraciones de Mg ADP : **A.** (○) 0 mM, (●) 0.5 mM, (▽) 1.0 mM, (▼) 2.0 mM, (□) 3.0 mM, (■) 5.0 mM, (Δ) 7.5 mM y (▲) 10 mM . **B.** La diferencia entre la constante de velocidad de inhibición de pseudo primer orden en presencia y ausencia de MgADP se graficaron contra la concentración de MgADP. **C.** Gráfico de la doble recíproca de los datos de B.



$$k = \frac{k_1 \cdot K_2 \cdot [Mg-ADP]}{K_d + [Mg-ADP]} \quad (2)$$

que se derivó de un modelo de protección parcial (Renosto y cols, 1985). La K_d para el ADP fue de 2.9 ± 0.4 mM. La constante de velocidad de inactivación de pseudo primer orden en presencia de concentraciones saturantes de MgADP (k_2) fue de 0.017 ± 0.005 min⁻¹, y la constante de velocidad de inactivación en ausencia del ligando (k_1) fue de 0.211 min⁻¹. La ecuación de arriba puede arreglarse para obtener una relación lineal de la siguiente manera (ecuación 3):

$$\frac{1}{\Delta k} = \frac{1}{(k_1 - k_2)} + \frac{K_d}{(k_1 - k_2)} \cdot \frac{1}{[Mg-ADP]} \quad (3)$$

donde Δk es la diferencia entre las constantes de velocidad en ausencia y presencia de MgADP para cada concentración del nucleótido examinado. La gráfica de $1/\Delta k$ contra $1/[MgADP]$ produjo una línea recta, que esta de acuerdo con el modelo descrito por la ecuación (3) (figura 9C), y de la cual se calculó el valor para la K_d . Cuando el valor de $k_2=0$, la protección es total debido a que el inhibidor no reacciona con el complejo enzima-ligando. La ordenada al origen involucra el valor de k_2 , que refleja la reactividad del complejo enzima-ligando por el inhibidor, lo que se traduce en un fenómeno de protección parcial.

V.2.5. Estequiometría de la reacción de NEM con las cisteínas de la ATPasa de H⁺.

El número de cisteínas involucradas en la inactivación de la ATPasa de H⁺ mediada por NEM, se determinó marcando a la enzima con ¹⁴C-NEM, en presencia o ausencia de MgADP (figura 10A).

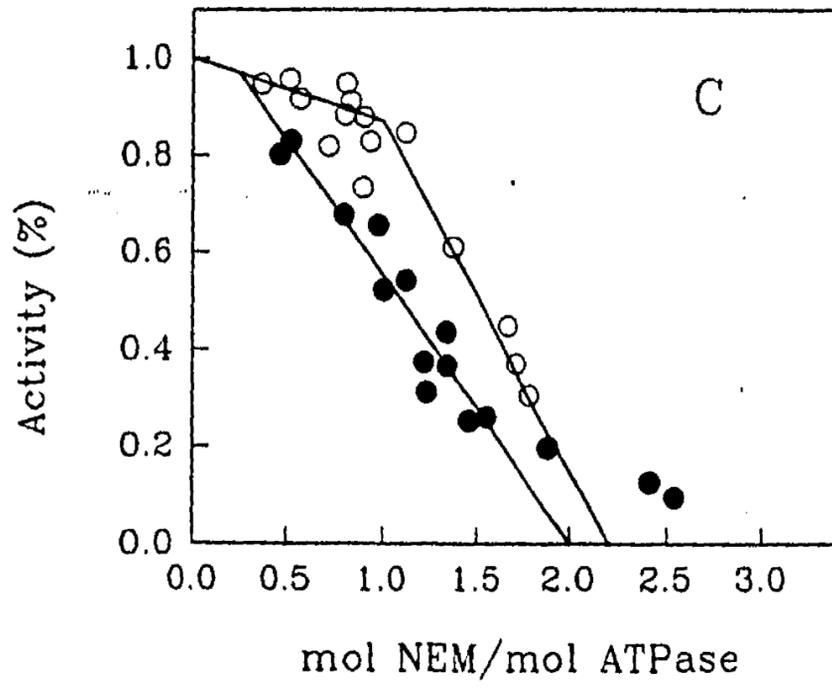
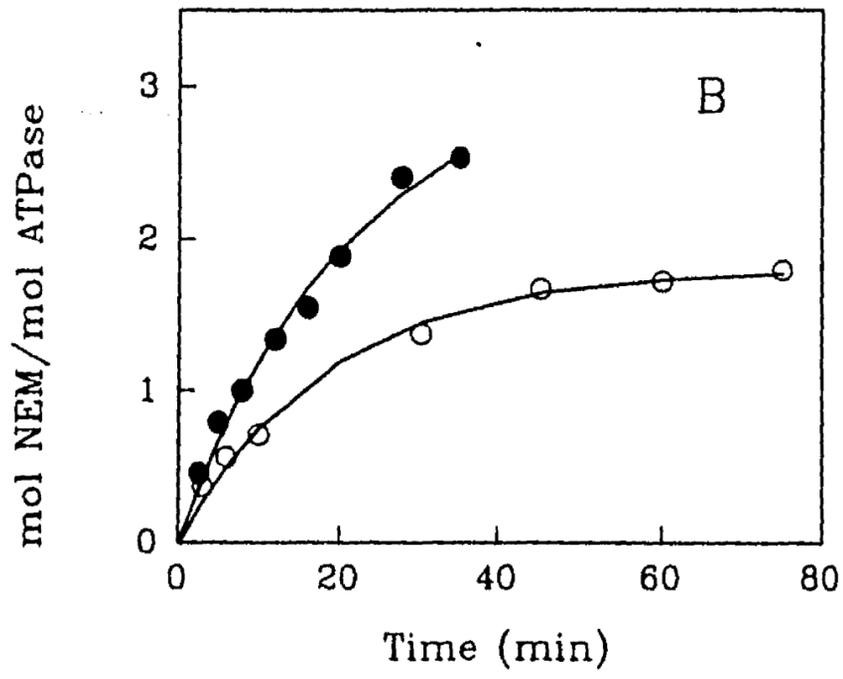
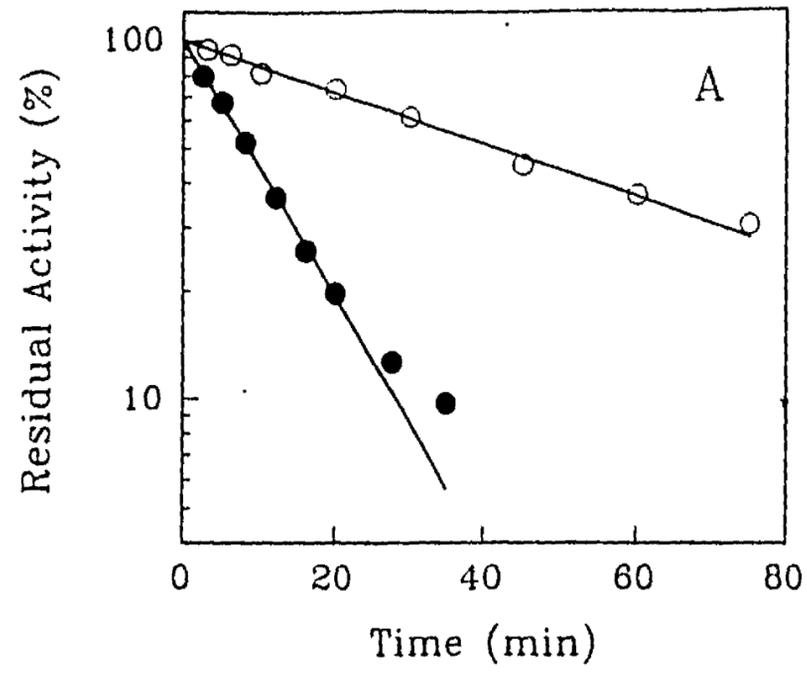
La ATPasa se protegió parcialmente con el MgADP, con una constante de inactivación de pseudo primer orden de 0.017 min^{-1} en presencia de MgADP y una $k= 0.082 \text{ min}^{-1}$ en ausencia del nucleótido. En presencia de MgADP, la inhibición de la ATPasa siguió una cinética de pseudo primer orden durante todo el tiempo de inhibición, mientras que en ausencia del nucleótido, se logró una inhibición del 80-90% pero con una cinética compleja, en donde a tiempos largos, aparece una segunda fase de incubación. Para determinar la incorporación de la marca radiactiva exclusivamente a la ATPasa de H^+ , la banda de ATPasa marcada se seccionó del gel de poliacrilamida con SDS y se procesó como se indica en Materiales y Métodos. La incorporación de la NEM a la enzima nativa fue gradual (figura 10B). Los parámetros de la unión característicos de cada curva se obtuvieron ajustando los datos a la siguiente ecuación (4):

$$A=A^{\infty}*(1-e^{-k*t}) \quad (4)$$

donde A es el ^{14}C -NEM unido /ATPasa en el tiempo t, $A^{\infty} = ^{14}\text{C}$ -NEM unido/ATPasa a tiempo infinito y k es la constante de velocidad de incorporación. Cuando la ATPasa se incubó con la NEM en ausencia de MgADP, se modificaron 3.15 residuos de cisteína por molécula de ATPasa con una $k= 0.048 \text{ min}^{-1}$. En presencia de Mg-ADP, sólo se marcaron 1.8 cisteínas /ATPasa ($k= 0.054 \text{ min}^{-1}$) (Figura 10B).

La extrapolación lineal al eje de las x en la gráfica de inhibición de la ATPasa contra la incorporación de NEM (figura 10C) mostró que en ausencia de Mg-ADP, dos de las tres cisteínas marcadas por NEM estuvieron involucradas en la inhibición de la ATPasa de H^+ . En presencia de MgADP, la incorporación de la primera NEM produjo una ligera inhibición (del 10 al 20%), mientras que más de un 80% de inhibición se alcanzó después de la incorporación de la segunda molécula

Figura 10. Marcaje con ^{14}C -NEM. Efecto sobre la actividad de la ATPasa de H^+ de *Kluyveromyces lactis* en ausencia y presencia de MgADP. La enzima (0.6 mg/ml) se incubó a 30°C y pH 7.5, en Hepes 50 mM, MgSO_4 1 mM, NaCl 100 mM y ^{14}C -NEM 360 μM en ausencia (●) o en presencia de MgADP (○). **A.** Curso temporal de la inhibición de la actividad de la ATPasa de H^+ por NEM. **B.** Curso temporal de la incorporación de NEM en la ATPasa de H^+ . **C.** Relación entre la actividad y la incorporación de NEM en la ATPasa.



de NEM. Los resultados sugieren que el MgADP protegió uno de los residuos de cisteína involucrados en la inactivación .

V.3. Efecto de la yodoacetamida sobre la ATPasa de H⁺. Modulación por NEM.

La yodoacetamida reacciona con los residuos hidrofílicos en algunas proteínas (Lundbald y Noyes 1984). Con el propósito de investigar si las cisteínas reactivas a NEM se encuentran expuestas al medio hidrofílico, se estudió la reactividad hacia la yodoacetamida. Los resultados mostraron que la yodoacetamida inhibió la actividad de la ATPasa ligeramente, reduciendo la actividad a un 80% con respecto al control a los 20 minutos de incubación (figura 11). La inhibición por yodoacetamida presentó una constante de velocidad de inactivación de pseudo-primer orden pequeña (0.017 min⁻¹ a 5 mM y 0.027 min⁻¹ a 10 mM). Además, después de 20 minutos de incubación con yodoacetamida, la mayoría de los grupos SH continuaron reactivos a la NEM, con una constante de pseudo-primer orden de 0.176 min⁻¹ a 1 mM de NEM (figura 11), lo que indica que los grupos SH reactivos a NEM no reaccionaron con la yodoacetamida durante el tiempo que duró la reacción .

V.4. Inactivación de la ATPasa de H⁺ por IAEDANS.

Se ha descrito que el efecto inhibitorio del IAEDANS en la ATPasa de H⁺ nativa de *Neurospora crassa* ocurre al reaccionar con residuos de cisteína hidrofílicos (Pardo y Slayman, 1989). Para el caso de la ATPasa de H⁺ de *K. lactis*, se designaron experimentos para explorar el efecto del IAEDANS durante períodos cortos y largos de incubación con el reactivo. Se determinó que un curso temporal de 10 minutos de incubación era un tiempo adecuado para la reacción y con ello se obtuvieron los parámetros cinéticos de la inhibición. Como se muestra en la figura 12A, el

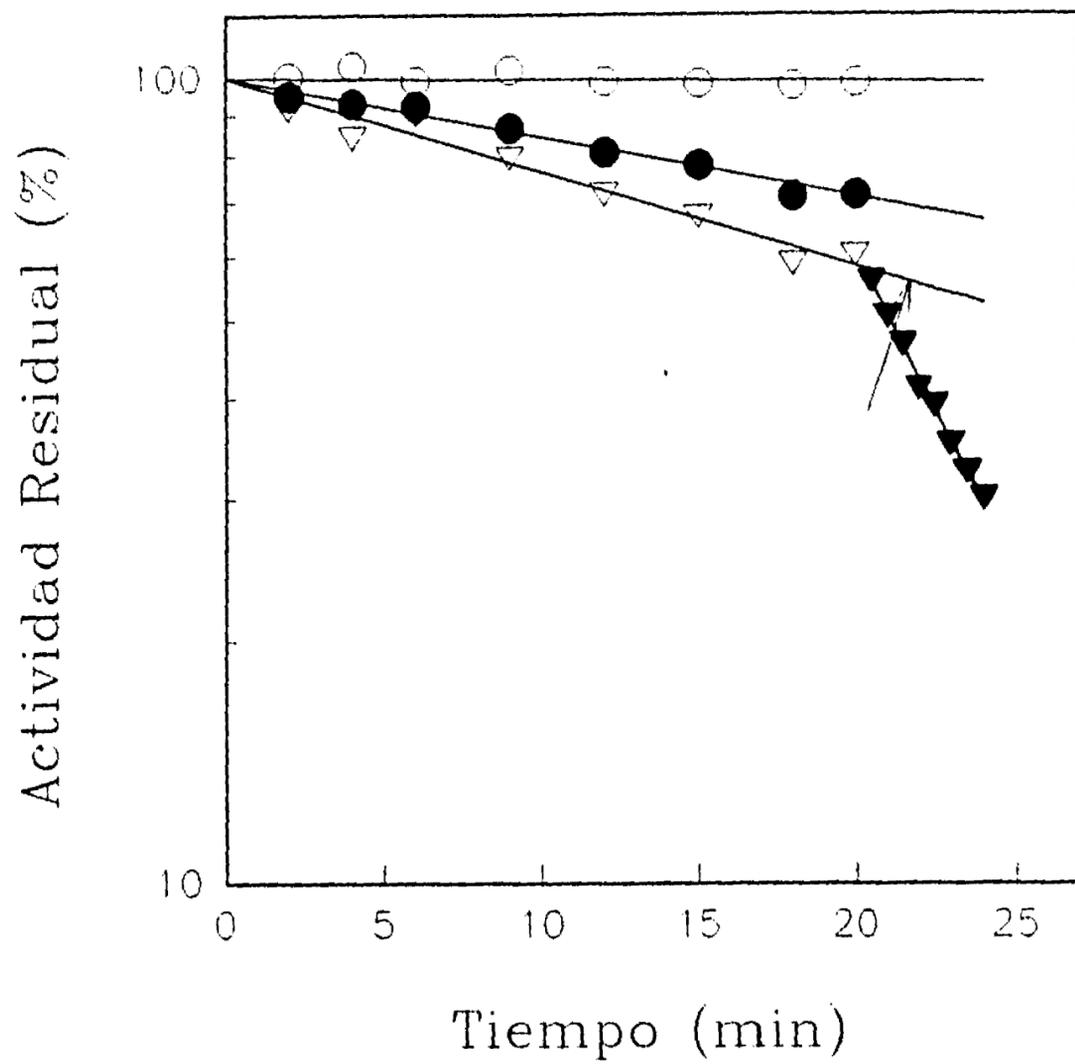
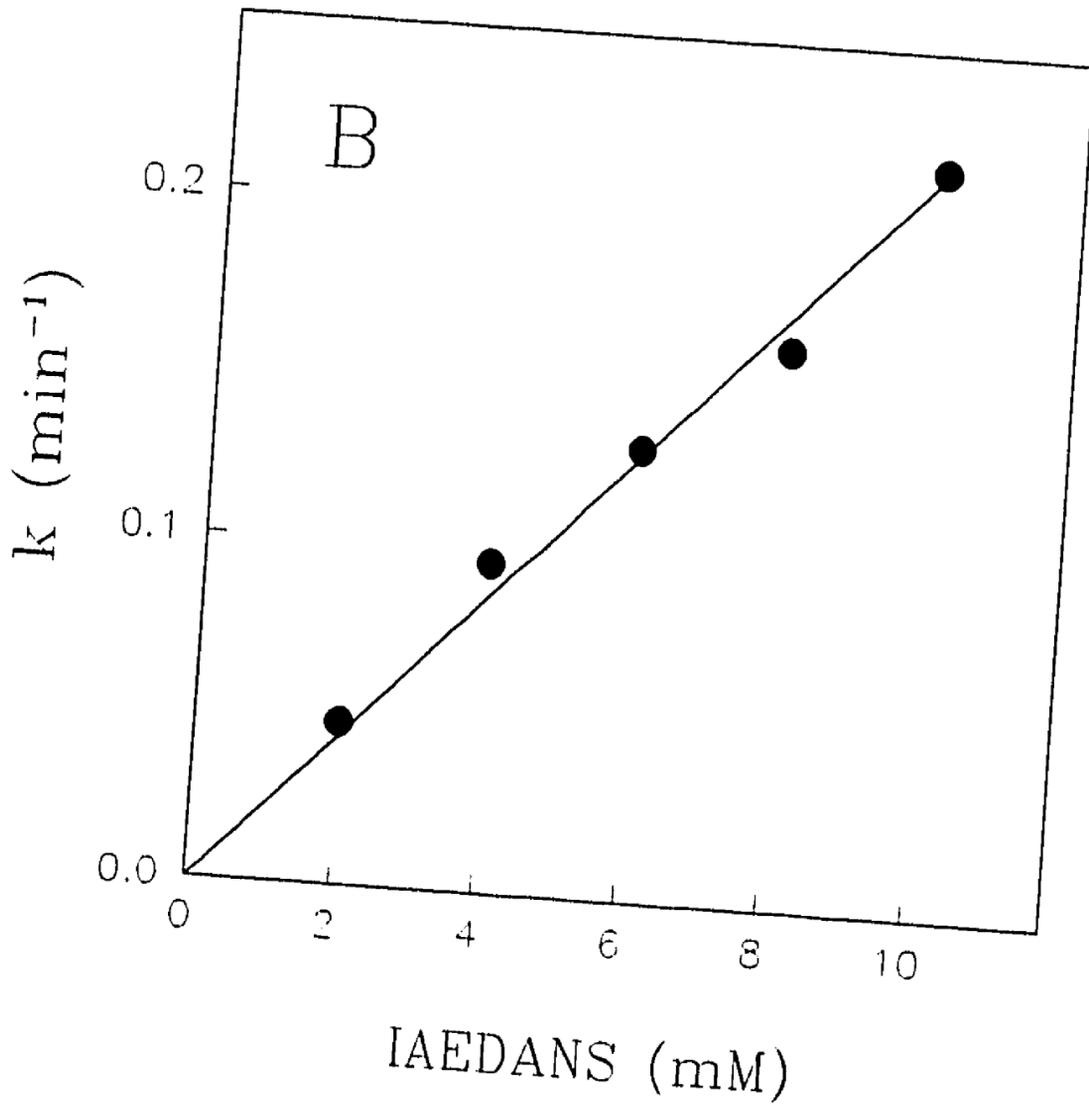
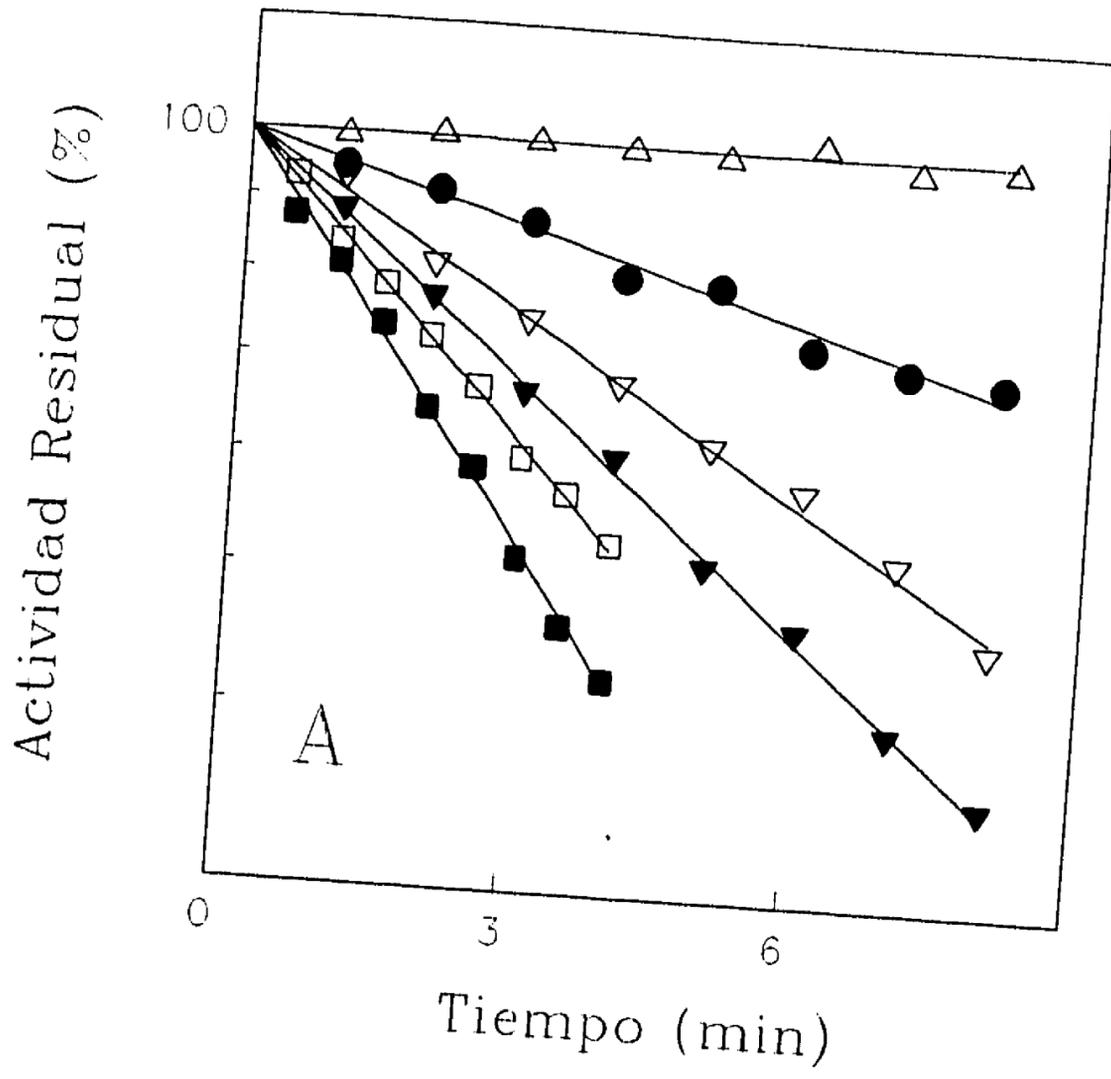


Figura 11. Efecto de la yodoacetamida sobre la ATPasa de H⁺. Efecto de la NEM y de la yodoacetamida. La ATPasa (0.6mg/ml) se incubó a 30°C, con yodoacetamida (○) 0mM, (●) 2 mM y (▽) 5 mM a pH 7.5, Hepes 50 mM y MgSO₄ 1 mM. La flecha indica el tiempo en el que se adicionó la NEM 1 mM (▼)

Figura 12. Inhibición de la ATPasa de H⁺ por IAEDANS. **A.** La enzima (0.6 mg/ml) se incubó a 30°C en Hepes 50 mM, pH 7.5, MgSO₄ 1 mM, y las siguientes concentraciones de IAEDANS: (Δ) 0mM, (●) 2 mM, (∇) 4mM, (▼) 6 mM, (□) 8 mM y (■) 10 mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para ensayar la actividad de la ATPasa, como se describió en métodos. El panel **B** muestra la dependencia de las constantes de velocidad de inactivación de pseudo primer orden contra la concentración del IAEDANS.



IAEDANS inhibió la actividad de la ATPasa con una cinética de pseudo primer orden. Al graficar las constantes de velocidad de inactivación contra la concentración del IAEDANS se obtuvo una línea recta (figura 12B), la cual indica que los grupos reaccionaron con el inhibidor en un proceso bimolecular simple. De la pendiente de esta recta, se determinó una constante de inactivación de segundo orden de $21.4 \pm 0.5 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$. La linealidad de la gráfica y su origen en cero indica que durante la reacción, no se produjeron complejos reversibles específicos entre el inhibidor y la enzima (Bell y Bell, 1988).

V.4.1. Efecto del Mg^{2+} sobre la inactivación de la ATPasa de H^+ por IAEDANS. Las ATPasas de H^+ contienen dos sitios de unión para el magnesio, y estos pueden modular la actividad de la enzima hacia algunos inhibidores (Brooker y Slayman 1983). En la ATPasa de H^+ de *K lactis* el magnesio también afectó la inactivación de la ATPasa por la NEM. En el caso de la inhibición mediada por IAEDANS, también se exploró si el magnesio alteraba la inhibición de la enzima. La inhibición de la ATPasa por IAEDANS, a diferentes concentraciones de magnesio se ilustra en la figura 13, en la que se observa una relación lineal entre la constante de velocidad de inactivación y la concentración del Mg^{2+} . La recta tiene una pendiente de $0.013 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ que describe la velocidad con la que reacciona la enzima con el IAEDANS en presencia del magnesio. El carácter lineal de la interacción de la enzima y el inhibidor en presencia de concentraciones crecientes de magnesio, sugiere una reacción de tipo inespecífico, en contraste con el comportamiento bifásico que ocurrió durante la inhibición con la N-etilmaleimida y que sugiere la interacción del magnesio con sitios específicos.

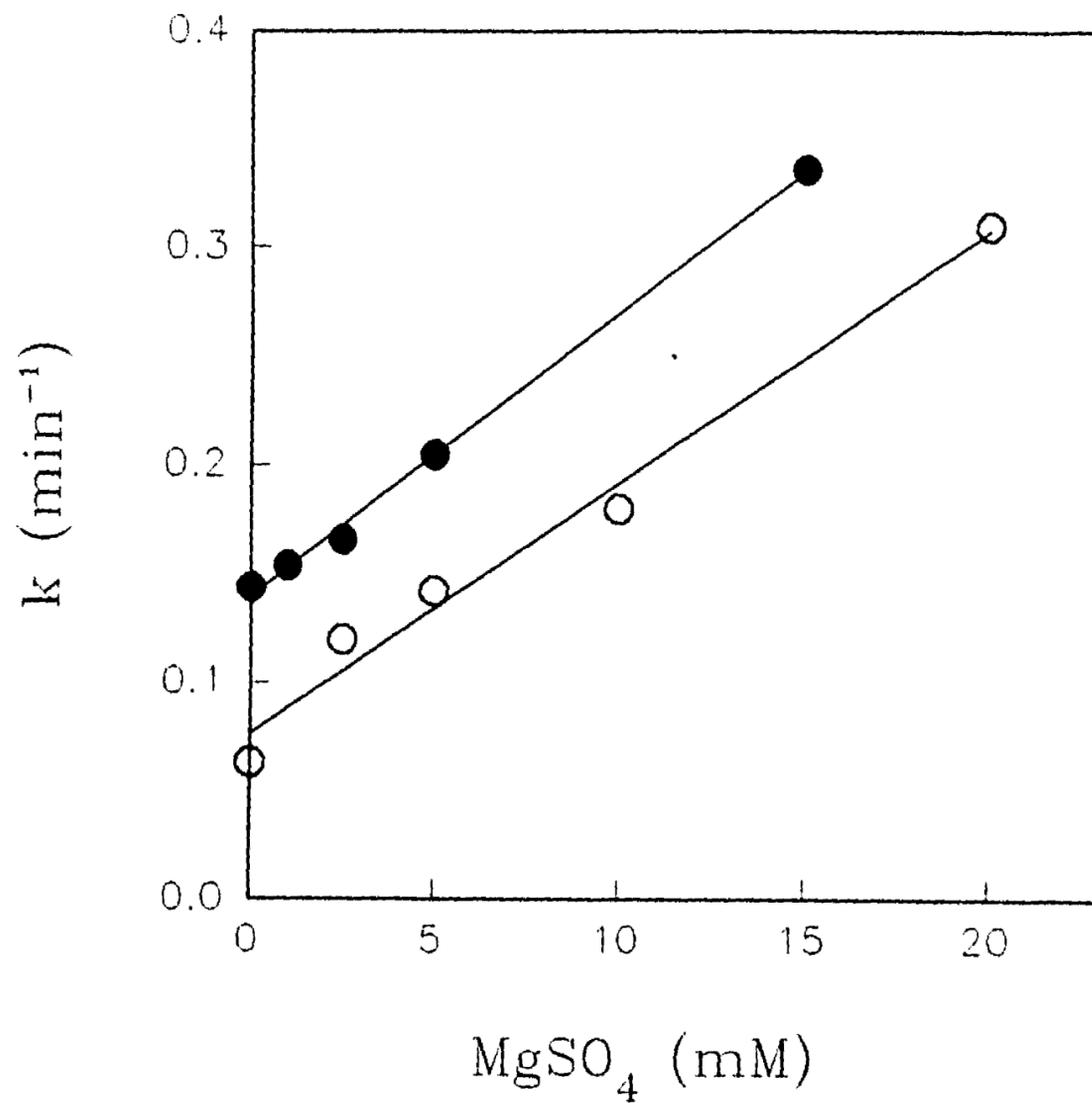


Figura 13. Efecto del Magnesio sobre la inactivación de la ATPasa de H⁺ nativa y de la ATPasa-MMTS por IAEDANS. La enzima (0.6 mg/ml) se incubó a 30°C en Hepes 50 mM pH 7.5, con IAEDANS 10 mM y diferentes concentraciones de MgSO₄. La constante de velocidad de inactivación inicial de cada curso temporal se graficó contra la concentración de MgSO₄. Se muestra el efecto directo de la concentración de Mg²⁺ sobre la inhibición por IAEDANS .

V.4.2. Efecto del MgADP sobre la inactivación de la ATPasa de H⁺ mediada por IAEDANS.

En estudios de protección por ligando en la reacción del IAEDANS con la ATPasa de H⁺ de *N crassa*, se observó que el Mg-ADP protege sólo un 60 % a la enzima contra el inhibidor (Pardo y Slayman, 1989). Para explorar el efecto de protección por este ligando en la ATPasa de H⁺ de *K lactis*, la enzima se incubó con IAEDANS 10 mM, en ausencia y presencia de MgADP 10 mM. La protección ejercida por el Mg-ADP fue menor del 10% (figura 14). La protección en la ATPasa de H⁺ de *K lactis* fue menor que la reportada para la enzima de *Neurospora* (Pardo y Slayman, 1989). Esta diferencia en protección por el MgADP sugiere que en la ATPasa de H⁺ de *K lactis* el (los) grupo(s) que reaccionaron con el IAEDANS podrían encontrarse mas alejados del sitio de unión del nucleótido, de tal forma que continúan accesibles al inhibidor; por otro lado, la entrada del ligando podría generar cambios conformacionales que alteren en forma diferente, debido a su distinta localización, la reactividad de las cisteínas al IAEDANS. .

V.5. Interacción del MMTS con la ATPasa de H⁺.

V.5.1. Complejo ATPasa-MMTS. Modulación por NEM e IAEDANS. Los resultados anteriores mostraron que algunos de los sulfhidrilos presentes en la ATPasa de H⁺ de *K lactis* reaccionaron con el IAEDANS y la NEM para producir la pérdida de la actividad. Esto podría sugerir que algunos de los residuos de cisteína tuvieran un papel esencial en el ciclo de reacción de la ATPasa. Para probar ésto, se designaron algunos experimentos. Primero se estudió el efecto del MMTS sobre la actividad de la ATPasa. La enzima se incubó con MMTS 2 mM o 5mM a 30°C sin que perdiera apreciable actividad (figura 15). Este resultado indicó que ninguno de los residuos de

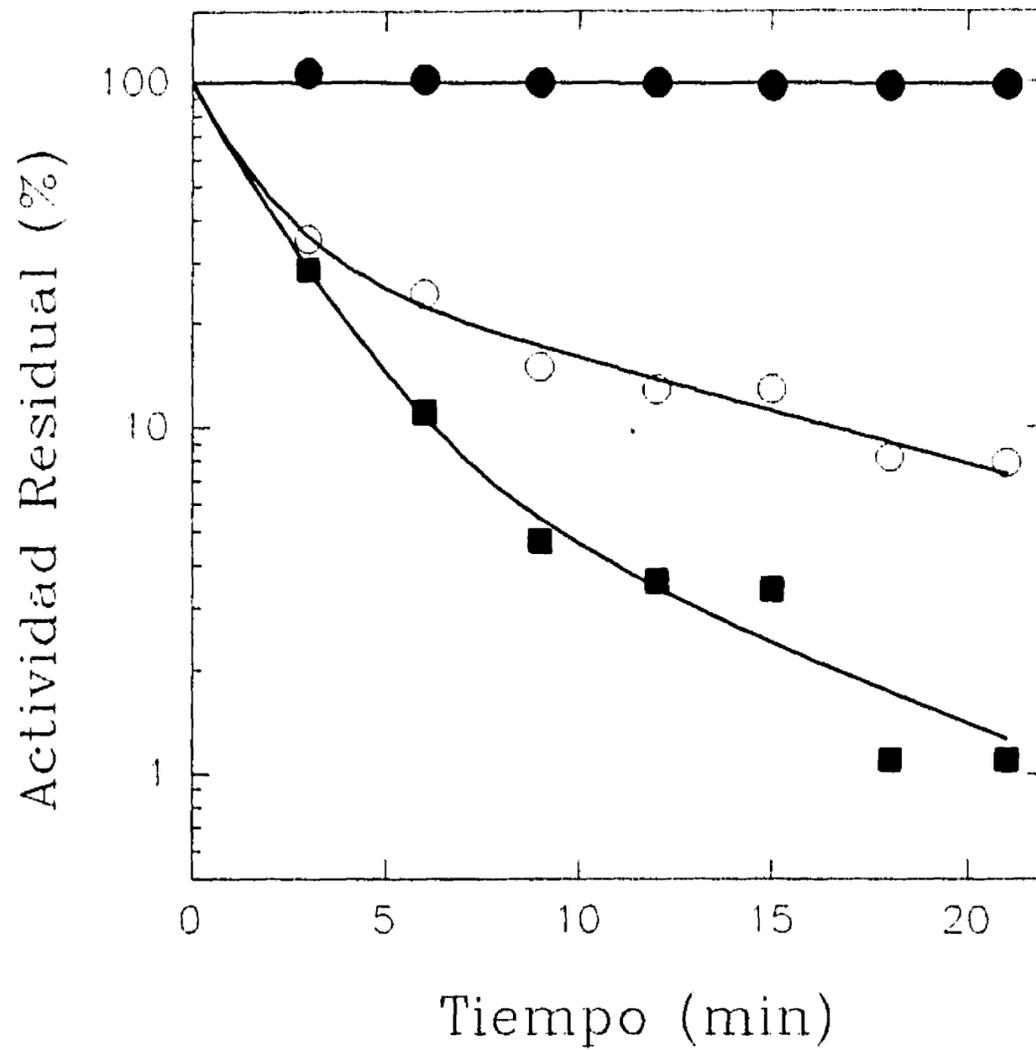


Figura 14. Efecto del Mg-ADP sobre la inhibición de la ATPasa de H⁺ mediada por IAEDANS.

La enzima (0.6mg/ml) se incubó a 30°C con (■) 0 o (○) 10 mM MgADP. La inactivación se inició por la adición de IAEDANS 10 mM y se tomaron alícuotas a los tiempos indicados para el ensayo de la actividad de la ATPasa. (●) Actividad de la ATPasa en ausencia de IAEDANS.

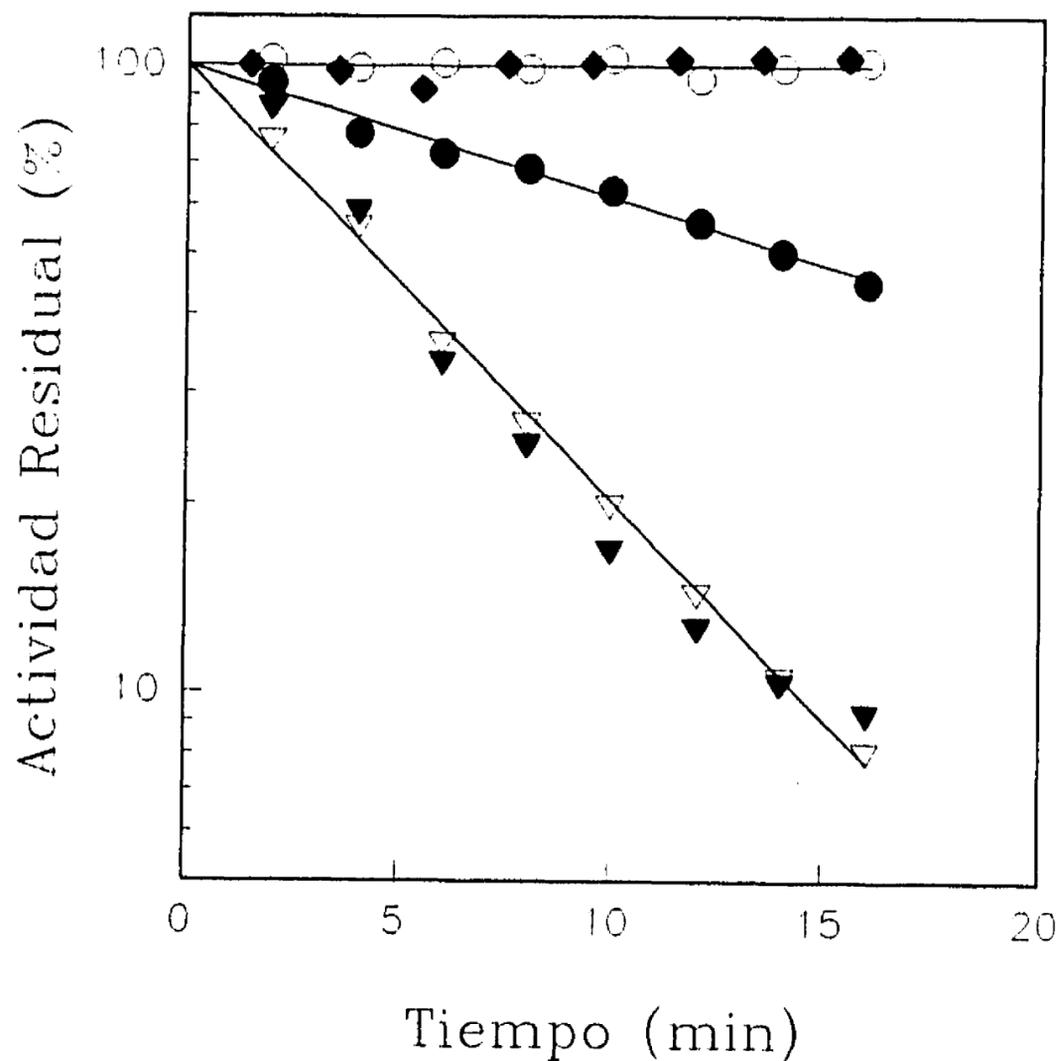


Figura 15. Modificación de la ATPasa de H⁺ con MMTS. Inhibición de la ATPasa-MMTS por NEM y IAEDANS. La ATPasa (0.5-1.0 mg/ml) se incubó a 30°C y pH 7.5 en presencia de MMTS 5 mM por 40 minutos y luego se filtró a través de columnas de Penefsky. El curso temporal de la actividad de la enzima nativa en presencia de MMTS 5 mM (○), NEM 1 mM (▼) o IAEDANS 10 mM (▽). La actividad de la enzima modificada con MMTS en presencia de NEM 1 mM (◆) o IAEDANS 10 mM (●).

cisteína participan en las reacciones del ciclo catalítico de la ATPasa de H⁺ de *K lactis*. Es probable que la incorporación del tiometano al anión tiolato de las cisteínas bloquean su reactividad pero no causan un daño aparente en la estructura tridimensional de la enzima.

El siguiente paso fue determinar si los residuos de cisteína sensibles a NEM quedaron bloqueados por el MMTS. Para probar esto, la ATPasa se incubó con 5 mM de MMTS durante 40 minutos, y el MMTS que no reaccionó se eliminó por filtración. La ATPasa-MMTS (E-MMTS), se incubó con NEM 1 mM a pH 7.5. En la figura 15, se ilustra que la enzima modificada con el MMTS no se inhibe con la NEM; el resultado indicó que los grupos sulfhidrilo reaccionaron eficientemente con el MMTS y se bloqueó la reacción con la NEM (Smith y cols, 1975).

Finalmente, la enzima-MMTS fue incubada con IAEDANS 10 mM, concentración a la que el IAEDANS inhibió rápidamente a la enzima nativa (Figura 12A). Con la ATPasa-MMTS, la constante de velocidad de inactivación se redujo alrededor de 1/4 con respecto a la enzima nativa (figura 15). Adicionalmente, la reacción prosiguió con una cinética de pseudo primer orden durante mas tiempo, sugiriendo que un grupo, (o grupos cinéticamente similares) fueron modificados. Debido a que el MMTS es altamente específico para grupos sulfhidrilo (Smith y cols, 1975), es posible que el IAEDANS, por ser un derivado de la yodoacetamida, reaccione con otros residuos tales como la lisina, metionina o histidina (Fig 3). Otra posibilidad mas sería que el MMTS reaccione solamente cisteínas hidrofílicas de la ATPas, lo que permitiría la reacción del IAEDANS con las cisteína(s) hidrofóbicas.

V.5.2. ATPasa-MMTS. Efecto de diferentes concentraciones de IAEDANS. Para determinar los parámetros cinéticos de la reacción de la enzima-MMTS con el IAEDANS, se

probaron diferentes concentraciones del reactivo. Parte del complejo ATPasa-MMTS se incubó con NEM 1 mM como control. El resto de la enzima se incubó con diferentes concentraciones de IAEDANS (0-20 mM). Como se aprecia en la figura 16A, la ATPasa se inhibió con concentraciones crecientes de IAEDANS. La inhibición de la enzima-MMTS por IAEDANS no fue tan marcada como la de la enzima nativa (figura 12A).

Al graficar las constantes de velocidad de inactivación (k) contra la concentración de IAEDANS se obtuvo una relación lineal (figura 16B) lo cual indica la ausencia de complejos reversibles formados antes de la inactivación. La pendiente de esta línea dió el valor de la constante de velocidad de inactivación de segundo orden, de $4.7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$, que es un valor cuatro veces menor que la velocidad de reacción de la enzima nativa con el IAEDANS (figura 12 B). Si todas las cisteínas se bloquearon con el MMTS, este nuevo valor de la constante de velocidad de inactivación de segundo orden sugiere que otros grupos diferentes a las cisteínas (o cisteínas hidrofílicas) reaccionaron con el IAEDANS.

V.5.3. ATPasa-MMTS. Efecto del Mg^{2+} sobre la inactivación por IAEDANS. El efecto del Mg^{2+} sobre la inhibición de la ATPasa nativa mediada por la NEM mostró un comportamiento bifásico (Figura 7A). Este se perdió para el caso del IAEDANS. Con el propósito de investigar el comportamiento de la ATPasa-MMTS, se incubó con diferentes concentraciones de Mg^{2+} (0-20 mM), en presencia de 10 mM de IAEDANS.

En la figura 13 se observa que a medida que aumenta la concentración del magnesio, aumenta la inhibición de la enzima. El incremento lineal entre las constantes de velocidad de inactivación y las concentraciones de Mg^{2+} , quedó descrito por una pendiente de $0.0115 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$. El comportamiento

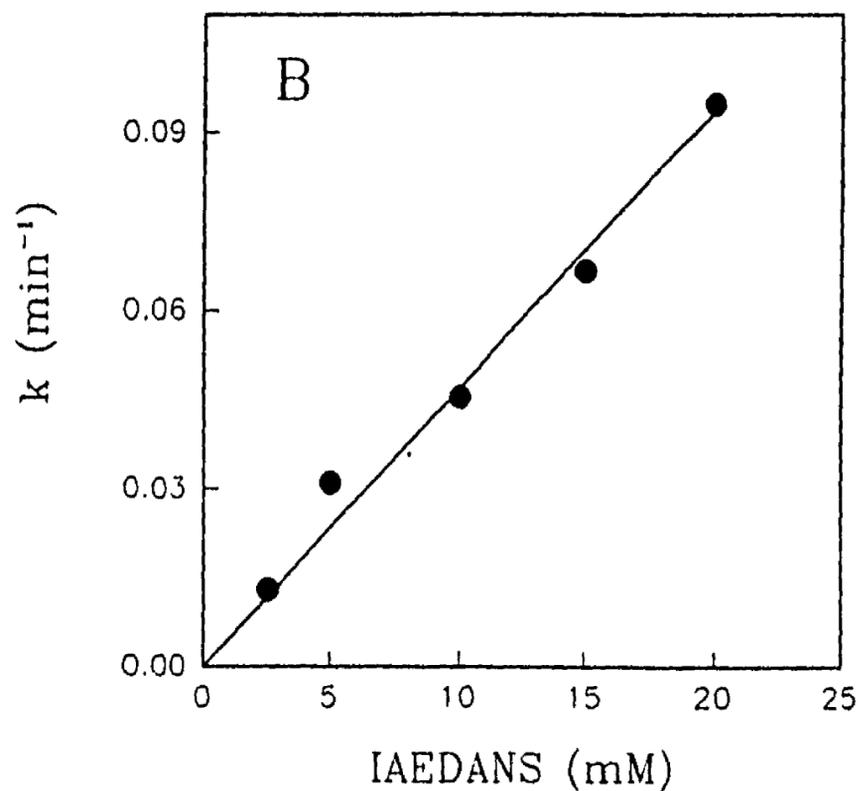
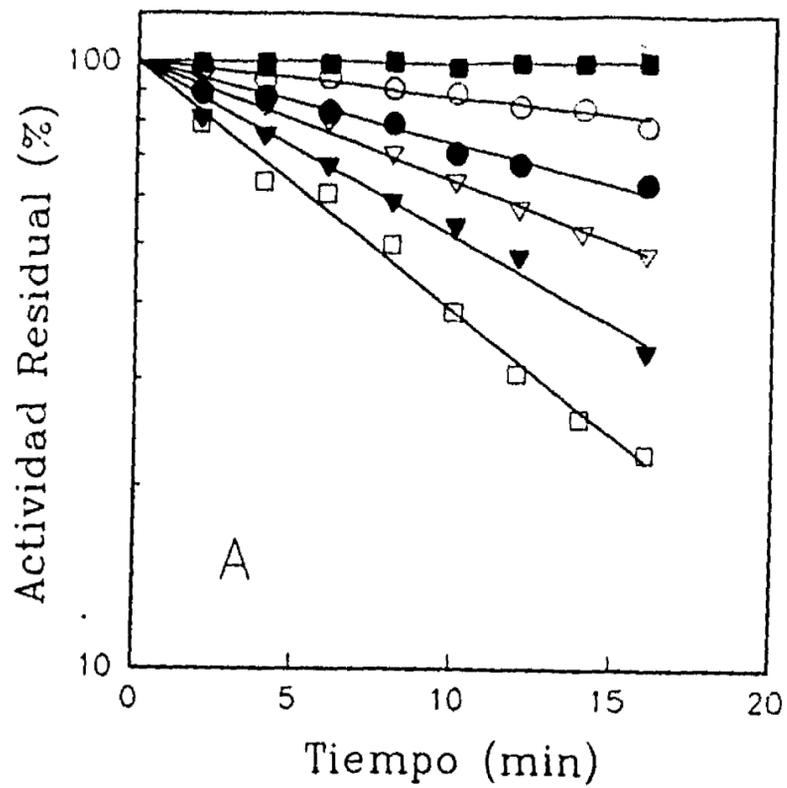


Figura 16. Efecto de concentraciones del IAEDANS sobre la ATPasa-MMTS. La ATPasa (1 mg/ml) se incubó con MMTS 5 mM durante 45 min y se filtró como se mencionó en Métodos. La ATPasa-MMTS se resuspendió en buffer Hepes a pH 7.5 y la reacción de inhibición se inició por la adición del IAEDANS: 0 mM(■), 2.5 mM (○), 5 mM (●), 10 mM (▽), 15 mM (▼), 20 mM (□).

B. Regráfico de las constantes de velocidad de inactivación de pseudo primer orden contra la concentración de IAEDANS.

cinético fue idéntico al observado en la enzima nativa ($k = 0.013 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Este resultado sugiere que el magnesio produce un efecto inespecífico en la interacción de la ATPasa nativa o modificada con MMTS y el IAEDANS.

V.5.4. La ATPasa de H^+ nativa y ATPasa-MMTS. Efecto del pH sobre la inactivación por IAEDANS. Para estos experimentos, la ATPasa nativa se incubó con IAEDANS 10 mM en un margen de pH de 5.5 a 8.0, para obtener información sobre el valor del pKa de los grupos involucrados en la reacción. Contrario a los resultados observados con la NEM, con el IAEDANS se observó una reacción pequeña de la ATPasa a valores de pH entre 5.5 y 6.5, lo que sugirió que otros residuos (p.ej. metionina o histidina), estaban reaccionando con el IAEDANS (figura 17). Al igual que con la NEM, por arriba de un pH de 7.0, el IAEDANS inhibió a la enzima al reaccionar nucleofílicamente con los residuos de cisteína desprotonados. Los datos se describieron con la siguiente ecuación (5):

$$k = k_1 + \frac{k_2 * K_a}{(K_a + [H^+])} \quad (5)$$

donde K_a es la constante de disociación ácida de los grupos protonados (posiblemente residuos de cisteína), k_2 es la constante de velocidad de inactivación independiente del pH, para los residuos de cisteína y k_1 la constante de velocidad de inactivación independiente del pH para el otro residuo (metionina). El ajuste de los datos a este modelo, dió los siguientes resultados: $\text{pKa} = 9.3 \pm 0.3$, $k_1 = 0.136 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$ y $k_2 = 8.5 \pm 5.7 \text{ min}^{-1}$. La gráfica de $1/k$ contra $1/[H^+]$ para el IAEDANS conduce a una línea curva (recuadro figura 17), lo cual muestra la reactividad de la enzima a bajo pH. Este

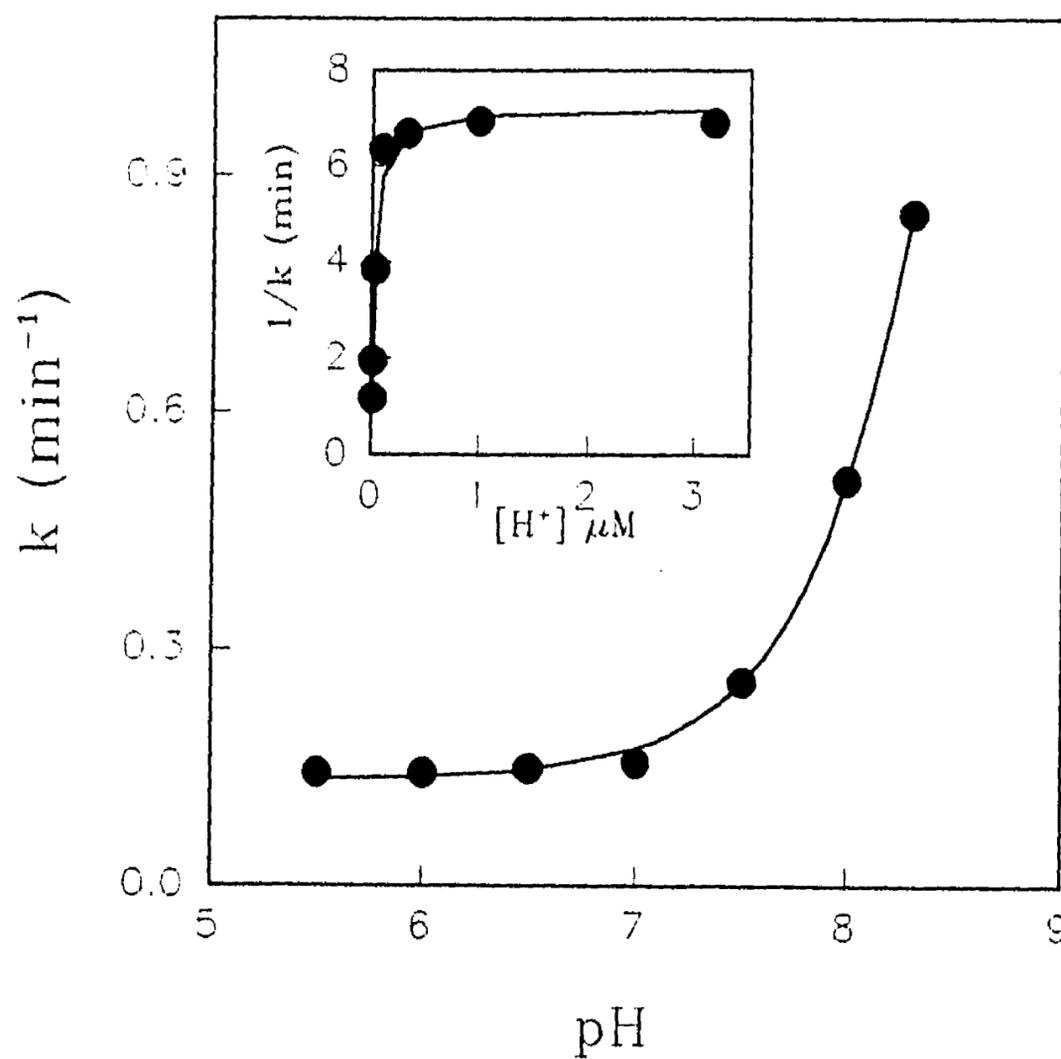


Figura 17. Efecto del pH sobre la inhibición de la ATPasa de H⁺ por el IAEDANS. La ATPasa nativa (0.6mg/ml) se incubó en 50 mM de los siguientes amortiguadores: MES pH 5.5, 6.0 y 6.5, Pipes pH 7.0, Hepes pH 7.25, 7.5, 8.0 y 8.3, en presencia de MgSO₄ 1 mM e IAEDANS 10 mM. La curva de titulación muestra la dependencia de la constante de velocidad de inactivación sobre el pH. En el recuadro, se muestra la doble recíproca de los datos $1/k$ vs $1/[H^+]$.

resultado fortalece la posibilidad de que otros grupos, además de las cisteínas, hayan reaccionado con el IAEDANS.

Debido a que el MMTS bloquea específicamente los grupos SH de la ATPasa, se estudió el efecto inhibitorio del IAEDANS sobre la enzima-MMTS en función del pH. Los resultados mostraron una inhibición de la enzima-MMTS que es independiente del pH (figura 18). Esto sugirió que la especie reactiva no es un grupo SH libre. El perfil de inhibición con respecto al pH, sugiere que la enzima-MMTS reacciona con el IAEDANS a través de un residuo de metionina (o varias metioninas) pero no con histidinas, ya que en este caso se habría observado una dependencia de las constantes de inactivación con respecto al pH.

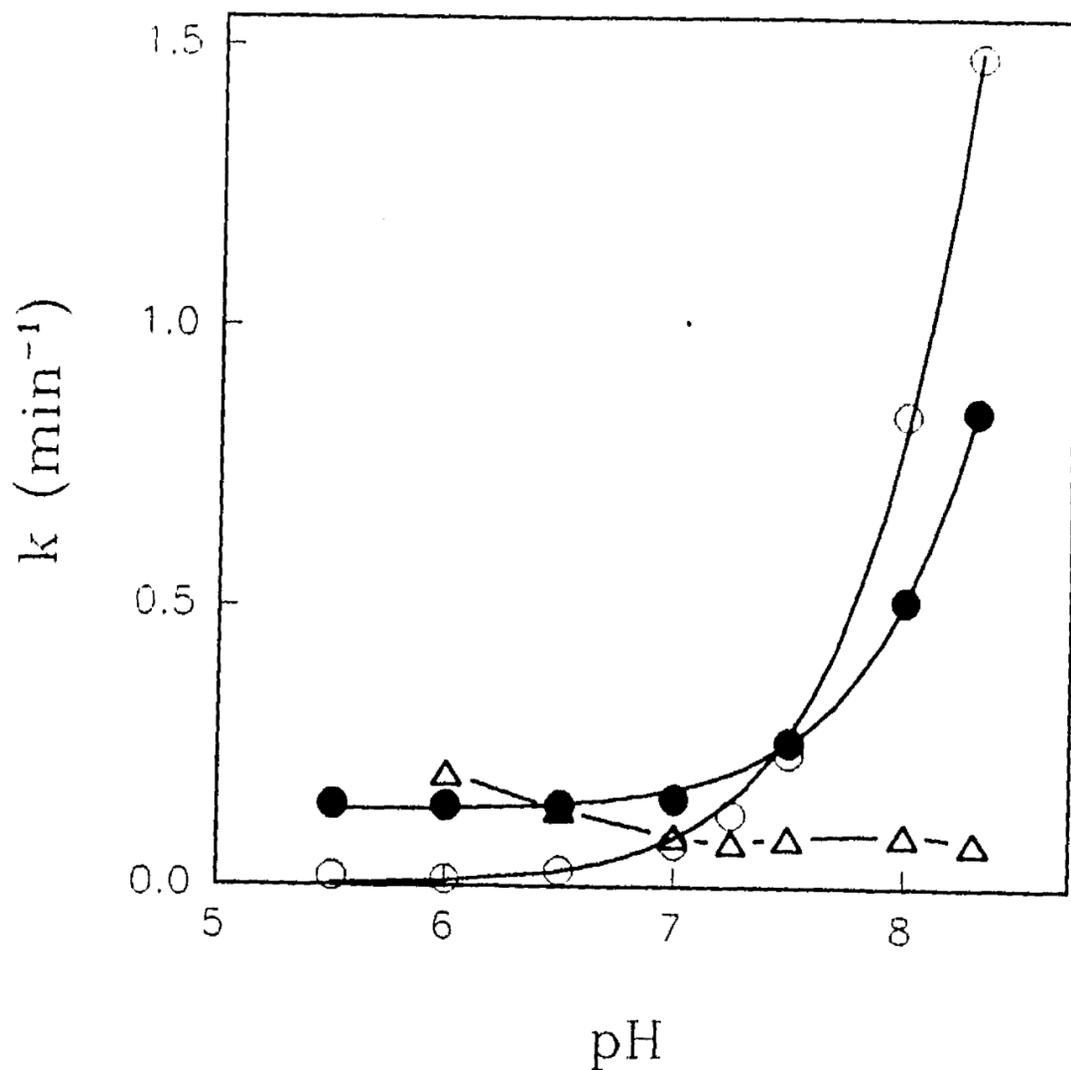


Figura 18. Efecto del pH sobre la inactivación de la ATPasa-MMTS por el IAEDANS. La ATPasa (1mg/ml) se incubó con MMTS 5 mM durante 40 min. La ATPasa-MMTS se recuperó por centrifugación como se mencionó en Materiales y Métodos. La enzima-MMTS (0.56 mg/ml) se incubó a 30°C con IAEDANS 20 mM, en 50 mM de los diferentes amortiguadores, en un intervalo de pH de 6.0 a 8.3 como en la figura 16. La ATPasa nativa se incubó con 5 mM NEM (○) o con IAEDANS 10 mM (●), y la ATPasa-MMTS en presencia de IAEDANS 20 mM (Δ).

VI. DISCUSION.

La ATPasa de H⁺ de *K lactis* es una proteína integral de la membrana plasmática que cruza entre 8 y 10 veces la bicapa. Estas proteínas no se han cristalizado por lo que no se ha podido obtener información sobre su estructura a partir de la difracción de rayos X. En la última década, la modificación química y la mutagénesis dirigida han sido dos de los enfoques mas utilizados para la elucidación de las relaciones estructura-función de algunas ATPasas de membrana (Pedemonte y Kaplan, 1990).

Los grupos tioles de los residuos de cisteína en las proteínas pueden ser modificados fácilmente debido a su gran nucleofilicidad, lo que permite una gran especificidad de los reactivos para sulfhidrilo (Imoto y Yamada, 1990). El efecto inhibitorio de estos reactivos ha sido probado en algunas ATPasas de tipo P (Brooker y Slayman, 1982; Katz y Sussman, 1987; Skou, 1974). Para este trabajo, seleccionamos algunos de los reactivos específicos para sulfhidrilo para explorar la función de los residuos de cisteína durante el ciclo catalítico de la ATPasa de H⁺ de *K lactis*.

VI.1. Purificación de la ATPasa de H⁺.

La purificación de la ATPasa de H⁺ de la membrana plasmática se realizó por el método reportado por Bowman (1981). Las membranas plasmáticas de *S cerevisiae* se han identificado por su morfología, contenido de lípidos, propiedades de tinción (Schneider y cols 1978) y actividad de ATPasa insensible a oligomicina con actividad óptima a pH ácido (6.0-7.0) que la distingue de la ATPasa mitocondrial (pH 8.0-9.0). También se ha reportado algunos marcadores enzimáticos como la manosil transferasa e invertasa (Santos y cols, 1978). Sin embargo, estos marcadores han

producido resultados conflictivos, por lo que, el más recomendable es la actividad de ATPasa, su resistencia a oligomicina y a la azida de sodio y su sensibilidad a vanadato a pH de 6-6.7 (dependiendo de la especie). Una buena preparación de membrana plasmática es aquella que contiene no más del 5% de contaminación por ATPasa mitocondrial. En este trabajo, utilizamos este criterio para cuantificar la contaminación mitocondrial tanto en las membranas plasmáticas como en la fracción purificada por gradiente de densidad. En una sola ocasión pudimos obtener una preparación con un mayor grado de pureza y mayor actividad ($50 \mu\text{mol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), pero este resultado no se pudo reproducir.

VI.2. Inhibición mediada por NEM.

La N-etilmaleimida es uno de los reactivos de mayor uso para marcar los residuos de cisteína debido a su alta especificidad, su disponibilidad en forma radiactiva y su capacidad para formar aductos estables a pH ácido. La reacción con otros grupos puede ocurrir, pero esos derivados son lábiles a pH ácido (Bell y Bell 1988).

La inhibición de la ATPasa de H^+ de *K lactis* por NEM siguió una cinética de pseudo primer orden durante los primeros minutos de inactivación y fue dependiente de la concentración del inhibidor con una constante de segundo orden de $200 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Este valor refleja la rapidez con la cual reaccionan de los residuos de cisteína. Por otro lado, es razonable suponer que varios residuos de cisteína están involucrados en la inactivación de la ATPasa, ya que a tiempos largos la cinética se vuelve compleja. Este comportamiento es compatible con el observado en la inhibición de la ATPasa de H^+ de *N crassa* por la NEM (Pardo y Slayman, 1989) en la que la alquilación de un solo grupo (o grupos cinéticamente similares) obedece una reacción de pseudo-primer orden en los primeros

minutos, y la reactividad hacia la NEM cambia después de los diez minutos, lo que indica que más de una clase de residuos (o de grupos SH cinéticamente diferentes) se está modificando a diferente velocidad.

La interacción del Mg^{2+} con los sitios específicos de unión durante la inhibición de la ATPasa por NEM mostró un comportamiento complejo. En el intervalo micromolar, el Mg^{2+} protegió a la enzima de la inhibición por la NEM, a través de su interacción con un sitio de alta afinidad en la ATPasa ($K_d = 190 \pm 69 \mu M$). Por arriba de 1 mM de Mg^{2+} , la reactividad de la enzima hacia NEM se incrementó con un aumento en la $K_d = 4.9 \pm 2.1$ mM. Esto significa que esta ATPasa posee sitios de alta y baja afinidad para los cationes divalentes. Este mismo comportamiento bifásico ha sido reportado para la ATPasa de *N. crassa*, en la que la interacción con el sitio de baja afinidad también incrementa su sensibilidad hacia la NEM (Brooker y Slayman, 1983). Por otro lado, a diferencia del magnesio, la interacción de la enzima con iones monovalentes (K^+ y Na^+) es de carácter monofásico lo que sugiere un sólo sitio de baja afinidad ($K_d = 56$ mM).

El análisis del efecto del pH sobre la reacción con NEM queda sujeto a las siguientes consideraciones. En principio, los grupos SH de las cisteínas libres en solución acuosa tienen un $pK_a = 8.3$. Cuando las cisteínas se encuentran incorporadas a las proteínas, el valor del pK_a esperado es de 8.5 a 8.8, debido al desacoplamiento ocasionado por los efectos de carga de los sustituyentes α (Cantor y Schimmel, 1980). La interacción de la enzima con la NEM se incrementó con el pH, lo que sugiere que la reacción de la NEM ocurrió con la forma desprotonada del residuo de cisteína. Cuando se estimó el pK_a del grupo con los datos experimentales en el intervalo de pH de 6.5 a 8.5, se obtuvo un $pK_a = 9.02$ y los puntos experimentales presentaron un buen ajuste al modelo (Figura 5). Sin embargo, cuando el intervalo de pH se amplió a valores de 9 y por encima, los valores del pK_a

fueron muy variables y con desviaciones estándar muy altas. Además, las curvas teóricas no se ajustaron a los puntos experimentales. Las variaciones en el pKa y en k, observadas a valores de pH mayores de 9.0 probablemente reflejan la desprotonación de diferentes residuos de aminoácidos que ahora reaccionan con la NEM a valores de pH altos (Smyth y cols, 1964). Las regresiones no lineales obtenidas en el intervalo de pH de 6.5 a 8.5 mostraron un ajuste mejor a los datos y los parámetros obtenidos presentaron desviaciones estándar mínimas. Como la mayoría de los experimentos se realizaron a pH de 7.5, es probable que los residuos de cisteína involucrados en la inactivación a este pH, tengan pKa cercano a 9, lo cual indica que éstas cisteínas no se encuentran en un ambiente hidrofóbico (Cantor y Schimmel, 1980).

En estudios de modificación química es importante establecer si el residuo modificado se encuentra en el sitio de unión con el sustrato o el ligando. Los criterios experimentales para establecer que este sitio de la proteína ha sido marcado durante la modificación, son la protección específica en contra de la inactivación y la estequiometría de la reacción. En experimentos de protección, el inferir que el residuo en estudio se encuentra dentro o cerca del sitio de unión con el ligando, debe tomarse con cuidado ya que existe la posibilidad de que la unión del ligando a su sitio impida estéricamente la entrada del inhibidor o produzca cambios conformacionales que eviten la interacción del residuo con el agente modificador. Para aclarar esto se requiere de mayor información, como sería la identificación del residuo modificado en la secuencia de la proteína (Bell y Bell, 1988). A este respecto, se ha reportado que el MgADP protege a algunas de las ATPasas de tipo P en contra de la inactivación por NEM, de lo que se infiere que las cisteínas modificadas se encuentran dentro o cerca del sitio de unión con el nucleótido (Brooker y Slayman, 1982; Katz y Sussman, 1987; Winslow, 1981). En *N crassa* la protección por MgADP en contra de la inactivación por la NEM es

total, y la inactivación se produce cuando la cis532 se modifica (Brooker y Slayman, 1982; Davenport y Slayman, 1989). Esta cisteína se encuentra muy cerca del sitio de fosforilación y de unión con el nucleótido, y es por ello que el MgADP protege totalmente a la enzima (Pardo y Slayman, 1989). Sin embargo, existen excepciones como es el caso de la ATPasa de H⁺ de la raíz de avena en la que la protección por MgADP parcial, por lo que se ha inferido que posiblemente esto se deba a cambios conformacionales producidos por la entrada del nucleótido, ya que disminuye la accesibilidad de las cisteínas reactivas (Katz y Sussman, 1987).

Para la ATPasa de H⁺ de *K lactis*, la protección mediada por el MgADP en contra de la inhibición por la NEM no fué completa. Esto podría tener dos interpretaciones: a) hay al menos dos grupos sulfhidrilo, uno situado en, o cerca del sitio de unión con el ligando, con una reactividad que puede ser modulada por la unión del nucleótido y otro grupo SH, que se encuentra alejado del sitio de unión con el ATP y no puede ser influenciado por la unión del MgADP, o b) hay un solo grupo sulfhidrilo que reacciona con la NEM, el cual sufre cambios en su accesibilidad debido a las transiciones conformacionales ocasionadas por la unión del MgADP a la enzima. Los resultados obtenidos en este trabajo, con la ¹⁴C-NEM, apoyan la primera propuesta, por las siguientes razones: 1) En ausencia de MgADP, la estequiometría de la inactivación indicó que hay tres cisteínas que reaccionan con el monómero de ATPasa; las primeras dos fueron responsables del 80 % de la inactivación de la enzima. 2) En presencia de MgADP, sólo dos residuos de cisteína se incorporaron: la modificación del primero tuvo un ligero efecto sobre la actividad, mientras que el segundo, estuvo involucrado en la inactivación. Esta estequiometría concuerda con una posible estructura monomérica de la enzima que está relacionada con la cinética hiperbólica exhibida por la ATPasa de H⁺ de *K lactis* (dato no mostrado).

Por tanto, el sitio que se protege con MgADP debe corresponder con el sitio activo de la enzima. El MgADP es un inhibidor competitivo de la actividad enzimática (Brooker y Slayman, 1982), y, para la ATPasa de H⁺ de *K lactis*, la K_i = 1.72 mM (Pardo y cols, manuscrito en preparación), Por otro lado, en los experimentos de protección de la enzima contra la inactivación por NEM, la K_d para el MgADP fue de 2.9 mM. Ambos valores son muy cercanos, lo cual sugiere que el MgADP protegió a la enzima al interactuar con el sitio activo y apoya la propuesta de que existe al menos una cisteína en o cerca del sitio de unión del MgADP.

Como se indicó anteriormente, en la ATPasa de H⁺ de *N crassa*, la C-532 reacciona con la NEM y la enzima se inactiva (Pardo y Slayman, 1989). La reacción se previene por MgADP o MgATP, lo que sugiere que este residuo se encuentra cerca del sitio de unión del ATP (Brooker y Slayman, 1982; Pardo y Slayman, 1989). Aún más, esta C532, se conserva en todas las ATPasas de H⁺ de los hongos (Wach y cols, 1992) (Tabla 2). Por otra parte, la ATPasa de H⁺ de *K lactis* y la ATPasa de H⁺ de *S cerevisiae* contienen a la cisteína 221 (Miranda y cols, 1995) (Tabla 2). Por lo tanto, es posible que en la ATPasa de H⁺ de *K lactis* la C532 y la C221 sean los residuos que participan en la inhibición de la enzima por la NEM. La C532 corresponde al residuo que se protege por MgADP, mientras que la C221 reacciona independientemente del MgADP, ya que se encuentra localizada en el asa pequeña, situada entre el segundo y el tercer segmento membranal, en donde las mutaciones tienen fuertes efectos sobre la enzima (Gishlain y cols, 1987; Serrano y Portillo, 1990). Esta suposición se apoya por resultados de mutagénesis puntual, en los que cada una de las cisteínas de la ATPasa de *S cerevisiae* se reemplazaron por alanina, y se observó que el cambio de C532-Ala o C221-Ala redujo la constante de inactivación de la enzima por NEM. Además, la mutante C221-A se protegió totalmente por el MgADP en contra de la inhibición por NEM (Petrov y cols, manuscrito

en preparación).

Tabla 2. Cisteínas de *N crassa*, *S cerevisiae* y *K lactis*. Comparación de secuencias. Las cisteínas 148, 312, 840 y 869 (867) se encuentran en los segmentos transmembranales. C376 se encuentra cercana al sitio de fosforilación.

Levaduras	Posición de las cisteínas en la secuencia de aminoácidos										
<i>Neurospora crassa</i>	148	---	---	376	409	472	532	545	---	840	869
<i>S cerevisiae</i>	148	221	312	376	409	472	532	----	569	----	867
<i>Kluyveromyces lactis</i>	148	221	----	376	409	472	532	----	569	840	867

VI.3. Interacción de la ATPasa de H⁺ con IAEDANS. El IAEDANS ha sido utilizado para localizar residuos de cisteína en dominios hidrofílicos de la ATPasa de H⁺ de *N crassa*, gracias a sus propiedades fluorescentes (Pardo y Slayman, 1989). En la ATPasa de H⁺ de *K lactis*, la reacción con IAEDANS siguió una cinética de pseudo primer orden en los primeros 10 minutos de incubación, y fue de carácter complejo a tiempos mayores, sin alcanzar una inactivación total; esto indica la reacción de varios residuos con el reactivo. La relación lineal entre las constantes de velocidad de inactivación y las concentraciones del reactivo indicaron que el proceso de inactivación es de carácter bimolecular, descrito por una constante de velocidad de inactivación de segundo orden con un valor de $k = 21.4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Con el IAEDANS, la velocidad de reacción es un orden de magnitud menor que la producida por la NEM ($200 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$); ambas moléculas difieren en tamaño y carga (figura 3), lo que hace pensar que la accesibilidad relativa de las cisteínas hacia estos reactivos puede afectar la

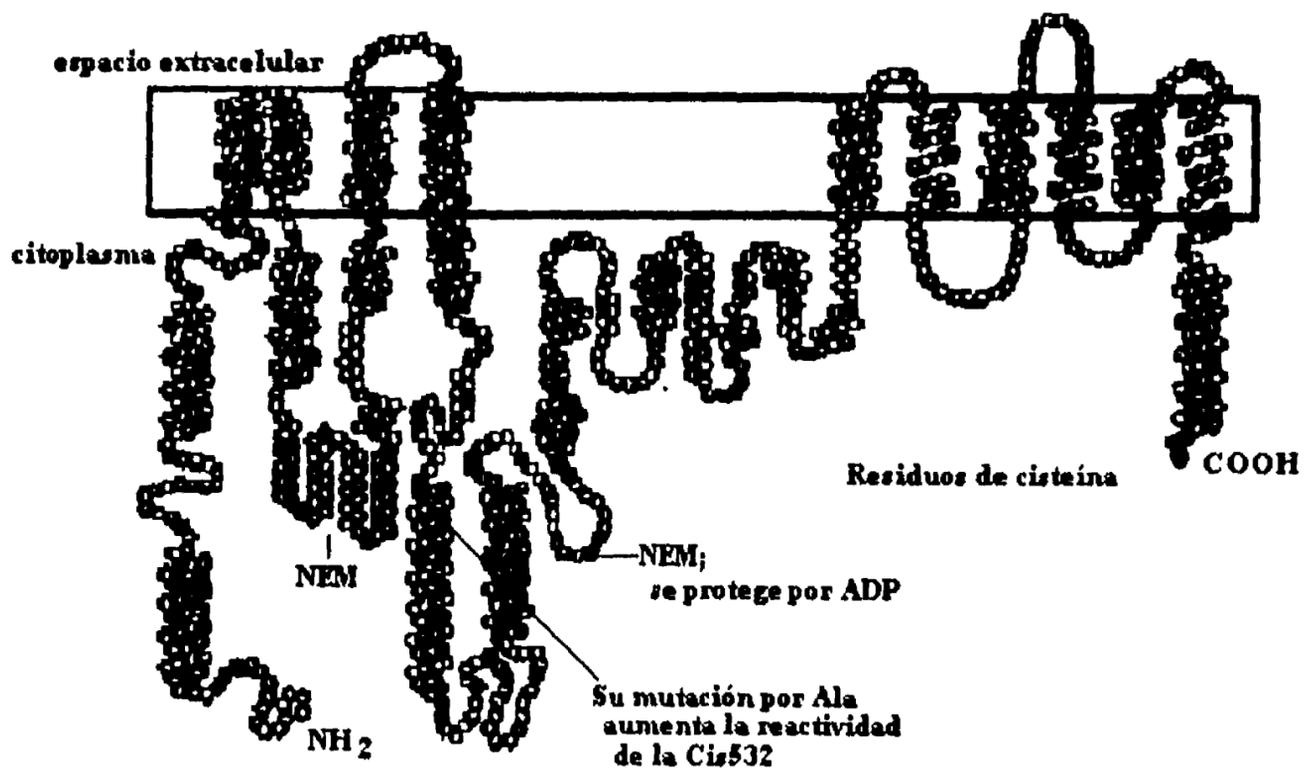


Figura 19. Modelo topológico de la ATPasa de H⁺ de *S. cerevisiae*. Mutagénesis puntual de los residuos de cisteína . Las cisteínas fueron cambiadas a alanina. El cambio C221-A permite que la enzima se proteja totalmente con el MgADP de la inhibición por la NEM.

velocidad de inactivación.

En presencia del MgADP, la protección de la ATPasa en contra de el IAEDANS (10%) fue mucho menor que contra de la NEM (80%), lo que apoya la hipótesis de que el IAEDANS reacciona con algún otro residuo (s) localizado fuera del sitio de unión del ATP.

El efecto del magnesio requiere de mayor atención. Los datos que se muestran en la fig 12 son difíciles de explicar si se considera que el Mg^{2+} interactúa con sitios de unión específicos sobre la proteína. Si así fuera, debería obtenerse una curva con componentes hipernólicas como la que se observó para la NEM (figura 7A). El efecto del Mg^{2+} , en este caso, podría ser analizado en términos de un cambio en fuerza iónica o una alteración en el potencial de superficie. Se conoce que la dependencia de la constante de velocidad (k) con respecto a la fuerza iónica para una reacción entre dos reactivos cargados esta descrita por la siguiente ecuación (6):

$$\log k = \log k_0 + 2 A z_A z_B \cdot \sqrt{\mu} \quad (6)$$

donde k_0 es la constante de velocidad a dilución infinita, z_A y z_B son las cargas de los reactivos, A el factor de Debye-Huckel, con un valor de 0.509 a 25°C, y μ la fuerza iónica del medio (Atkins 1990).

Si suponemos que el $MgSO_4$ es el único contribuyente a la fuerza iónica, y asignamos un valor de 0.1 para k_0 , puede demostrarse que la dependencia de la constante de velocidad con respecto a la concentración del magnesio se ajusta a una línea recta en el intervalo de 4 mM ($\mu= 16$ mM) a 20 mM ($\mu=0.283$ mM). Además, la contribución del amortiguador a la fuerza iónica fue cercana a 25 mM, valor que se puede esperar y se encuentra dentro del dominio lineal de la simulación. Por lo tanto, con estas consideraciones, se puede esperar una relación lineal entre las constantes de velocidad de inactivación y las concentraciones del Mg^{2+} , como se muestra en los resultados (Fig.13). La pendiente de la línea recta es positiva, debido a que ambos reactivos presentan carga negativa (el anión tiolato

y el IAEDANS presentan una carga de -1). O, en caso de que el IAEDANS reaccione con una metionina esta se encuentra en un ambiente con carga negativa. Por otro lado, puede aventurarse la posibilidad de que la linearidad de la curva puede también ser resultado de apantallamiento de un potencial negativo que rodea a los residuos de cisteína y/o metionina por los iones Mg^{2+} . Cualquier reducción del potencial de superficie negativo por la adición de sales reducirá la repulsión entre el inhibidor y el microambiente de la cisteína, el cual facilitará la reacción. Resultados similares se han reportado con la ATPasa de *N. crassa*, utilizando isotiocianato de fluoresceína como inhibidor (Pardo y Slayman, 1988).

La reacción de la H^+ ATPasa con el IAEDANS fue dependiente del pH. Contrario a la NEM, una parte de la reacción de la ATPasa reaccionó con el IAEDANS por debajo de pH 7, lo que sugiere la participación de otros residuos además de las cisteínas (figura 3). A pH alto, los residuos de cisteína reaccionaron con un pK_a de 9.34 ± 0.3 . Este valor se parece al obtenido con la NEM, lo que sugiere que ambos inhibidores reaccionan con residuos de cisteína que presentan el mismo grado de accesibilidad o que se encuentran en un microambiente similar, aunque difieren en su comportamiento frente al magnesio.

Con respecto a la reactividad de otros grupos a bajo pH, debe recordarse que los agentes alquilantes como el IAEDANS, que es un derivado fluorescente de la yodoacetamida, puede reaccionar con otros aminoácidos como son la metionina, la lisina o la histidina (Bell y Bell 1988; Lundbald y Noyes 1984). La reacción de yodoacetamida con lisina, ocurre a pH por arriba de 8.5, mientras que la reacción con histidina y metionina ocurre a un pH por debajo de 7-7.5 (Bell y Bell 1988). Aún más, en contraste con la metionina, la reacción de la yodoacetamida con las cisteínas, histidinas y lisinas es función del pH, ya que solamente las formas desprotonadas de los residuos

reaccionan con el inhibidor. El pH utilizado en este trabajo fué de 7.5, condición que permite la reacción con cisteínas, histidinas y metioninas. Para las cisteínas, el pKa de la reacción está alrededor de 9, como se indicó anteriormente, y la formación del aducto se lleva a cabo con la forma desprotonada de la cisteína (Gorin y cols, 1966). Sin embargo, la reacción de la metionina con el yodoacetato o sus derivados, es independiente del pH y procede más lentamente que la reacción con cisteínas en condiciones alcalinas suaves (Gundlach y cols, 1959). Por lo tanto, es posible que la inactivación a pH ácido que se observa en la ATPasa de H⁺ de *K lactis* corresponda a la reacción del IAEDANS con una metionina (Gundlach y cols, 1959).

Experimentos realizados con la ATPasa de H⁺ de *N crassa* muestran que el IAEDANS reacciona rápidamente con la C545 sin que haya pérdida de la actividad (Pardo y Slayman, 1989). Por tanto, la inactivación por el IAEDANS se adjudicó a una cisteína localizada en los segmentos transmembranales, debido a que no se pudo obtener el péptido modificado. Sin embargo, los resultados obtenidos con la ATPasa de *K lactis* señalan que al menos una cisteína de la porción citoplásmica, con un pKa de 9.3, reacciona con el reactivo (descartando a la C545 por carecer de ella), y que otro residuo, posiblemente una metionina, reacciona con el IAEDANS produciendo inactivación. Esta metionina, en lugar de una cisteína del segmento transmembranal, podría ser la causante de la inactivación por IAEDANS en la ATPasa de *N crassa*, ya que en ese trabajo no se realizó un estudio detallado del efecto del pH.

VI.4. Inhibición de la ATPasa-MMTS por IAEDANS. Contrario a la reacción con NEM, la enzima modificada por MMTS se inhibió por IAEDANS, siguiendo una cinética de reacción bimolecular con una constante de segundo orden de 4.7 M⁻¹ min⁻¹. La menor reactividad de la

ATPasa-MMTS contrasta con la reactividad de la ATPasa nativa, en la que se encuentran mas residuos involucrados en la reacción. Similar a la enzima nativa, el Mg-ADP protege muy poco (dato no mostrado) y el Mg²⁺ incrementa linealmente la constante de velocidad de inactivación. Puesto que las cisteínas de la ATPasa fueron bloqueadas por el MMTS, estos resultados sugieren que el IAEDANS reacciona con un residuo diferente, que se encuentra alejado del sitio de unión con el nucleótido, y que el magnesio, al cambiar el potencial eléctrico descrito alrededor del residuo, modifica su reactividad con el IAEDANS. Adicionalmente, la inhibición realizada por el IAEDANS sobre la ATPasa modificada con MMTS mostró muy poca dependencia del pH. Considerando lo anteriormente citado sobre la reactividad de las metioninas frente a agentes alquilantes, es probable que sea una metionina en lugar de una lisina o histidina la que reaccione con el IAEDANS. Puesto que existen reportes de que este péptido no se eluye de una columna C-18 en una cromatografía de alta presión de fase reversa, este residuo de metionina podría estar en cualquiera de los segmentos hidrofílicos conectados a los segmentos hidrofóbicos. Los residuos que cumplen con estas características son la met 105, 128, 346, 688, 758, y 791. Sin embargo, la identificación directa de los residuos de cisteína o metionina que reaccionan con el IAEDANS sólo se obtendrá por la purificación del péptido marcado y su secuenciación. Para lograr esto, la estrategia consiste en purificar los péptidos tripticos de la enzima nativa y desnaturalizada modificada con IAEDANS y con MMTS-IAEDANS. La secuencia de aminoácidos de los péptidos modificados indicarán el residuo que reacciona con el IAEDANS. Estos experimentos se encuentran en vias de desarrollo.

En este trabajo hemos mostrado, a través de la modificación química de los residuos de cisteína, que existen diferencias entre la H⁺ATPasa de *K lactis* y la H⁺ATPasa de *N crassa*. Esta

diferencia en comportamiento frente a reactivos voluminosos para grupos SH, como lo son la NEM y el IAEDANS, probablemente sea resultado de la presencia de la Cis221. Por otro lado, al igual que con *N crassa*, las cisteínas presentes en la ATPasa de H⁺ de *K lactis* no son esenciales para la actividad, (Davenport y Slayman, 1988). La modificación selectiva por MMTS de los grupos tioles de la H⁺-ATPasa de *K lactis* que resulta en una enzima insensible ala NEM pero sensible al IAEDANS, permite sugerir que existe una metionina capaz de reaccionar con el IAEDANS, posiblemente en una región hidrofílica. Este trabajo es una muestra de la utilidad de la modificación química para el estudio de la relación estructura-función de las proteínas, ya que los resultados descritos contribuyen al conocimiento de la reactividad de varias cisteínas de la ATPasa de H⁺ de *K lactis* frente a reactivos específicos para sulfhidrílos, así como a su probable localización dentro del sitio para el ATP. Además la combinación de reactivos para grupos SH con diferentes características, puede ser utilizada para otros residuos involucrados en la actividad o estructura de la enzima.

VI.5. Perspectivas. El estudio de la relación estructura-función de las P-ATPasas ha avanzado aún en ausencia de la información cristalográfica sobre la estructura tridimensional de la enzima. La perspectiva de estudio actual está dirigida a identificar los dominios de la proteína que ejercen funciones específicas, como son la interacción con el sustrato, el transporte del protón a través de la membrana y el acoplamiento entre la hidrólisis del ATP y el bombeo del ion hacia el exterior de la célula. Las técnicas de DNA recombinante pueden ser empleadas para introducir residuos de cisteínas nuevos en lugares pre-determinados en la proteína. Estos residuos pueden ser utilizados como sitios para la formación de entrecruzamiento con reactivos bifuncionales de longitudes conocidas, de tal forma que sea posible producir mapas de la topografía de la proteína.

VII. CONCLUSIONES.

1. La interacción de la ATPasa de H^+ de *Kluyveromyces lactis* sigue una cinética compleja frente a los reactivos N-etilmaleimida e IAEDANS.
2. La ATPasa de H^+ de *K lactis* contiene al menos una cisteína cerca o dentro del sitio activo que no es esencial para la actividad de la enzima. Las otras dos cisteínas que reaccionan con la NEM están lejos del sitio de unión para el Mg-ADP.
3. La unión del Mg^{2+} a un sitio de alta afinidad en la ATPasa de H^+ protege parcialmente a la enzima. Probablemente, este sitio contenga una cisteína.
4. La ATPasa de H^+ de *K lactis* tiene un sitio de baja afinidad para cationes monovalentes. La unión del Na^+ o el K^+ a este sitio aumenta la inhibición de la enzima por los reactivos específicos para grupos SH, probablemente debido a un cambio conformacional que aumenta la accesibilidad de los residuos de cisteína.
5. En la ATPasa de H^+ se detectó un residuo, probablemente metionina, que reacciona con el IAEDANS. La modificación de las cisteínas con MMTS permite analizar la cinética de la reacción de las metioninas con el IAEDANS.
6. La cisteína 221, presente en la ATPasa de H^+ de *Kluyveromyces lactis* y *Saccharomyces*

cerevisiae, es el residuos que podría generar las diferencias cinéticas entre las ATPasas de H⁺ de estas levaduras y la de *Neurospora crassa* al reaccionar con NEM.

VIII. ABREVIATURAS.

NEM : N-etilmaleimida. MMTS: metilmetano tiosulfonato. IAEDANS : ácido N-yodoacetil-N'-(sulfo-1-naftil) etilendiamino. ATP: adenosín trifosfato. ADP: Adenosín di fosfato. Hepes: N-2-(hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico). Mes: ácido 2-{N-Morfolino}etano sulfónico. PIPES: ácido piperazina-N-N'-bis[2-etanosulfónico]. EDTA: ácido etilén diaminotetra acético. DOC: desoxicolato de sodio. AMPSO: ácido 3-(1,1-dimetil-2-hidroxietil) amino-2-hidroxiipropen sulfónico. PVDF difluoruro de polivinilideno (membranas).

IX. BIBLIOGRAFIA.

- Addison, R. y Scarborough, G.A. (1986) *Biochem.* **25**, 4071-4076.
- Ahlers, J. (1981). *Biochim Biophys Acta.* **649**, 550-556.
- Ahlers, J. (1984). *Can J Biochem Cell Biol* **62**, 998-1005
- Amory , A., Goffeau, G.A., McInthosh, D.B y Boyer, P.B. (1982). *J Biol Chem*, **257**: 12509-12516.
- Amzel , L M y .Pederse, P.L. (1983) *Annu Rev Biochem.* **52**, 801-824.
- Ball, E.H. (1986) *Anal Biochem.* **155**, 23-27.
- Bell, J.E y Bell, E. T (1988). En : *Proteins and Enzymes*. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey. Cap 7, pag 132-183.
- Bensadoun, A., y Weinstein, D. (1976). *Anal Biochem* **70**, 241-250.
- Bowman B.J. y Bowman E.J.(1986)*J Membrane Biol.* **94**: 83-97
- Bowman, B.J., Mainzer, S.E., Allen, K.E y Slayman, C.W. (1978) *Biochim Biophys Acta.* **512**, 13-28
- Bowman, B.J., Blasco, F y Slayman, C.W. (1981) *J Biol Chem* **256**, 12343-12349.
- Brooker, R.J. y Slayman, C.W. (1982). *J Biol Chem.* **257**, 12051-12055.
- Brooker, R.J. y Slayman, C.W. (1983). *J Biol Chem* **258**, 222-226.
- Brocklehurst, K. (1979). *Int J Biochem.* **10**, 259-274.
- Brunner, A., Mas, J., Celis, E y Matton, R. (1973). *Biochem Biophys Res Commun.* **53**, 638-645.
- Brunner A. , Mendoza, V y Tuena de Cobos, A. (1987). *Curr Gen.* **11**, 475-482.
- Brunner, A y Tuena de Cobos, A. (1980). *Molec Gen Genet* **178**, 351-355.
- Brunner , A, Tuena de Cobos, A. y Griffiths, D.E. (1977) *Molec Gen Genet* **152**, 183-191.

- Cantor , Ch. R y Schimmel, P.R. (1980).En : Biophysical Chemistry Part I. the conformation of Biological molecules, W.H. Freeman and Company. N.Y. cap. 2, pag 41-153.
- Carter, J.R., Fox, C.F. y Kennedy, E.P. (1986). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 60, 725-730.
- Celis, E., Mas, J. y Brunner, A. (1975) *Genetics Res Camb.* **25**, 59-69.
- Chang, A., y Slayman, C.W. (1990). *J Biol Chem.***265**,15531-15536.
- Dame, J.B. y Scarborough,(1980). *Biochemistry*,**19**, 2931-2937.
- Da Silva N.A. y Bailey JE (1991a). *Biotechnol Bioeng.* **37**, 309-317.
- Da Silva ,N.A. y Bailey, JE (1991b).*Biotechnol Bioeng.***37**, 318-324.
- Davenport, J.W., y Slayman, C.W. (1988) *J Biol Chem* **263**, 16007-16013.
- Del Giudice L. y Bruner, A. (1977). *Molec Gen Genet* **152**, 325-329.
- Dufour, J.P. y Goffeau, A. (1980). *Eur J Biochem.* **105**, 145-154.
- Eraso, P. y Gancedo, C. (1987). *FEBS Lett.***224**,187-192.
- Falcone, C., Saliola, M., Chen, X.J. , Frontali, L. y Fukuhara, H. (1986). *Plasmid* **15**, 248-252.
- Fiske, C.H. y Subbarow, Y. (1925) *J Biol Chem.* **66**, 375-400.
- Fleer, R. (1992). *Curr Opinion Biotechnol.* **3**, 486-496.
- Forgac, M (1989). *Physiol Rev.* **69**: 765-796.
- Foster, D.L .y Fillingame , R.H. (1979). *J Biol Chem.* **254**, 8230-8236.
- Gishlain , M., Schlessner, A. y Goffeau, A. (1987). *J Biol Chem.* **262**, 17549-17555.
- Goffeau A., y Slayman, C.W. (1981). *Biochim Biophys Acta* **639**: 197-223.
- Gorin, G., Martic, P.A.y Doughty, G. (1966).*Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 593-599.
- Grandman, D., Hansen, U.P., Long, W.S Slayman, C.L. (1978). *J membrane Biol.* **39**: 333-367.

- Gundlach, H.G., Moore, S., and Stain, W.H. (1959). *J Biol Chem.* **234**, 1761-1763.
- Hager, K.M. Mandala, S.M. Davenport, J.W. Speicher, D.W., Benz, Jr., E.J y Slayman, C.W. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA.* **83**, 7693-7697.
- Hussein, L Elasyed , S y Fod, S. (1989) . *J Food Prot.* **52**, 30-34.
- Imoto, T y Yamada, H. (1990). En : *Protein Function a practical approach*. Editado por Creighton, T.E. IRL Press Oxford University Press. Oxford Inglaterra. cap 10, pag 247-277
- Innis MS (1989). Glycosilation of heterologus proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. En: *Yeast Genetic engeneering*. Barr, J., Brake, A.J. y Valenzuela, P (Eds). .Butterworths, Boston. pag 233-264.
- Johnston, JR, Contopoulu, CR y Mortimer, RK.(1988). *Yeast* **4**, 195-198.
- Kasher, J,M. (1986) *J Biol Chem.* **261**, 10808- 10813.
- Katz, F.B. y Sussmman, M.R. (1987) *Plant Physiol* **83**, 977-981.
- Kingsman, S.M. Kingsman, AJ y Mellor, J (1987). *Trends Biotechnol.* **5**, 53-57.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature (London)* **227**, 680-685.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). *J Biol Chem.* **193**, 265-275.
- Lundbald, R.L , y Noyes, C.M. (1984). En: *Chemical reagents for protein modification*, vol **1**. Cap. **6** pag 55-93 . CRC Press Inc Boca Raton Fla.
- Mandala , S.M. y Slayman C,W (1989), *J Biol Chem.* **264**, 16276-16281.
- Miranda, M, Ramírez, J, Peña, A y Coria, R. (1995) *J Bacteriol.* **177**, 2360-2367
- Morjana, N.A. y Scarborough G.A. (1989) *Biochim Biophys Acta.***985**, 19-25.
- Nakamoto,R.K., Rao, R y Slayman, C. W.(1989) *Annals of N Y Acad Sci.* **574**, 65-179.

- Panet, R. y Selinger, Z. (1970). *Eur. J. Biochem.* **14**, 440-444
- Pardo J.P y Slayman, C.W. (1988). *J Biol Chem.* **263**, 18664-18668
- Pardo ,J.P. y Slayman, C.W. (1989) *J Biol Chem.* **264**, 9373-9379.
- Pedersen , P.L. y Carafoli, E. (1987). *TIBS*, **12**, 146-150.
- Pedemonte, C.H y Kaplan, J.H. (1990). *Am. J Physiol.* **258**, C1-C23.
- Penefsky, H.S. (1977). *J Biol Chem* **252**, 2891-2899.
- Portillo , F y Serrano, R. (1989). *Eur. J Biochem.* **186**, 501-507.
- Portillo, F., de Larrinoa, I.F., Serrano, R. *FEBS Lett.* (1989). **247**, 381-385.
- Rao, R., Nakamoto, R.K. Y Slayman, C.W. (1989). En : *Ion transport* . D. Keeling and C. Benham (Eds). Academi Press New York . pag 35-53.
- Renosto, F., Seubert, P.A. Knudson, P. y Segel, I.H. (1985). *J Biol Chem* **260**, 1535-1544.
- Santos, E. , Villanueva, J. y Sentandreu, R. (1978). *Biochim Biophys Acta* **508**, 39-54.
- Schneider, H. Fiechter, A y Fuhrmann, G.F. (1978). *Biochim Biophys Acta* **512**, 495-507.
- Smith, D.J. Maggio, E.T. y Kenyon, G.L. (1975) *Biochemistry* **14**, 766-771.
- Smyth, D.G, Blumenfeld, O.O. y Konigsberg, W. (1964). *Biochem J.* **91**, 589-592.
- Serrano, R. (1988). *Biochim. Biophys Acta.* **947**: 1-28.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C. y Fink, G.j. (1986) *Nature* (London), **319**: 689-693..
- Serrano, R, y Portillo, F. (1990). *Biochim Biophys Acta.* **1018**, 195-199.
- Skou , J.C. (1974) . *Biochim Biophys Acta* **339**, 234-245.
- Shull, G.E., Schwartz, A y Lingrel, J.E. (1985). *Nature (London).* **316**, 691-695.
- Susman, M.R. y Slayman, C.L. (1983). *J Biol Chem* **258**, 1839-1843.
- Sussman ,M.R., Strickler,J.E., Hager, K.M. y Slayman, C.W. (1987). *J Biol Chem.* **262**, 4569-

4573.

Swinkels, B.W. van Oyen, A. J.J. y Bonekamp, F.J.(1993). *A van Leewenhoek* **64**, 187-201.

Sze,H. (1985) *Annu Rev.i. Plant Physiol.*36, 175-208.

Taylor, W.R. y Green, N.M. (1989). *Eur Journ Biochem.* **179**, 241-248.

Wach, A., Schlessler, A., y Goffeau, A., (1992). *J Bioen Biomemb.* **24**, 209-317.

van der Walt JP (1970). En: *The Yeasts* Lodder J (Ed). North Holland Publ.Comp
Amsterdam. pag 316-352

van der Walt JP y Johansson E, (1984). En : *The yeasts*. Kreger-van Rij NJW (Ed).Elsevier
Science Publ. Amsterdam pag 224-251.

Winslow, J.W. (1981) *J Biol Chem* **256**, 9522-9531.

Young, N.M. y Kaplan, H. En: *Protein function a practical approach*. Edit. por Creighton, T.E.
IRL Press Oxford Inglaterra. Cap **9** pags 225-246.

X. Apéndice.

Trabajos derivados de esta Tesis :

"Las ATPasas de H⁺ de los hongos" (revisión bibliográfica)

"Reactivity of the H⁺ATPase from *Kluyveromyces lactis* to sulfhydryl reagents"

Trabajo en colaboración :

"Sulfhydryl groups essential for the volume-sensitive release of taurine from astrocytes"

LAS ATPasas DE PROTONES DE LOS HONGOS¹.

Guadalupe Guerra², Salvador Uribe^{*} y Juan Pablo Pardo['].

^{*}Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo Postal 70-242, 04510, México DF y [']Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM Apdo Postal 70-159, 04510, México DF, México.

¹Fondos parciales para realizar este trabajo provienen de la DGAPA/UNAM, donativos IN206689 e IN200694 y del CONACYT, donativo 400346-5-3188N.

²Becaria del CONACYT, programa del doctorado.

³Abreviaturas:

(DEP) Dietilpirocarbonato; (DCCD) Diciclohexilcarbodimida; (DES) Dietil estaño; (EEDQ) N-etoxicarbonil-2-etoxi-1-2-dihidroquinoleina; (FITC) Isotiocianato de fluoresceína
(NEM) N-etilmaleimida; (MMTS) Metilmetano tiosulfonato; (IAEDANS) N-yodoacetil aminoetil-5-naftilamina-1 del ácido sulfónico; (NBD-Cl) 4-cloro-7-nitrobenza-2-oxa-1,3 diazole; TNP-ATP: 2'(3')-trinitrofenil adenosin-5'-trifosfato.

INDICE

- I Generalidades de las ATPasas.
- II. Clasificación de las ATPasas.
 - II.1. Las F_1F_0 ATPasas.
 - II.2. Las V-ATPasas.
 - II.3. Las P-ATPasas.
- III. La H^+ ATPasa de la membrana plasmática de hongos y levaduras.
 - III.1. Fisiología de la H^+ ATPasa de la membrana plasmática de levaduras y hongos.
 - III.2. Regulación de la protón ATPasa de la membrana plasmática.
 - III.3. Estequiometría de la bomba de protones.
 - III.4. Ciclo de reacción.
 - III.4.i. Primer paso: unión ATP/enzima.
 - III.4.ii. Segundo paso: fosforilación de la H^+ ATPasa.
 - III.4.iii. Tercer paso: transición de E_1 a E_2 .
 - III.4.iv. Cuarto paso: liberación del protón.
 - III.4.v. Quinto paso: hidrólisis de la unión E_2P .
- IV. Purificación y estructura de la H^+ ATPasa de hongos y levaduras.
 - IV.1. Estructura primaria de la H^+ ATPasa.
 - IV.2. Modelo topológico de la H^+ ATPasa.
 - IV.3. Aspectos genéticos de la H^+ ATPasa.
- V. Estudios de la relación estructura-función de la H^+ ATPasa de hongos y levaduras.
 - V.1. Sitio de fosforilación y desfosforilación.
 - V.2. Sitio de fijación del ATP.
 - V.3. Segmentos transmembranales.
 - V.4. Segmentos amino y carboxilo terminal.
- VI. Sistemas de expresión de la H^+ ATPasa modificada por mutagénesis dirigida.
- VII. Perspectivas
- VIII. Bibliografía.

I. Generalidades de las ATPasas.

En la célula, el adenosín-trifosfato (ATP) es la forma de energía química rápidamente utilizable: la síntesis o hidrólisis del ATP debe ser exquisitamente controlada por la célula para responder a las demandas y suministros de energía que su metabolismo y el medio externo imponen (Pedersen y Carafoli, 1987). El ATP se sintetiza en la glucólisis y en la fosforilación oxidativa, y se hidroliza en procesos como la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y la contracción muscular. También las ATPasas membranales hidrolizan al ATP y acoplan la energía liberada con el transporte activo de iones, y crean gradientes iónicos que luego se aprovechan para generar señales eléctricas o en el cotransporte de nutrientes y otros iones (Figura 1).

Las ATPasas celulares catalizan dos grupos de reacciones: las ATPasas tipo F sintetizan ATP durante la fosforilación oxidativa, mientras que las ATPasas tipo P y las tipo V se encargan de acoplar la hidrólisis del ATP con procesos tan variados como el transporte de iones y nutrientes, la relajación muscular, el reciclaje de receptores, el almacenamiento de hormonas y la acidificación gástrica.

II. Clasificación de las ATPasas.

Las ATPasas son enzimas de membrana que, de acuerdo a su composición proteica, localización celular y mecanismo de acción, se han dividido en tres grupos: las F-ATPasas (F_1F_0 o mitocondriales), las V-ATPasas (vacuolares), y las P-ATPasas (fosforilables) (Tabla I). Una de las herramientas que más han servido para caracterizar a las diferentes ATPasas, son los inhibidores específicos de cada tipo de ATPasa (Tabla II).

II.1. Las F_1F_0 ATPasas.

Las ATPasas F_1F_0 o ATPasas tipo F se encuentran en bacterias, cloroplastos y mitocondrias (Amzel y Pedersen, 1983), y consisten de una parte soluble (F_1) involucrada en la catálisis (síntesis o hidrólisis del ATP) y una parte hidrofóbica (F_0) encargada de la

translocación de protones (Figura 2-A). El complejo F_1F_0 tiene una masa molecular de aproximadamente 450 kDa (Stigall y col, 1978). La fracción soluble tiene cinco tipos de subunidades: la alfa ($3/F_1$, PM 50-60 kDa), la beta ($3/F_1$, PM 50-60), la gamma ($1/F_1$, 30-36 kDa), la delta ($1/F_1$, menos de 20 kDa) y la epsilon ($1/F_1$, menos de 20 kDa). La fracción membranal tiene tres tipos de proteínas: la subunidad a ($1/F_0$), la b ($1/F_0$) y la c ($10/F_0$). La subunidad c forma parte del canal de protones y contiene el aspártico o glutámico que reacciona con la dicitclohexilcarbodiimida (DCCD)⁴ (Foster y Fillingame, 1979; Friedl y Schairer, 1979).

Las F-ATPasas se inhiben con DCCD, oligomicina, venturicina, trietilestaño, cadmio, agentes mercuriales y dietilestaño (DES) (Mc Enery y Pedersen, 1986) (Tabla II).

II.2 Las V-ATPasas.

Las ATPasas de tipo V se encuentran en membranas de organelos diferentes a la mitocondria o el retículo endoplásmico (Anraku y col, 1989). Una de las funciones fisiológicas más importantes de estas ATPasas es la acidificación del lumen de la vacuola, lo que promueve la disociación del complejo ligando-receptor (Yamashiro y col, 1983; Bowman y col, 1989; Anraku y col, 1989; Sze, 1985; Rudnick, 1986).

Las ATPasas vacuolares se distinguen de las ATPasas P y F por su insensibilidad a la azida de sodio y al vanadato (Bowman y Bowman, 1986), y su inhibición por concentraciones nanomolares del antibiótico bafilomicina (Bowman y col, 1988a). Las ATPasas V también son inhibidas por el DCCD, tributilina, 4-cloro-7-nitrobenza-2-oxa-1,3diazol (NBDCl), dietil-estaño (DES), nitrato de potasio (KNO_3) y sulfocianuro de potasio (KSCN) (Rudnick, 1986). Al igual que las ATPasas tipo F, las ATPasas vacuolares no forman intermediarios fosforilados durante su ciclo de reacción y están compuestas de varias subunidades (Figura 2-B). Es posible que las funciones hidrolíticas y de translocación del protón residan en diferentes cadenas polipeptídicas (Bowman y col, 1992; Forgac, 1989). El peso molecular de las V-ATPasas ha sido estimado entre

400 y 700 kDa y están formadas por 8 a 10 subunidades (Porgac, 1986; Bowman y col, 1992; Sze y col, 1992). En *N. crassa* se han clonado tres genes que codifican para subunidades de la V-ATPasa: *vma1*, que codifica para una subunidad de 70 kDa (Bowman y col, 1988b), *vma2*, que codifica para una subunidad de 60 kDa (Bowman y col, 1988b) y *vma3*, que codifica para una subunidad de 16 kDa (Bowman y col, 1992).

II.3. Las P-ATPasas.

Las P-ATPasas son una familia de enzimas que transportan cationes a través de la membrana en un ciclo que incluye la fosforilación de la enzima. Están constituídas por un polipéptido de 70 a 100 kDa que hidroliza al ATP y transporta al catión. De todas las P-ATPasas, la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico es la única que ha sido cristalizada, gracias a que se encuentra en alta concentración en la membrana. Mediante microscopía electrónica y espectroscopía de difracción de rayos X (ángulo amplio), se detectó una región globular que sobresale del lado citoplásmico, conectada a través de un tallo a la membrana (Inesi y Asai, 1968; Dupont y col, 1973; Herbette y col 1985). Posteriormente, utilizando difracción electrónica de arreglos bidimensionales de moléculas de ATPasa se determinó que el dominio globular se extiende 65 Å por encima del plano de la membrana y tiene una forma de pera (65x40x50Å); este dominio está unido a la membrana por un tallo de 16Å de altura y 28Å de diámetro (Figura 2-C) (Stokes y Green, 1990).

Las P-ATPasas pueden funcionar como: i. monómeros, como la ATPasa de protones de *K. lactis* y de *S. cerevisiae*; ii. homodímeros, como la ATPasa de protones de *N. crassa*; o contener unidades adicionales, como la ATPasa de Na^+/K^+ que tiene a la subunidad beta de 55 kDa y la gamma de 11 kDa (Goffeau y Slayman, 1981; Scheiner-Bobis y Farley, 1994). Estas subunidades adicionales de la ATPasa de Na^+/K^+ parecen interactuar con el citoesqueleto y/o regular la actividad de la enzima (Scheiner-Bobis y Farley, 1994).

Las P-ATPasas provienen de fuentes tan variadas como la

membrana plasmática de mamíferos, incluyendo las ATPasas de Na^+/K^+ y de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico de mamíferos, que incluye otra ATPasa de Ca^{2+} ; de membrana plasmática de levaduras y plantas superiores, donde hay una ATPasa de protones y de fuentes especializadas como la membrana plasmática de las células de la mucosa gástrica, que tiene a la ATPasa de H^+/K^+ . La P-ATPasa más sencilla que se conoce es la ATPasa de K^+ de bacterias que pesa 75 kDa e interviene en la captación de potasio por la célula (Herruer y col 1984). Recientemente han sido descritas las ATPasas de Mg^{2+} y Cu^{2+} de *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus hirae* (Smith y col, 1993; Odermatt y col, 1993).

Las P-ATPasas presentan dos estados conformacionales (E1 y E2) durante su ciclo de reacción (Dupont, 1976) y forman un intermediario fosforilado con el fosfato gama del ATP (Nishigaki y col, 1974; Dame y Scarborough, 1981). El ortovanadato es un análogo del estado de transición del fosfato (Goffeau y Slayman, 1981); por lo tanto, el VO_4 sustituye al fosfato y se une a la enzima con gran afinidad por lo que ésta queda inhibida. En contraste, el vanadato no inhibe a las V-ATPasas o a las F-ATPasas (Tabla II). Cerca de 17 P-ATPasas han sido secuenciadas y al alinearse se observa un patrón estructural similar (Wach y col, 1992). Esto sugiere que estas enzimas comparten un mecanismo común, aún cuando transporten iones distintos. Además, la presencia de homología en la secuencia de todas ellas indica que surgieron de un ancestro común (Serrano, 1989).

III. La H^+ ATPasa de la membrana plasmática de hongos y levaduras.

La ATPasa de protones de la membrana plasmática (H^+ ATPasa) es una P-ATPasa que ha sido descrita en varios tipos de hongos: *Neurospora crassa* (Bowman y Slayman, 1977; Scarborough, 1977), *Schizosaccharomyces pombe* (Delhez y col, 1977), *Saccharomyces cerevisiae* (Peña y col, 1972; Ahlers y col, 1978; Peters y Borst-Pawels, 1979; Serrano, 1978), *Candida tropicalis* (Blasco y col, 1981), *Candida albicans* (Hubbard y col, 1986), *Dictyostelium*

discoideum (McDonald y Weeks 1984; Pogge- von Strandmann y col, 1984) y *Kluyveromyces lactis* (Hiranda y col, 1995). La membrana plasmática es rica en actividad de ATPasa (1-8 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$), y esta enzima constituye del 7 al 10% de la proteína total de la membrana e hidroliza el 25% del ATP producido por la mitocondria (Goffeau y Slayman, 1981; Nakamoto y col, 1989). La H⁺ATPasa expulsa activamente protones de la célula, y genera un gradiente de potencial electroquímico de protones que suministra la energía para la captación de iones inorgánicos, aminoácidos y azúcares disueltos en el medio externo (Goffeau y Slayman, 1981).

La H⁺ATPasa de la membrana plasmática es sensible a concentraciones micromolares de vanadato, pero no se afecta por azida u oligomicina, que son inhibidores de la F-ATPasa, o por nitrato, que inhibe a las V-ATPasas (Blasco y col, 1981; Bowman y col, 1978). Por otro lado, la inhibición por vanadato no es única para la H⁺ATPasa, pues también existen fosfatasas sensibles a vanadato capaces de hidrolizar al ATP (Bowman y Bowman, 1982).

Otras características importantes de la H⁺ATPasa, son su alta K_m para el sustrato (MgATP), un pH óptimo ácido (5-6.7), y una relativa insensibilidad a sales monovalentes. Los valores de K_m de las H⁺ATPasas oscilan entre 0.8-4.8 mM MgATP (Borst-Pawels y Peters, 1981; Hubbard y col, 1985; Bowman y Slayman, 1977). La concentración de ATP en el citoplasma de los hongos es de 3 mM (Chanson y col, 1984) por lo que la K_m elevada de la ATPasa permite su regulación por el ATP citosólico.

III.1. Fisiología de la H⁺ATPasa de la membrana plasmática de levaduras y hongos.

La principal función de la H⁺ATPasa es generar un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana plasmática. En *N. crassa* se determinó que se mantiene un potencial eléctrico de 200 mV negativo en el interior, y un gradiente de pH de cerca de 1.5 unidades (ácido en el exterior) (Slayman y col, 1973; Grandmann y col, 1978). El componente eléctrico y el de pH mantienen una relación inversa: a menor ΔpH , mayor potencial eléctrico y

viceversa. La fuerza protonmótrica total es cercana a 300 mV (Sanders y Slayman, 1982) y puede suministrar la energía para transportar activamente diversos nutrientes e iones (Sanders y Slayman, 1982).

El carácter electrogénico de la H'ATPasa se ha estudiado mediante la incorporación de la proteína a liposomas, ya sea por medio de diálisis o mediante congelamiento-descongelamiento (Dufour y col, 1982). Los cambios de pH se midieron con electrodos o por apagamiento de la fluorescencia del colorante 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA). Los resultados demostraron que la H'ATPasa reconstituída se comporta como una bomba de protones electrogénica (Scarborough y Addison, 1984). En ausencia de un potencial eléctrico (eliminado por la adición de aniones permeantes), el interior de las vesículas reconstituídas se acidifica y se genera un ΔpH de 3.5 unidades (Dufour y Tsong, 1981). En proteoliposomas enriquecidos con H'ATPasa y usando anaranjado de acridina y oxonol V para medir la generación de ΔpH y $\Delta\psi$ durante la hidrólisis del MgATP, se encontró que el ΔpH es máximo en presencia de aniones permeantes (SCN^- , NO_3^- , Cl^- , SO_4^- , MES), mientras que el $\Delta\psi$ es máximo en ausencia de tales iones; esto está de acuerdo con estudios electrofisiológicos realizados *in vivo* (Perlin y col, 1984).

III.2. Regulación de la H'ATPasa de la membrana plasmática.

La producción y la actividad de la H'ATPasa son reguladas durante el ciclo celular. En levaduras, conforme la célula se acerca al final de la fase exponencial de la curva de crecimiento, la actividad y la concentración de la H'ATPasa disminuyen. Después, en la fase estacionaria, la actividad de la H'ATPasa regresa a su nivel original (Goffeau y Slayman, 1981).

Se conocen dos factores que activan a la H'ATPasa de levadura: la glucosa y la acidez del medio (Serrano, 1983; Eraso y Gancedo, 1987); en contraste, el etanol no tiene efectos (Serrano, 1983; Schyrova y Kotyk, 1985). En levaduras ayunadas la glucosa activa rápidamente a la H'ATPasa, y el efecto se elimina al quitar la glucosa del medio. Esta activación se evita con yodoacetato

(Serrano, 1983). La activación probablemente ocurre por la interacción de algún componente generado por la glucosa con el extremo carboxilo terminal de la ATPasa (Eraso y Portillo, 1994); ésto ha sido apoyado porque cuando ocurre una mutación en el extremo carboxilo terminal de la ATPasa (S911A/T912A), las células pierden la habilidad de crecer en glucosa y la ATPasa ya no se activa por este monosacárido (Eraso y Portillo, 1994).

Por otro lado, la presencia de glucosa en el medio incrementa considerablemente la síntesis de la HATPasa, aún cuando las características cinéticas de la enzima no cambian (Rao y col, 1993) (Figura 3). Estos experimentos muestran que la glucosa regula la transcripción del gene PMA1. Adicionalmente, la expresión del gene PMA1 depende del estado metabólico de la célula, ya que la cantidad de ATPasa es proporcional a la velocidad de crecimiento en diferentes fuentes de carbono (Sychrova y Kotyk, 1985).

Se ha descrito que las secuencias $UAS1_{PMA1}$ y $UAS2_{PMA1}$ se requieren para la expresión de PMA1 (Capieaux y col, 1989). Estas dos regiones son homólogas a UAS_{rpg} , una secuencia consenso que controla la expresión coordinada de los genes de proteínas ribosomales. La transcripción de estos genes parece regularse a través de la glucosa por un factor llamado TUF/RAP1/GRF1. En el caso de la ATPasa, este factor de transcripción, probablemente se une fuertemente a $UAS1$ y $UAS2$ del PMA1 (Herruer y col, 1987; Capieaux y col, 1989; Diffley, 1992) controlando el crecimiento (traducción y transcripción), la glicólisis y la diferenciación celular.

Probablemente, la glucosa genera señales que afectan la transcripción de varios genes que a su vez regulan la expresión de la ATPasa. Uno de estos genes es el APA1, cuya remoción ocasiona un defecto en la modulación que la glucosa ejerce sobre la expresión de PMA1, pero no tiene efectos notables sobre la expresión de genes regulados por TUF (García-Arranz y col, 1994)

III.3. Estequiometría de la bomba de protones.

La relación cinética entre la velocidad de transporte de H^+ y

la concentración de sustrato se ha medido *in vivo* en *N. crassa*. La corriente de H⁺ se midió a diferentes valores de pH interno, los cuales se obtuvieron al medir la distribución de un ácido débil, el ácido butírico (Blatt y Slayman, 1983). La corriente de la bomba aumenta con la concentración de protones en el citoplasma, con una cinética de primer orden (Sanders y Slayman, 1982; Slayman y Zuckier, 1989). Al trabajar con vesículas de *N. crassa* se observó que la estequiometría del protón translocado por ATP hidrolizado es de 0.96 (Perlin y col, 1984). Valores similares fueron obtenidos con vesículas provenientes de levaduras (Malpartida y Serrano, 1981).

En la H⁺ATPasa de levadura, se observó que el sitio de unión para los protones no acepta deuteriones. Por otro lado, la capacidad hidrolítica de la enzima se ve poco afectada, ya que la velocidad de liberación del Pi es similar en presencia de H₂O o de D₂O (Kotyk y col, 1990). Estos resultados indican que la hidrólisis del ATP y el transporte del protón se pueden desacoplar.

III.4. Ciclo de reacción.

Como todas las P-ATPasas, las H⁺ATPasas alternan entre dos estados conformacionales durante su ciclo catalítico y forman un intermediario fosforilado (Figura 4). Para comprender el mecanismo de acción de estas enzimas se requiere dilucidar el mecanismo por medio del cual se acoplan la hidrólisis del ATP y la translocación del ion. A continuación se describen los pasos mas importantes del ciclo catalítico.

III.4.i. Primer paso: unión ATP/enzima.

Inicialmente se unen el protón, el Mg y el ATP al sitio activo de la ATPasa, cuando ésta se encuentra en la forma E₁. El análisis cinético ha revelado dos tipos de comportamiento: en *K. lactis*, *S. pombe* y *S. cerevisiae*, la velocidad de formación del producto (Pi) y la concentración de MgADP es una función hiperbólica que no muestra cooperatividad. En contraste, en *N. crassa* la velocidad de hidrólisis es una función sigmoide de la concentración de Mg-ATP,

con una $K_{0.5}$ de 1 mM y un coeficiente de Hill cercano a 2 (Bowman y col, 1981). Por esto, se ha considerado que esta enzima presenta un estado tenso (T) y un estado relajado (R), este último con mayor afinidad para el sustrato. La cooperatividad en estas ATPasas ha sido interpretada de la siguiente manera:

a) La enzima posee dos o más sitios catalíticos que interactúan cooperativamente (Bowman, 1983b).

b) La enzima puede existir en múltiples estados conformacionales que catalizan la hidrólisis del Mg-ATP por vías paralelas (Kholand y Hammes, 1986).

c) La enzima presenta varios estados conformacionales con diferentes afinidades para el ATP-Mg durante el ciclo catalítico (Teruel y col, 1987).

d) La unión del Mg^{2+} (como parte del sustrato), a la enzima monomérica ocurre sobre dos sitios de fijación con diferente afinidad, lo que produce cambios en las propiedades de la enzima. Cuando el magnesio se une al sitio de alta afinidad ($K_d=1-20 \mu M$), la ATPasa se activa, y se inhibe cuando el magnesio ocupa el sitio de baja afinidad ($K_d=0.4-3.5 mM$) (Ahlers y col, 1978; Amory y col, 1982; Hubbard y col, 1985; Kholand y Hammes, 1986; Guerra y col, 1995). Esto puede resultar en valores del coeficiente de Hill por encima de 1.6 (Brooker y Slayman, 1983b) que son interpretados como cooperatividad.

La interacción de la H'ATPasa de *N crassa* con vanadato apoya el primer modelo. En una estructura dimérica, la estabilización de la forma relajada por un inhibidor debe estimular la actividad a bajas concentraciones e inhibirla a altas concentraciones, con una disminución en el coeficiente de Hill (Cantor y Schimmel 1980). Esto mismo sucede cuando la H'ATPasa se inhibe con vanadato, disminuyendo el coeficiente de Hill a 1.04 (Bowman, 1983a). Adicionalmente, los estudios de inactivación de la H'ATPasa por radiaciones de alta energía apoyan la idea de un modelo oligomérico para la enzima. El peso molecular encontrado en este estudio fue de 230 kDa (Bowman y col, 1985) lo que sugiere que la H'ATPasa se encuentra asociada en dímeros en la membrana plasmática. En

contraposición a estos resultados, se ha demostrado que el monómero de H'ATPasa cataliza el transporte de H⁺ en proteoliposomas (Goormahtigh y col, 1986). Es probable que haya enzimas, como la H'ATPasa de *N. crassa* que forman dímeros y muestran cooperatividad en su actividad (Bowman y col, 1983a; Brooker y Slayman, 1983b) y por otro lado, otras H'ATPasas, como la de *Kluyveromyces lactis* y la de *Saccharomyces cerevisiae*, que son monoméricas, lo cual se refleja en su cinética hiperbólica de actividad (Guerra y cols, 1995).

Con respecto al número de sitios para el MgATP en la enzima, se ha encontrado un solo sitio utilizando análogos del Mg-ATP como lo es el Terbio-Formicíntrifosfato (Tb-FTP) o compuestos de fotoafinidad como el 2-azido ATP (Ronjat y col, 1987; Davies y col, 1990). El Tb-FTP se une a la enzima con gran afinidad con una K_d= 1 μM (Ronjat y col, 1987). Un inconveniente es la insolubilidad de estos reactivos a concentraciones milimolares, lo que dificulta la determinación de un probable sitio de baja afinidad.

III.4.ii. Segundo paso: fosforilación de la H'ATPasa.

Una vez que la enzima tiene al H⁺ y al Mg-ATP en sus sitios de fijación, ésta se fosforila en un residuo de aspártico (D378) y libera al ADP. Con ³²P se ha detectado un β-aspartil fosfato esencial para la función (Dame y Scarborough, 1981; Amory y col, 1980; Foury y col, 1981): cuando el aspartato que se fosforila se sustituye por treonina en la H'-ATPasa de levadura o en la Ca²⁺ ATPasa de retículo sarcoplásmico, se inactiva el transporte del ion (Portillo y Serrano, 1988; Murayama y Mc Lennan, 1988).

III.4.iii. Tercer paso: transición de E₁ a E₂.

En ausencia de ATP, la H'ATPasa se encuentra en la forma E₁, mientras que la proporción de la conformación E₂ aumenta durante la hidrólisis del ATP (Amory y col, 1982). El cambio entre la forma E₁ y la E₂ se detecta por la diferente sensibilidad a proteasas. En la conformación E₁, la tripsina corta cerca del extremo N-terminal (lis-24, lis-36, y arg-73) produciendo un péptido de

91,000 Da (Addison y Scarborough, 1986; Brooker y Slayman, 1983a; Mandala y Slayman, 1988). En la conformación E_1 (con vanadato y Mg^{2+}), el extremo amino terminal se hace menos accesible a la tripsina, mientras que el extremo C-terminal se expone, revelando un nuevo sitio de rompimiento en la R900; además, en estas condiciones se observa mayor afinidad a anticuerpos específicos para el extremo C-terminal (Mandala y Slayman, 1988).

III.4.iv. Cuarto paso: liberación del protón.

El protón que se une a la forma E_1 en la superficie interna de la membrana (H^+E_1-P), es liberado por la forma E_2 (H^+E_2-P) hacia el exterior. Estudios sobre el gradiente de pH, a través de la membrana plasmática de *N. crassa*, muestran diferentes valores de pKa para el protón en ambas superficies (Sanders y col, 1981). Los valores obtenidos fueron un pKa= 5.44 en el lado intracelular (pH=7.2), y un pKa= 2.9 en el lado extracelular (pH=5.0). De estos datos se concluye que, en condiciones de reposo, el sitio de unión se encuentra libre de protones en ambas superficies, y se protona sólo al presentarse un cambio de pH en el lado citoplásmico (Sanders y col, 1981).

La transferencia de carga a través de la membrana es dependiente de voltaje y se asocia con la transición E_1-P a E_2-P (Slayman y Zuckier, 1989). La fosforilación de la enzima en el sitio activo la convierte en la forma energizada que le permite adoptar una conformación diferente para el transporte del protón. En *N. crassa* esto ocurre a una velocidad de recambio de 3,000 a 30,000 seg^{-1} (Slayman y Zuckier, 1989) y para *S. pombe* de 9,200 seg^{-1} (Amory y col, 1982). Estas velocidades son mas grandes que las encontradas para las ATPasas de mamíferos (la Na^+/K^+ -ATPasa y la Ca^{2+} -ATPasa) cuyos valores se encuentran por debajo de 300 seg^{-1} (Chapman y col, 1983). Estos valores posiblemente indiquen que, dependiendo de cada especie, hay diferencias en el mecanismo de transporte del ion o protón.

III.4.v. Quinto paso catalítico: hidrólisis de la unión E_2-P .

El último paso del ciclo catalítico de la H'ATPasa consiste en la defosforilación de la enzima, mediante la hidrólisis del enlace entre el aspartato y el fosfato, y retorno a la forma E_i para poder iniciar un nuevo ciclo. La conformación E_i ha sido estudiada con vanadato, que es un análogo del estado de transición del fosfato, que mantiene a la enzima "congelada" en la forma E_iVO₃.

IV. Purificación y estructura de la H'ATPasa.

La H'ATPasa de la membrana plasmática ha sido purificada de *N crassa*, *S cerevisiae* y *S pombe* (Bowman y col, 1981; Malpartida y Serrano 1981; Kholand y Hammes, 1986; Dufour y Goffeau, 1978). Los métodos de purificación involucran la solubilización de las membranas plasmáticas por detergentes (lisolectina o desoxicolato de sodio) y purificación de la ATPasa por centrifugación en gradiente de sacarosa o glicerol. Las preparaciones más activas tienen actividades específicas entre 23 y 35 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ (Smith y Scarborough, 1984; Dufour y Goffeau, 1978). En casos aislados, la actividad reportada ha sido hasta de 98 $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$ (Bowman y col, 1981).

IV.1 Estructura primaria de la H'ATPasa.

La H'ATPasa purificada está compuesta de una sola cadena polipeptídica con un peso molecular promedio de 100,000 Da (Addison y Scarborough, 1981; Bowman y col, 1981; Dufour y Goffeau, 1978; Malpartida y Serrano, 1981). No hay evidencias de que la enzima contenga carbohidratos o polipéptidos de bajo peso molecular asociados (Vai y Popolo, 1986), como ocurre en el caso de las ATPasas de Na⁺/K⁺ (Scarborough y Addison, 1984; Serrano y col, 1991).

La estructura primaria de las H'ATPasas de diferentes hongos ha sido obtenida por técnicas de biología molecular (Serrano y col, 1986; Hager y col, 1986; Wach y col, 1992). Los anticuerpos policlonales dirigidos contra la H'ATPasa de *N crassa* o de *S cerevisiae* muestran una fuerte reacción cruzada con la enzima de *S pombe* (Vai y Popolo, 1986). Cuando los anticuerpos contra las

HATPasas de los hongos se hacen reaccionar con las HATPasas de plantas, generalmente se observa una reacción débil (Sussman, 1984; Surowry y Sussman, 1986).

IV.2. Modelo topológico de la HATPasa.

La HATPasa de hongos y levaduras posee una porción hidrofóbica insertada en la membrana plasmática, y una gran porción hidrofílica citoplásmica (Nakamoto y Slayman, 1989). En *N crassa* y *S cerevisiae*, el polipéptido atravieza la membrana plasmática ocho o diez veces, con pocos residuos expuestos en la superficie externa (Figura 5). Las secuencias de los segmentos que atraviezan la membrana de diez organismos distintos han sido alineadas y comparadas entre sí (Nakamoto y col, 1989). El segmento I transmembranal contiene el glutamato-129, al que se le ha adjudicado un papel funcional en la ruta por donde pasa el protón a través de la membrana (Tabla III). Sin embargo, la participación del glutámico se encuentra en duda debido a que su reemplazo a glicina por mutación dirigida (Inciso V.3), no modifica la actividad (Serrano y col, 1991; Rao y Slayman, 1992).

La mayor parte de la cadena polipeptídica se encuentra en el citosol, y contiene varios fragmentos importantes: el extremo amino terminal (formado por 115 residuos) y dos asas, una de 130 aminoácidos y otra de 300 residuos (Ghislain y col, 1987). El asa de 300 resíduos contiene el sitio de fosforilación, por lo que se piensa que está involucrada en la unión e hidrólisis del ATP (Tabla IV). Este segmento corresponde a la región mas conservada entre las P-ATPasas.

La posición de los extremos amino y carboxilo terminal han sido definidas (Nakamoto y col, 1989; Rao y col, 1991). Tanto en *N crassa* como en *S cerevisiae* los extremos amino y carboxilo terminal se encuentran en el lado citoplásmico de la membrana (Mandala y Slayman, 1988; Hennessey y Scarborough, 1990).

IV.3. Aspectos Genéticos de la HATPasa.

Ulaszewski y col (1983) aislaron una mutante alélica de *S.*

cerevisiae que presentaba resistencia al fungicida Dio-9 y mostraba cambios cualitativos en la actividad de la H'ATPasa. Al gene se le denominó *pma1* y se encontró en *N. crassa*, *S. pombe* y *S. cerevisiae*. Se ha comprobado que el gene *pma1* es esencial para la célula (Serrano y col, 1986). Adicionalmente, se ha descrito el gene *pma2* en *S. cerevisiae* y se ha propuesto que también codifica para una ATPasa de membrana con 947 residuos. En condiciones fisiológicas, no se han encontrado productos de expresión de este gene (Goffeau y col, 1991), sin embargo, cuando se elimina *pma1* se expresa *pma2* (Supply y col, 1993a). La ATPasa codificada por *pma2* apoya las funciones celulares al igual que la ATPasa del *pma1* (Supply y col, 1993b). El gene *pma1* de *S. cerevisiae* mapea en el cromosoma VII, muy cerca de *leu1* (Ulaszewski y col, 1987b), el *pma1* de *S. pombe* mapea en el cromosoma I (Ulaszewski, 1986) y el de *N. crassa* en el brazo izquierdo del cromosoma I (Hager y col, 1986).

El gene *pma1* ha sido clonado mediante inmunoselección de una genoteca de expresión (Serrano y col, 1986; Hager y col, 1986; Addison, 1986). El gene *pma1* de *S. pombe* fue aislado por hibridización con el gene de *S. cerevisiae* (Ghislain y col, 1987). El gene de *N. crassa* contiene cuatro intrones, mientras que el de *S. cerevisiae* no contiene ninguno. Este gene presenta un alto grado de similitud en ambas especies (74%). En *N. crassa*, *S. cerevisiae* y *S. pombe*, *pma1* codifica para proteínas con 920, 918 y 919 residuos de aminoácidos respectivamente. La H'ATPasa de *N. crassa* (920 aa) tiene un peso molecular de 99,886 Da, lo que concuerda con el peso molecular estimado por electroforesis en gel de poliacrilamida (100,000 Da) (Goffeau y Slayman, 1981).

En *N. crassa*, la H'ATPasa se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso y las modificaciones postranscripcionales son mínimas: ruptura de la metionina del amino terminal y acetilación de la segunda alanina (Aaronson y col, 1988). Esto implica que no se requiere de una secuencia líder, sino de señales internas en la secuencia, para su incorporación a la membrana. Inyectando RNAm truncado a ovocitos de *Xenopus levi* se ha determinado que las primeras asas que cruzan la membrana podrían funcionar como señales

internas para la inserción (Honey y col, 1988).

V. Estudios de la relación estructura-función de la H'ATPasa de hongos y levaduras.

Para explicar el mecanismo de acción de la H'ATPasa, se requiere conocer la localización y la composición del sitio de unión para el ATP, el camino que sigue el protón para cruzar la membrana y el mecanismo de acoplamiento entre ambos procesos. Para definir la relación espacial entre diferentes aminoácidos funcionalmente esenciales mediante difracción de rayos x, se requiere de cristales puros de la enzima. Esto ha sido posible con diversas proteínas solubles, pero solamente unas cuantas enzimas de membrana han sido cristalizadas: la porina de la membrana externa de *E coli* (Garavito y Rosenbusch, 1986), la bacteriorodopsina (Henderson y col, 1990), el complejo de proteínas del centro de reacción de *Rhodospseudomona viridis* (Deisenhofer y col 1984) y recientemente, la ATPasa mitocondrial (Abrahams y cols, 1994).

La modificación química específica de diversos aminoácidos se ha utilizado para analizar el mecanismo de catálisis en la ATPasa de protones de los hongos (Tabla V). Estos estudios han sido complementados con estudios de mutagénesis dirigida, cambiando aminoácidos considerados como importantes para la función de la enzima y analizando las modificaciones en diversas actividades. Aún cuando estos estudios no dan una idea exacta de la estructura tridimensional de la proteína, sí indican qué aminoácidos participan en una misma función y por lo tanto interactúan entre sí en la enzima nativa.

A continuación se analiza la información sobre los aminoácidos identificados como importantes para la actividad de las H'ATPasas de los hongos. Los hemos agrupado de acuerdo a su función en la enzima, como por ejemplo: la fosforilación de la enzima, la unión con el ATP o la activación por glucosa. Se discute la posibilidad de que existan dominios especializados en cada uno de los pasos catalíticos o en otras funciones como el control de la actividad.

V.1. Sitio de fosforilación y defosforilación.

Como parte de su ciclo de reacción, la ATPasa debe fosforilarse y defosforilarse. Una herramienta útil para el estudio de la fosforilación es el vanadato, que puede unirse al sitio de fosforilación establemente, inhibiendo a la enzima.

Se ha observado que la sensibilidad de la enzima al vanadato disminuye cuando se producen las siguientes mutaciones (Figura 6): T231G (Portillo y Serrano, 1989), K250T (Goffeau y deMeis, 1990), G268D (Ulaszewski y col, 1986; 1987a; Ghislain y col, 1987; Goffeau y de Meis, 1990), S368F (Perlin y col, 1989), A608T (Ulaszewsky y col, 1983), P640L (Mc Cusker y col, 1987) y parcialmente C376L (Portillo y Serrano, 1989). Todos estos aminoácidos se encuentran en las asas citoplásmicas mII-mIII y mIV-mV. Por otro lado, en el asa mIV-mV las mutaciones D378E/N, K379Q confieren hipersensibilidad al vanadato. D378 es el residuo que se une covalentemente al fosfato en la enzima nativa (Portillo y Serrano, 1989).

En el ciclo enzimático se forma un intermediario E_2P al hidrolizarse el ATP. Las mutaciones que inhiben la formación de este intermediario son: D226N, D634N y D730N, éste último de localización intramembranal (mVI). Puesto que todos estos aminoácidos son acídicos, se ha propuesto que forman un microambiente ácido que favorece la hidrólisis del ATP y por lo tanto deben estar muy próximos entre sí (Serrano y Portillo, 1990). Por otro lado, E233Q resulta en un aumento de la formación del intermediario fosforilado de la enzima.

En resumen, el sitio de unión del fosfato a la enzima se encuentra en las dos primeras asas citoplásmicas mII-mIII y mIV-mV. Las mutaciones que modifican la afinidad por el anión sugieren que hay una geometría específica que vale la pena explorar y que debe albergar la estructura del vanadato o del fosfato en estado de transición (Bowman y Slayman, 1979).

Por otro lado, las reacciones de fosforilación y defosforilación de la enzima requieren de aminoácidos cargados, principalmente negativamente, que están distribuidos en estas dos

asas y probablemente muy próximos en el espacio para proveer el ambiente necesario para la hidrólisis.

V.2. Sitio de fijación para el ATP.

Hay diferentes modificaciones de la H⁺ATPasa que llevan a cambios en la interacción con el ADP o el ATP (Portillo y Serrano, 1989) (Figura 7): La interacción con el fosfato gamma del ATP se modifica cuando se mutan D378 (Portillo y Serrano, 1988), K474 y D634 (Portillo y Serrano, 1989). Los residuos importantes para la interacción de la adenina con la enzima son D534, D560, D638 (Portillo y Serrano, 1988), A547 (Cid y Serrano, 1988) y A608 (Ulaszewsky y col 1983; van Dyck y col, 1990). La mutación A608T aumenta la Km para el ATP y confiere resistencia al vanadato (ver inciso V.1). Por último, D534Q, D560N y D638N modifican la especificidad de la ATPasa para los nucleótidos y son letales para la célula (Portillo y Serrano, 1988).

El sitio de unión al nucleótido también ha sido estudiado evaluando la protección ejercida por el ATP y el ADP contra la modificación de aminoácidos por reactivos específicos. Por ejemplo, la NEM, que reacciona con cisteínas (Tabla V), inhibe a la H⁺ATPasa de *N. crassa* (Brooker y Slayman, 1982), pero el MgATP (sustrato) o el MgADP (inhibidor competitivo) protegen a la enzima contra la NEM. La protección por sustrato indica que al menos una cisteína de la H⁺ATPasa se encuentra en o cerca del sitio activo de la enzima. Con ¹⁴C-NEM se determinó que hay dos cisteínas marcadas (C545 y C532) (Brooker y Slayman, 1983a). C545 reacciona rápidamente con NEM sin pérdida de la actividad y no se protege por MgADP. C532 reacciona mas lentamente con NEM, lo que resulta en inhibición de la ATPasa y su modificación puede ser evitada por la presencia de MgADP: por lo tanto, se sugirió que C532 está en o cerca del sitio activo y C545 no. Otro dato interesante, es que la reacción de estas cisteínas con un reactivo menos voluminoso, el metilmetano tiosulfonato (MMTS), no inactiva a la ATPasa, lo que indica que estas cisteínas no son esenciales para la actividad, y que la inactivación por NEM debe resultar de un impedimento estérico en el

sitio activo (Davenport y Slayman, 1988; Pardo y Slayman, 1989).

En la H'ATPasa de *K lactis* hay tres Cys reactivas a la ¹⁴C-NEM; una más que en *N crassa*. En *K lactis*, a diferencia de la H'ATPasa de *N crassa*, la protección por MgADP es parcial (Guerra y col, 1995), lo que sugiere que el MgADP no protege a una de las Cys importantes para la función. (Guerra y col, 1995; Davenport y Slayman, 1988; Pardo y Slayman, 1989). Esta conclusión es apoyada por la secuencia de aminoácidos de la enzima de *K lactis* (Miranda y col, 1995) en que se detecta un contenido y una distribución de las cisteínas diferente a la de *N crassa*.

La mutación K474G/R/H resulta en una enzima con actividad específica muy baja (Portillo y Serrano, 1989) (ver este inciso V.2, primer párrafo). La importancia de este aminoácido se corroboró al observar que el isotiocianato de fluoresceína (FITC, Tabla V) reaccionó con K474 produciendo una inactivación irreversible de la enzima (Pardo y Slayman, 1988). El MgADP protege parcialmente contra la inhibición por FITC, lo cual sugiere que la enzima tiene dos sitios de fijación para el FITC que resultan en inhibición; uno que se protege con MgADP (K474) y otro (no determinado) cuya reactividad no se altera en presencia del nucleótido (Pardo y Slayman, 1988; Bowman y col, 1978).

El fenilgloxal y la 2-butanodiona, que reaccionan con argininas, inactivan a la H'ATPasa de *N crassa* en una reacción que se inhibe con MgADP (Kasher, 1986). Se ha sugerido que la(s) arginina(s) se hace(n) inaccesible(s) por un cambio conformacional de la enzima inducido por el MgADP o que se encuentra(n) en el sitio de fijación del MgADP. Aún no se ha determinado cual es la arginina reactiva, pero pueden ser dos, ya que la estequiometría de la reacción indica que son necesarios dos moles de fenilgloxal por cada H'ATPasa para producir 100% de inactivación (Kasher y col, 1986).

El dietilpirocarbonato (DEP) (Tabla V) reacciona con residuos de histidina a pH neutro o ligeramente ácido, inhibiendo a la H'ATPasa (Morjana y Scarborough, 1989). Hay una estequiometría de ocho histidinas modificadas por molécula de enzima, pero sólo una

de ellas es esencial para la actividad de la H⁺ATPasa. Adicionalmente, el ADP protege a la enzima en contra de la inhibición por DEP lo que significa que el residuo modificado puede estar dentro o cerca del sitio de unión del nucleótido (Morjana y Scarborough, 1989).

Los experimentos anteriores indican que la interacción de la ATPasa con los nucleótidos de adenosina (ATP o ADP) se lleva a cabo en la segunda asa citoplásmica (mIV-mV) (Serrano, 1988; Rao y col, 1989). La reactividad a compuestos apolares como la NEM sugiere que este sitio tiene dominios hidrofóbicos importantes (Pardo y Slayman, 1989; Guerra y cols, 1995). Además, el sitio de unión con el nucleótido debe interactuar con el sitio de fosforilación, al menos durante parte del ciclo catalítico (durante la transferencia del fosfato del ATP al D378) por lo que, al menos temporalmente, ambos sitios deben estar muy próximos entre sí.

V.3. Segmentos transmembranales.

La H⁺ATPasa cataliza el movimiento vectorial de protones del citoplasma al exterior de la célula. El paso del protón a través de la membrana hidrofóbica debe llevarse a cabo en el seno de los segmentos transmembranales de la enzima (Nakamoto y col 1989). De especial interés son los aminoácidos polares que se encuentran en la zona hidrofóbica de la membrana, ya que éstos podrían participar en la formación de un canal de protones a través de la membrana (Figura 8).

Las mutaciones de los carboxilos embebidos en la membrana tienen diferentes efectos: D730N (mVI) es letal, e inhibe la desfosforilación de la enzima (Portillo y Serrano, 1989). D833A (mIX) también es letal (Portillo y col, 1989). Otras mutaciones resultan en una enzima normal, éstas son: D143N (mII) (Portillo y Serrano, 1989), E703Q (mV) y E803Q (mVIII) (Portillo y col, 1989).

El glutámico 129 (mI) se encuentra conservado tanto en las H⁺ATPasas de los hongos como en P-ATPasas de plantas superiores (*A thaliana*) y de protozoarios (*L donovani*) que están encargadas de transportar protones (Wach y col, 1992). El estudio de este

aminoácido ha dado resultados conflictivos: la modificación con DCCD inactiva por completo a la ATPasa de protones de *N. crassa* (Sussman y Slayman, 1983; Cid y col, 1987b); sin embargo, la mutación E129Q/A no afecta a la enzimas. Esto ha llevado a proponer que el aminoácido no es importante para la función y que la inhibición por DCCD se debe a impedimento estérico.

El EEDQ (Tabla V) reacciona con carboxilos inhibiendo a la H⁺ATPasa de manera irreversible y dependiente de pH (Addison y Scarborough, 1986). En presencia de vanadato, la inhibición por EEDQ es sensible a Mg-ATP, pero no a MgADP, por lo que se ha sugerido que el carboxilo reactivo se oculta cuando la enzima se encuentra en la conformación E₂. El pKa de este carboxilo es anormalmente alto, con un valor cercano a 7, lo que indica que posiblemente se encuentre en un ambiente hidrofóbico (Addison y Scarborough, 1986).

Otros aminoácidos de la H⁺ATPasa asociados con la membrana, cuya mutación ha dado lugar a un fenotipo son: G158D (mIII), que resulta en desacoplamiento entre la ATPasa y el bombeo de protones (Perlin y col, 1989) y P355A, que produce una disminución de la actividad de la ATPasa y que es letal para la célula (Portillo y Serrano, 1988). Otras mutaciones letales que aún no han sido totalmente caracterizadas son: A813S (mVIII), G814S (mVIII), P815A (mVIII), I834S (mIX) e I835S (mIX) (Portillo y col, 1989).

El asa que conecta mI y mII se encuentra en el lado externo de la membrana plasmática y está formada por los aminoácidos 135 a 144. Las mutaciones en esta asa (por ejemplo, L138Y/A, D143A y F144A, o la adición de una S entre L138 y S139) resultan en cambios en las propiedades de la enzima que incluyen disminución de la actividad e inhibición del paso del protón a través de la membrana. Se ha propuesto que la alta sensibilidad a mutaciones de esta región se debe a que hay requerimientos de rigidez importantes para mantener la conformación de los segmentos mI y mII en la ATPasa (Seto-Young y col, 1994). Otro dato interesante con respecto al asa mI-mII es que las mutaciones en esta zona tienen efectos a distancia sobre los dominios involucrados en la hidrólisis del ATP

(Monk y col., 1994).

Las mutaciones de la H ATPasa: S368F (asa citoplásmica mIV-mV), A135V (mI) y G158D (mII), dan lugar a resistencia a higromicina B e inhabilidad para crecer a bajo pH. Estos defectos de la ATPasa son corregidos, total o parcialmente, por mutaciones secundarias que cambian diferentes aminoácidos distribuidos a través de la misma ATPasa. Estas revertantes intragénicas han dado información sobre la interacción entre áreas de la proteína lejanas en la secuencia primaria. Las mutaciones secundarias que llevaron a recuperación de la función fueron: a) para A135V: V157F (mII) y L327V (mIV); b) para G158D: F830S (mVII) y parcialmente V127A (mI); c) las revertantes de S368F están localizadas en mI: A135S, I133F, mII: I147M, C148S, mIII: L298F y mVII: A828S y S836C, sugiriendo que hay interacciones entre el dominio de hidrólisis de ATP y el canal de protones. En resumen, hay mutaciones secundarias en diferentes segmentos de la membrana y dominios del citoplasma que revierten los efectos de mutaciones primarias en otros dominios de la enzima. Es lógico asumir que los aminoácidos mutados secundariamente a una mutación primaria deben estar cercanos al sitio de la primera mutación. Con esto se ha propuesto un modelo que predice las interacciones de los segmentos transmembranales entre sí y con el resto de la enzima (Figura 9) (Perlin y cols, 1992).

En este modelo se observa que mI se encuentra rodeado por los otros segmentos, fuertemente unido al mII debido al corto segmento que los une, y con mVIII, que probablemente está unido a mII por un puente disulfuro (Yan y Maloney, 1995). Con este modelo, se puede proponer un mecanismo de acoplamiento entre: i) la hidrólisis del ATP, ii) la fosforilación reversible de D378 y iii) el transporte del H⁺. Este mecanismo sugiere que, durante la fosforilación (figura 9, conformación II) y defosforilación (Figura 9, conformación I), la profundidad de la inserción en la membrana de mI, mII y mVIII se modifica debido al cambio en la estructura tridimensional del primer dominio citoplásmico (no mostrado en la figura) moviendo los residuos que probablemente estén involucrados

con el paso del protón.

El deslizamiento de las asas transmembranales para transportar solutos ha sido propuesto para UhpT, que es un antiportador de Glucosa-6-Pi (ext) por fosfato (int), ubicado en la membrana de *Escherichia coli*. UhpT tiene doce segmentos transmembranales. El segmento mVII fue mutado para que contuviese un solo residuo de cisteína en todas las posiciones posibles. De cada mutante se tomaron células intactas o vesículas de polaridad invertida y se adicionó un reactivo impermeante para Cis. Se observó que la accesibilidad de los residuos ubicados en el centro del segmento mVII de UhpT cambiaba dependiendo de la presencia del sustrato glucosa-6-fosfato (Yan y Maloney, 1995). De estos resultados se propuso que el segmento mVII de UhpT sufre cambios grandes en su posición en la membrana y al catalizar el transporte de glucosa-6-P. En la figura 9 se usan estos datos para ilustrar un posible mecanismo para la translocación de H⁺ en la H⁺ATPasa de los hongos, tomando en cuenta el patrón de interacciones entre segmentos transmembranales descrito por Perlin y cols (1992).

V.4. Segmentos amino y carboxilo terminal.

Ambos extremos de la proteína son hidrofílicos y ambos se encuentran del lado del citoplasma. En el extremo amino terminal de la proteína se han llevado a cabo diversas mutaciones (Figura 10): se ha observado que se pueden eliminar los primeros 27 aminoácidos y la actividad aún es normal. En contraste, la eliminación de los primeros 61 aminoácidos es letal (Portillo y Serrano, 1989). Dos mutaciones, D91T y E92K, generaron una actividad sensible a temperatura (Cid y col, 1987a). Se requerirán mayores estudios para poder dilucidar cual es la función de este segmento.

El carboxilo terminal (Figura 10) es un dominio inhibitorio que interactúa con el sitio de unión para el ATP y está involucrado en la modulación de la actividad de la ATPasa por glucosa. Se han identificado al menos dos regiones diferentes que participan en esta regulación: la primera región se encuentra en la zona de los aminoácidos S899 y E901; las mutaciones en esta zona

eliminan el control de la glucosa sobre la K_m . La segunda región se ha ubicado alrededor de R909 y T912, cuyas mutaciones eliminan los efectos de la glucosa sobre la V_{max} . Aún es necesario delimitar adecuadamente estos sitios, pues algunas mutaciones tienen efectos mixtos (Eraso y Portillo, 1994). Las mutaciones estudiadas en el carboxilo terminal son: S899D/A, E901A/Q, D902S, F903R, M904A, T912A/D A905stop (18 aminoácidos) y Q908stop (11 aminoácidos) (Figura 10) (Portillo y cols, 1989).

VI. Sistemas de expresión de la H'ATPasa modificada por mutagénesis dirigida.

Ha sido difícil lograr un buen sistema de expresión para la H'ATPasa mutante debido a su carácter esencial (Serrano y col, 1986). Por ello se han desarrollado otros sistemas para obtener ATPasa modificada y poder estudiarla una vez aislada. Portillo y Serrano (1988) diseñaron una estrategia en que la expresión del gene silvestre de la H'ATPasa de *S cerevisiae* queda bajo el control del promotor de la galactosa cinasa (Gall), y se introduce un plásmido (pSB32) que contiene a la ATPasa mutante que se desea estudiar bajo el control del promotor *pma1* (Portillo y Serrano, 1988; Cid y col, 1987a). En el medio con galactosa, las células crecen adecuadamente y contienen ambas ATPasas. Una vez que se cuenta con suficientes células, se elimina a la galactosa del medio y se adiciona glucosa. Esto inhibe la producción de la H'ATPasa silvestre, mientras que la H'ATPasa mutante continúa produciéndose (Figura 11).

Este sistema de expresión, sin embargo, muestra algunos inconvenientes: 1) La H'ATPasa mutada está mezclada con la H'ATPasa normal de la membrana plasmática. 2) Al cambiar al medio de glucosa para inhibir el gene cromosomal, el crecimiento de la levadura continúa sólo si la mutante es funcional.

Posteriormente se desarrolló otra estrategia para la expresión de la H'ATPasa en que la H'ATPasa mutada se incluye en un plásmido centromérico bajo control de dos promotores de choque por calor (pHSE-pma) (Nakamoto y col, 1991) (Figura 12). Se usó la cepa de

levadura *sec6-4*, que contiene un defecto en la vía de secreción que es sensible a temperatura (Schekman y Novick, 1982), en la que además se introdujo el promotor *Gall* para controlar la expresión del gene *PMAL* nativo (Nakamoto y col 1991).

En un medio con galactosa, a 23°C, se produce la H'ATPasa silvestre que permite el crecimiento normal. Cuando las células se cambian a un medio con glucosa a 37°C, el gene cromosomal silvestre se apaga y el aumento en la temperatura enciende al gene mutado e inhibe la fusión de las vesículas de secreción con la membrana plasmática. En consecuencia, estas vesículas se acumulan en el citosol (Nakamoto y col, 1991). Posteriormente, se aíslan las vesículas que contienen la H'ATPasa mutante con la porción citoplásmica hacia el exterior, por lo que se puede medir el transporte de H' hacia el lumen de las vesículas, donde la acidificación puede ser medida con un reactivo fluorescente sensible a pH. Las vesículas contienen una cantidad sustancial de H'ATPasa recién sintetizada proveniente del plásmido (5-10% de la proteína total) y solo trazas de ATPasa silvestre. Además, no tienen ATPasa mitocondrial o fosfatasas.

VII. Perspectivas.

El estudio de la relación estructura-función de las P-ATPasas ha avanzado aún en ausencia de información cristalográfica sobre la estructura tridimensional de la enzima. En el futuro, será necesario obtener mejores cristales de la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico, o de otras ATPasas, para poder asignar a cada aminoácido su sitio en la estructura tridimensional de la enzima (Inesi y Kirtley, 1992).

De cualquier manera, el estudio de las H'-ATPasas de hongos y levaduras ha permitido grandes avances en el conocimiento del mecanismo de acción de estas enzimas. La posibilidad de aplicar las nuevas técnicas de biología molecular al genoma de los hongos y levaduras (Sherman, 1991) ha ayudado a avanzar rápidamente en la identificación de los aminoácidos importantes para la función. Los nuevos sistemas de expresión alterna permiten obtener las H'ATPasas

con alto grado de pureza, lo que eventualmente debe resultar en estudios estructurales. La perspectiva de estudio actual está dirigida a entender la relación estructura-función de las H⁺ATPasas, identificando las áreas de la proteína que ejercen funciones específicas como son la interacción con el sustrato, el transporte del protón a través de la membrana y el control de la síntesis y de la actividad de la enzima por glucosa. Es probable que en un futuro cercano se puedan probar mecanismos del funcionamiento de las P-ATPasas similares (o mejores) que el que proponemos aquí.

VIII. Bibliografía.

- Aaronson, LR, KM Hagger, JW Davenport, SM Mandala, A Chang, DW Speicher, y CW Slayman, *J Biol Chem* (1988) 263, 14552-14558.
- Abrahams, JP, AGW Leslie, R Lutter y JE Walker, *Nature* (1994) 370, 621-628.
- Addison, R y GA Scarborough, *J Biol Chem* (1981) 256, 13165- 13171.
- Addison, R, *J Biol Chem* (1986) 261, 14896-14901.
- Addison, R y GA Scarborough, *Biochem* (1986) 25, 4071-4076.
- Alhers, J, E Ahr y A Seyfarth, *Mol Cell Biochem* (1978) 22, 39-49.
- Amory, A, F Foury y GA Goffeau, *J Biol Chem* (1980) 255, 9353-9357.
- Amory, A y GA Goffeau, *J Biol Chem* (1982) 257, 4723-4730.
- Amory, A, GA Goffeau, DB McIntosh y PB Boyer, *J Biol Chem* (1982) 257, 12509-12516.
- Amzel, LM y PL Pedersen, *Annu Rev Biochem* (1983) 52, 801-824.
- Anraku, Y, N Umemoto, R Hirata, y Y Wada, *J Bioenerg Biomemb* (1989), 21, 589-603.
- Bidwai A, NA Morjana y GA Scarborough, *J Biol Chem* (1989) 264, 11790-11795.
- Blasco, F, JP Chapius y R Giordani, *Biochimie* (1981) 63, 507-514.
- Blatt, MR y CL Slayman, *J Membrane Biol* (1983) 72, 233-234.
- Borst-Pawels, GWFH y PHJ Peters, *Biochim Biophys Acta* (1981) 642, 173-181.
- Bowman, BJ y CW Slayman, *J Biol Chem* (1977) 252, 3357-3363.
- Bowman, BJ, SE Mainzer, KE Allen y CW Slayman, *Biochim Biophys Acta* (1978) 512, 13-28.
- Bowman, BJ y CW Slayman, *J Biol Chem* (1979) 254, 2928-2934.
- Bowman, BJ, F Blasco y CW Slayman, *J Biol Chem* (1981) 256, 12343-12349
- Bowman EJ y BJ Bowman, *J Bacteriol* (1982) 151, 1326-1337.
- Bowman, EJ, *J Biol Chem* (1983a) 258, 15238-15244.
- Bowman, BJ, *J Biol Chem* (1983b) 258, 13002-13007
- Bowman, BJ, CJ Bereneski y CY Jung, *J Biol Chem* (1985) 260, 8726-8730

- Bowman, BJ y EJ Bowman, *J Membr Biol* (1986) 94, 83-97.
- Bowman, BJ, R Allen, MA Wechsler EJ Bowman, *J Biol Chem* (1988) 263, 14002-14007.
- Bowman, EJ, A Siebers, y K Altendorf, *Proc Natl Acad Sci USA* (1988a) 85, 7972-7976.
- Bowman, EJ, K Tenney y BJ Bowman, *J Biol Chem* (1988b) 263, 13994-14001.
- Bowman, BJ, WJ Dschida, T Harris y EJ Bowman, *J Biol Chem* (1989) 264, 15605-15612.
- Bowman, BJ, N Vázquez-Laslop y EJ Bowman, *J Bioener Biomemb* (1992) 24, 361-370.
- Brooker, RJ y CW Slayman, *J Biol Chem* (1982) 257, 12051-12055.
- Brooker, RJ y CW Slayman, *J Biol Chem* (1983a) 258, 222-226.
- Brooker, RJ y CW Slayman, *J Biol Chem* (1983b) 258, 8827-8832.
- Capieaux, E, ML Vignais, A Sentenac y A Goffeau, *J Biol Chem* (1989) 264, 7437-7446.
- Cantor, CR y PR Schimmel, "Regulation of biological activity" *The behavior of macromolecules. Biophysical Chemistry Part III.* AC Bartlett (Ed) (Freeman and Co, New York, 1980) cap 17, pp 939- 978.
- Cid, A, R Perona y R Serrano, *Curr Genet* (1987a) 12, 105-110
- Cid, A, F Vara y R Serrano, *Arch Biochem Biophys* (1987b) 252, 496-500.
- Cid, A y R Serrano, *J Biol Chem* (1988) 263, 14134-14139.
- Chanson, A, E McNaughton y L Taiz, *Plant Physiol* (1984) 76, 498-507.
- Dame, JB y GA Scarborough, *Biochemistry* (1980) 19, 2931-2937.
- Dame, JB y GA Scarborough, *J Biol Chem* (1981) 256, 10724-10730.
- Davenport, JW, y CW Slayman, *J Biol Chem* (1988) 263, 16007-16013.
- Davies, CB, KE Smith, BN Jr Campbell y GG Hammes *J Biol Chem* (1990) 256, 1300-1305.
- Deisenhofer, J, O Epp, K Miki, R Huber y H Michel, *J Mol Biol* (1984) 180, 385-389.
- Delhez, J, JP Dufour, D Thines y A Goffeau, *Eur J Biochem*, (1977) 79, 319-328.

- Diffley, JFX, *Antonie van Leeuwenhoek* (1992) 62, 25-33.
- Di Pietro, A y A Goffeau, *Eur J Biochem* (1985) 148, 35-39
- Dufour, JP y A Goffeau, *J Biol Chem* (1978) 253, 7026-7032.
- Dufour, JP y TY Tsong, *J Biol Chem* (1981) 256, 1801-1808.
- Dufour, JP, A Goffeau y TY Tsong, *J Biol Chem* (1982) 257, 9365-9371.
- Dupont, Y, S Harrison, y W Hasselbach *Nature (London)*, (1973) 244, 554-558.
- Dupont, Y, *Biochem Biophys Res Comm* (1976) 71, 544-550.
- Eraso, P y C Gancedo, *FEBS Lett* (1987) 224, 187-192.
- Eraso, P y F Portillo *J Biol Chem* (1994). 269, 10393-10399.
- Forgac, M, *Physiol Rev* (1986). 69, 765-796.
- Foster, DL y RH Fillingame, *J Biol Chem* (1979) 254, 8230-8236.
- Foury, F, A Amory, y GA Goffeau, *Eur J Biochem* (1981) 119, 395-400.
- Friedl, P y HU Schairer *Eur J Biochem* (1979) 100, 175-180.
- Garavito, RM y JP Rosenbusch, *Methods Enzymol* (1984) 125, 309-328.
- García-Arranz, M, AM Maldonado, MJ Mazón y F Portillo, *J Biol Chem* (1994) 269, 18076-18082.
- Ghislain, M, A Schlessler y A Goffeau. *J Biol Chem* (1987) 262, 17549-17555.
- Goffeau, A, y L De Meis, *J Biol Chem* (1990) 265, 15503-15505.
- Goffeau, A, y CW Slayman, *Biochim Biophys Acta* (1981) 639, 197-223.
- Goffeau, A, M Ghislain, C Navarre, B Purnelle, P Supply, *Biochim Biophys Acta* (1991) 1018, 200-202
- Goormaghtigh, E, C Chadwick, y GA Scarborough, *J Biol Chem* (1986) 261, 7466-7471.
- Grandmann, D, UP Hansen, WS Long, y CL Slayman, *J Membr Biol* (1978) 39, 333-367.
- Groeneveld, P y RJ Planta, *Nucleic Acid Res* (1987) 15, 10133-101.
- Guerra, G, S Uribe y JP Pardo *Arch Biochem Biophys* (1995) 321, En Prensa, Agosto.
- Hager, KM, SM Mandala, JW Davenport, DW Speicher, Jr EJ Benz y CW

- Slayman, *Proc Natl Acad Sci USA* (1986) **83**, 7693-7697.
- Henderson, R, JM Baldwin, TA Coska, F Zemlin, E Beckmann y KH Dowing, *J Mol Biol* (1990) **213**, 899-929.
- Hennessey JPJr y GA Scarborough, *J Biol Chem* (1990), **265**, 532-537.
- Herbette, LG, P DeFoor, SP Fleischer, A Scarpa, y JK Blasie *Biochim Biophys Acta* (1985). **817**, 103-122.
- Herruer, MH, WH Mager, LP Woudt, RHM Nieuwint, GM Wassenaar, JE Hesse, L Wiczorer, K Altendorf, AS Reicin, E Dorus, y W Epstein, *Proc Natl Acad Sci* (1984), **81**, 4746-4750.
- Hubbard, MJ, PA Sullivan, y MG Sheperd, *J Biol Chem* (1985) **260**, 6782-6787.
- Hubbard, MJ, R Surarif, PA Sullivan y MG Sheperd, *Eur J Biochem* (1986) **154**, 375-381.
- Inesi, G y H Asai. *Arch Biochem Biophys* (1968). **126**, 469-477.
- Inesi, G, y MR Kirtley, (1992). *J Bioenerg Biomem* **24**, 271-282.
- Kasher, JM, *J Biol Chem* (1986) **261**, 10808-10813.
- Kasher, JS, KE Allen, K Kasamo y CW Slayman, *J Biol Chem* (1986) **261**, 10808-10813.
- Kholand, JG y GG Hammes *J Biol Chem* (1986) **261**, 5936-5942.
- Kotyk, A, M Dvoraková, y J Koryta, *FEBS Lett* (1990) **264**, 203-205.
- Malpartida, E y R Serrano, *J Biol Chem* (1981) **256**, 4175-4177.
- Mandala, SM y CW Slayman, *J Biol Chem* (1988) **263**, 15122-15128.
- Mandala, SM y CW Slayman, *J Biol Chem* (1989) **264**, 16276-16281.
- Mc Cusker, JH, DS Perlin, y JE Haber, *Mol cell Biol* (1987) **7**, 4082-4088.
- Mc Donald, JIS y G Weeks, *Arch Biochem Biophys* (1984) **235**, 1-7.
- McEnery, MW, y PL Pedersen, *J Biol Chem* (1986) **261**, 1745-1752.
- Miranda, M, J Ramírez, A Peña y R Coria, *J Bacteriol* (1995) **177**, 2360-2367.
- Money, NP, LR Aaronson, CW Slayman y CL Slayman, *Biophys J* (1988) **53**, 137-141.
- Monk, BC, WC Feng, CJ Marshall, DNS Seto Young, JE Haber, y DS Perlin *J Bioener Biomemb* (1994) **26**, 101,115.
- Morjana, NA y GA Scarborough, *Biochim Biophys Acta* (1989) **985**, 19-

25.

- Murayama, K y DH McInennan, *Proc Natl Acad Sci USA* (1988) 85, 3314-3319.
- Nakamoto RK, R Rao y CW Slayman, *Annals of New York Acad Sci* (1989) 574, 165-179.
- Nakamoto RK y CW Slayman, *J Bioener Biomembr* (1989) 21, 621-632.
- Nakamoto RK, R Rao, y CW Slayman, *J Biol Chem* (1991) 266, 7940-7949.
- Nishigaki, I, FT Chen y LE Hokin, *J Biol Chem* (1974) 249, 4911-4916.
- Odermatt, A, H Suter, R Krapf y M Solioz. *J Biol Chem* (1993) 268, 12775-12779.
- Pardo JP y CW Slayman, *J Biol Chem* (1988) 264, 9373-9379.
- Pardo JP y CW Slayman, *J Biol Chem* (1989) 264, 9373-9379.
- Pedersen, PL y E Carafoli, *TIBS* (1987) 12, 146-150.
- Peña, A, G Cinco, A Gomez-Puyou, y M Tuena, *Arch Biochem Biophys* (1972) 153, 413-425.
- Peters, RHJ y GWFH Borst-Pawels, *Physiol Plant* (1979) 46, 330-337.
- Perlin, DS, K Kasamo, J Brooker y CW Slayman, *J Biol Chem* (1984) 259, 7884-7892.
- Perlin, DS, SL Harris, P Seto-Young, y JE Haber, *J Biol Chem* (1989) 264, 21857-21864.
- Perlin, DS, S Harris, BC Monk, P Seto-Young, S Anand y JE Haber, *Acta Physiol Scand* (1992), 146 187-192.
- Pogge-von Strandmann, R, RR Kay y JP Dufour. *FEBS Lett* (1984). 175, 422-428.
- Portillo, F y R Serrano, *EMBO J* (1988) 7, 1793-1798
- Portillo, F y R Serrano, *Eur J Biochem* (1989) 186, 501-507
- Portillo, F, IF de Larrinoa, y R Serrano, *FEBS lett* (1989) 247, 381-385.
- Rao, US, JPr Hennesey y GA Scarborough, *J Biol Chem* (1991) 266, 14740- 14746.
- Rao, R, RK Nakamoto y CW Slayman, "Ion Transport", (D Keeling y C Benham, Eds)(Academic Press, Nueva York, 1989) pag 35-53.

- Rao, R y CW Slayman, *Biophys J* (1992) 62, 228-237.
- Rao, R, D Drummond-Barbosa y CW Slayman, *Yeast* (1993) 9, 1075-1084.
- Ronjat, M, JJ Lacapere, JP Duffour y Y Dupont, *J Biol Chem* (1987) 262, 3146-3153.
- Rudnick, G, *Annu Rev Physiol* (1986) 48, 403-413.
- Sanders, D, UP Hansen y CL Slayman *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) 78, 5903-5907.
- Sanders, D y CL Slayman, *J Gen Physiol* (1982) 80, 377-402.
- Scarborough, GA, *Arch Biochem Biophys* (1977) 180, 384-393.
- Scarborough, GA y R Addison. *J Biol Chem* (1984) 259, 9109- 9114.
- Scheiner-Bobis, G y RA Farley. *Biochim Biophys Acta* (1994) 1193, 226-234.
- Schekman, R y P Novick, "*The molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression*", (Strathern, JN, EW Jones, y JR Broach Eds) (Cold Spring Harbor Lb., Cold Spring Harbor, Nueva York, 1982) pag 361-368.
- Serrano, R, *Mol cell Biochem* (1978) 22, 51-63.
- Serrano, R, *FEBS lett* (1983) 156, 11-14.
- Serrano, R, MC Kielland-Brandt y GJ Fink, *Nature (London)* (1986) 319, 689-693.
- Serrano, R, *Biochim Biophys Acta* (1988) 947, 1-28.
- Serrano, R, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* (1989) 40, 61-94.
- Serrano, R y F Portillo, *Biochim Biophys Acta* (1990) 1018, 195-199.
- Serrano, R, C Montesinos, M Roldán, G Garrido, C Ferguson, K Leonard, BC Monk, DS Perlin, y EW Weiler, *Biochim Biophys Acta* (1991) 1062, 157-164.
- Seto-Young, D, BC Monk, JE Haber y DS Perlin, *J Biol Chem* (1994) 269, 23988-23995.
- Sherman, F *Methods in Enzymol* (1991) 194, 3-21
- WS Long, CYH Lu, *J Membrane Biol* (1973) 14, 305-338
- Slayman, CL y GR Zuckier, *Ann N Y Acad Sci* (1989) 254, 233-245.
- Smith, DL, T Tao y ME Maguire, *J Biol Chem.*(1993) 268, 22469-

22479.

- Smith, K y GA Scarborough, *Anal Biochem* (1984) **138**, 156-163.
- Stigall, DL, YH Galante, y Y Hateti, *J Biol Chem* (1978) **253**, 956-964.
- Stokes, DL y NM Green *J Biol Chem* (1990) **213**, 529-538.
- Surowry, TK y MR Sussman, *Biochim Biophys Acta* (1986) **848**, 24-34.
- Supply, P, A Wach, D Thines-Sempoux, y A Goffeau, *J Biol Chem* (1993a) **268**, 19744-19752.
- Supply, P, A Wach y A Goffeau, *J Biol Chem* (1993b) **268**, 19753-19759.
- Sussman, MR, *Anal Biochem* (1984) **142**, 210-214.
- Sussman, MR, y CW Slayman, *J Biol Chem* (1983) **258**, 1839-1843.
- Sychrova, Y y A Kotyk, *FEBS lett* (1985) **183**, 21-24.
- Sze, H, *Annu Rev Plant Physiol* (1985) **36**, 175-208.
- Sze H, JM Ward, L Shoupeng, *J Bioener Biomembr* (1992) **24**, 371-381.
- Teruel, JA, J Tudela, F Garcia Carmona, JC Gomez Fernández, y F García Canovas, *J Bioener Biomembr* (1987) **19**, 383-396.
- Ulaszewski, S, M Grenson y A Goffeau, *Eur J Biochem* (1983) **130**, 235-239.
- Ulaszewski, S, A Coddington y A Goffeau, *Curr Genet* (1986) **10**, 359-364.
- Ulaszewski, S, E Balzi y A Goffeau, *Mol Gen Genet* (1987a) **207**, 38-46.
- Ulaszewski, S, HJ Van, C Dufour, JP Kulpa, B Nieuwenhurs y A Goffeau, *J Biol Chem* (1987b) **262**, 223-228.
- Vai, M y L Popolo, *FEBS lett* (1986) **206**, 135-141.
- Van Dyck, L, JH Petretski, H Wolosker, GJr Rodríguez, A Schlessler, M Ghislain y A Goffeau, *Eur J Biochem* (1990) **194**, 785-790.
- Wach, A, A Schlessler y A Goffeau, *J Bioener Biomemb* (1992) **24** 309-317.
- Yamashiro, DJ, SR Fluss y F Maxfield *J Cell Biol* (1983) **97**, 929-934.
- Yan, RT y PC Maloney *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) **92**, 5973-5976.

Tabla I. Características de las ATPasas.

Tipo de ATPasas	Localización	Peso Mol.	No. Subunidades	Ac esp $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	Inhibidor
F ATPasa (F_1/F_0)	mitocondrias cloroplastos bacterias	450-500 kD	~ 20 $F_1 = 8-13$ $F_0 = 3-6$	0.7-1.3	Oligomicina
V ATPasa	vacuolas tonoplastos lisosomas endosomas granulos secretorios Vesículas de Golgi	>450 kDa	8-10	3-5	KNO_3 KSCN
P ATPasa	Membrana plasmática	100 kDa	monomérica dimérica o trimérica	1.5-4	Vanadato

TABLA II. Comparación de la sensibilidad a diferentes inhibidores de las ATPasas. (adaptada de Bowman y Bowman, (1986)).

Inhibidor	V ATPasa	F_1/F_0 ATPasa	P ATPasa
Vanadato	NI	NI	1.0
Azida de Na	NI	30	NI
Cloruro de tributiril	0-0.6	0.01	0.6
DCCD	0.7	0.3	8.0
NBD-Cl	1.4	3.0	14.0
TNP-ATP	10.0	6.0	100.0
Quercitina	22.0	170.0	24.0
N-etilmaleimida	50	NI	50.0
Bafilomicina	0.5×10^{-3}	NI	moderada
KNO_3	50 (mM)	NI	NI

Los valores son constantes de inhibición expresadas (excepto donde se indica) en concentraciones micromolares. Abreviaturas de la tabla: NI no inhibe; DCCD dicitclohexilcarbodiimida; NBD-Cl 4-cloro-7-nitrobenza-2-oxa-1,3-diazol; KNO_3 nitrato de potasio; TNP-ATP 2'(3')-trinitrofeniladenosín-5'- trifosfato.

Tabla III Comparación de segmentos transmembranales.
 Segmento I.

ESPECIE	SECUENCIA
<i>S cerevisiae</i> H'ATPasa	KFVMFFVGPVIOFVMEAAAILAAGLSD
<i>N crassa</i> H'ATPasa	KFLGFFVVVGPIOFVMEGAAVCAAGLE
Gástrica H'/K'ATPasa	ROLAGGLOCLMWVAAAICLIAFAIOASE
<i>E coli</i> K'ATPasa	RNPVMFIVWIGSLLTTCISIAMSGAMPGN

Tabla IV. Comparación de secuencias. Sitio de Fosforilación.

ESPECIE	SECUENCIA
<i>S cerevisiae</i> H'ATPasa	(365)AIESLAGVEILCSDKTGTLTKNKLSL
<i>N crassa</i> H'ATPasa	(365)AIESLAGVEILCSDKTGTLTKNKSL
Gástrica H'/K'ATPasa	(372)AVETLGSTSVICSDKTGTLTQNRMTV
<i>E coli</i> K' ATPasa	(294)AVEAAGDVDVLLLDKTGTITLGNRQA

Nota: D representa el aspártico que se fosforila y se encuentra conservado en la mayoría de las especies.

Tabla V Residuos modificados en *N crassa**.

Residuo modificado	Inhibidor	Protección por ATP	Referencia.
Lis 474	FITC	si	1
Cis 532	NEM IAEDANS	si -	2
cis 545	NEM IAEDANS	no -	2
Arg*	Fenil glioxal butanodiona	si no	3, 4
Glu 129	DCCD	no	5
Glu/Asp	EEDQ	no**	6
Histidina	DEP	si	7

Adaptada de Nakamoto y Slayman, (1989). 1) Pardo y Slayman 1988; 2) Pardo y Slayman 1989; 3) Di Pietro y Goffeau 1985; 4) Kasher y col 1986; 5) Sussman y col 1987; 6) Addison y Scarborough, 1986; 7) Morjana y Scarborough, 1989.* Residuo de aminoácido no determinado.** Hay protección en presencia de MgATP y vanadato. Abreviaturas: N-etilmaleimida (NEM); Isotiocianato de fluoresceína (FITC); N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCCD); N-etoxicarbonil-2-etoxil,2,-dihidroquinoleina (EEDQ); N-yodoacetil aminoetil-5-naftilamina-1 del ácido sulfónico (IAEDANS); Dietilpirocarbonato (DEP).

PIES DE FIGURA.

FIGURA 1. Síntesis y utilización del ATP en la célula. El ATP se sintetiza como resultado del catabolismo celular, en procesos como la glucólisis, la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis. A su vez, se utiliza para energizar la síntesis de moléculas, la contracción muscular, la movilidad celular y el transporte de iones y nutrientes.

FIGURA 2. Estructura de las ATPasas celulares. Las ATPasas son enzimas de membrana que constan de una región transmembranal y de una región soluble. a) F-ATPasa, constituida por tres proteínas de membrana y al menos cinco proteínas solubles en diferentes estequiometrías, con un PM de aproximadamente 450kDa; b) V-ATPasa, constituida por cuatro diferentes subunidades de membrana y cinco proteínas solubles, con diferentes estequiometrías, y un PM de 400 a 700 kDa; c) P-ATPasa constituida por una sola proteína, con un PM aproximado de 100 kDa; d) P-ATPasa con subunidad alfa (100 kDa), beta (55 kDa) y gamma (11 kDa) (como en el caso de Na^+/K^+ ATPasa) y , e) P-ATPasa dimérica (como el caso de H^+ ATPasa de *N crassa*).

FIGURA 3. Control de la actividad de la H⁺ATPasa. La glucosa entra por un cotransporte con protones en un proceso activado por una proteína sensora de azúcares (GGS1) y se transforma de inmediato en glucosa-6-fosfato mediante hexoquinasas (HK). La glucosa 6-fosfato estimula a una proteína kinasa (PK) de membrana que a su vez fosforila a la H⁺ATPasa activándola. En el núcleo, la glucosa-6-fosfato activa al promotor de la H⁺ATPasa mediante el factor TUF acelerando la síntesis de la ATPasa.

FIGURA 4. Ciclo de reacción de las P-ATPasas. 1) La ATPasa en su conformación E₁ se une a un protón situado en el citoplasma (interno; H_i), a un magnesio y a un ATP. 2) El ATP se hidroliza y la enzima (E₁) queda fosforilada y protonada. 3) Se lleva a cabo el cambio a la conformación E₂ y el protón pasa al lado externo de la membrana plasmática (H_e). 4) Se libera el protón al medio externo. 5) La unión fosfato-ATPasa se hidroliza y la enzima queda como E₂ deprotonada. 6) La H⁺ATPasa regresa a su conformación E₁. El vanadato se combina con la forma E₂ y la NEM se combina con la forma E₁. En ambos casos, la H⁺ATPasa se inactiva y queda "congelada" en estas conformaciones.

FIGURA 5. Modelo topológico de la H⁺ATPasa de los hongos. Se observan los diez segmentos transmembranales, enumerados I a X a partir del extremo amino-terminal. Los segmentos solubles se denominan de acuerdo a su posición con respecto a los segmentos transmembranales. Los números indican la posición de cada residuo en el lado citoplásmico de cada segmento transmembranal.

FIGURA 6. Mutagénesis dirigida de la región encargada de la fosforilación y defosforilación de la H⁺ATPasa. En el diagrama se indica la posición de los residuos mutados usando abreviaturas de una letra. Las mutaciones fueron: D226N, T231G, E233Q, K250T, G26D, S368F, C376L, D634N, P640L, D730N.

FIGURA 7. Mutagénesis de aminoácidos relacionados con el sitio de unión al fosfato. En el diagrama se indica la posición de los residuos mutados usando abreviaturas de una letra: S368F, C376L, D378N/E/T, K379Q, K474R/Q, D534N, A547V, D560N, A608T, D634N, D638N, P640L.

FIGURA 8. Mutagénesis de aminoácidos de la región transmembranal de la H⁺ATPasa. En el diagrama se indica la posición de los residuos mutados usando abreviaturas de una letra: E129Q/L, D143N, G158D, P335A, E703Q, D730N, E803Q, A813S, G814S, P815A, D833A, I834S, I835R. mI segmento transmembranal uno, mX segmento transmembranal diez.

Figura 9. Modelo que propone la ubicación y el desplazamiento de los segmentos transmembranales de la H⁺ATPasa. La conformación I y la conformación II son producto del deslizamiento de las asas I, II y VIII en respuesta a los cambios conformacionales generados en las asas citoplásmicas mII-mIII y mIV-mV (no mostradas) por la fosforilación (conformación II) y desfosforilación (conformación I). Las interacciones entre los segmentos son las propuestas por Perlin y cols (1994). El deslizamiento de las asas ha sido propuesto para otros transportadores (Yan y Maloney, 1995).

FIGURA 10. Mutagénesis de aminoácidos ubicados en los extremos amino y carboxilo terminal de la H⁺ATPasa. A.- Extremo amino terminal. En el diagrama se indica la posición de los residuos mutados usando abreviaturas de una letra: (A27) delección hasta A27, (D61) delección hasta D61, (P84) delección hasta P84, (D91) A91Y, (E92) E92K. B.- Mutagénesis de aminoácidos ubicados en la región carboxilo terminal de la H⁺ATPasa: (Y873) delección de 46 aa, (E901) E901A, (D902) D902S, (F903) F903R, (M904) M904A, (A905) delección desde A905 (18 aminoácidos), (Q908) delección desde Gln-908 (11 aminoácidos).

FIGURA 11. Sistema de expresión de H⁺ATPasas mutantes descrito por el grupo de Serrano. I) Síntesis nuclear proveniente del gene nativo PMA1 bajo el control del promotor GAL1. La transcripción de la H⁺ATPasa se inhibe al quitar la galactosa del medio mientras que; II) la síntesis de la ATPasa mutante contenida en el plásmido PSB32 continúa. Al final se obtienen membranas plasmáticas que contienen una mezcla de ATPasa nativa y ATPasa mutante.

FIGURA 12. Sistema de expresión de H⁺ATPasa mutante descrito por el grupo de Slayman. I). La síntesis de la H⁺ATPasa dependiente del gene nativo PMA1, unido al promotor PGAL1 se inhibe al quitar la galactosa del medio. II). Simultáneamente, se eleva la temperatura a 37°C, con lo que se interrumpe la incorporación de las vesículas a la membrana y se inicia la síntesis de la ATPasa mutante en el plásmido PHSE. La H⁺ATPasa mutante se concentra en las vesículas secretoras que se acumulan en el citoplasma. La presencia de la H⁺ATPasa nativa en las vesículas es casi nula.

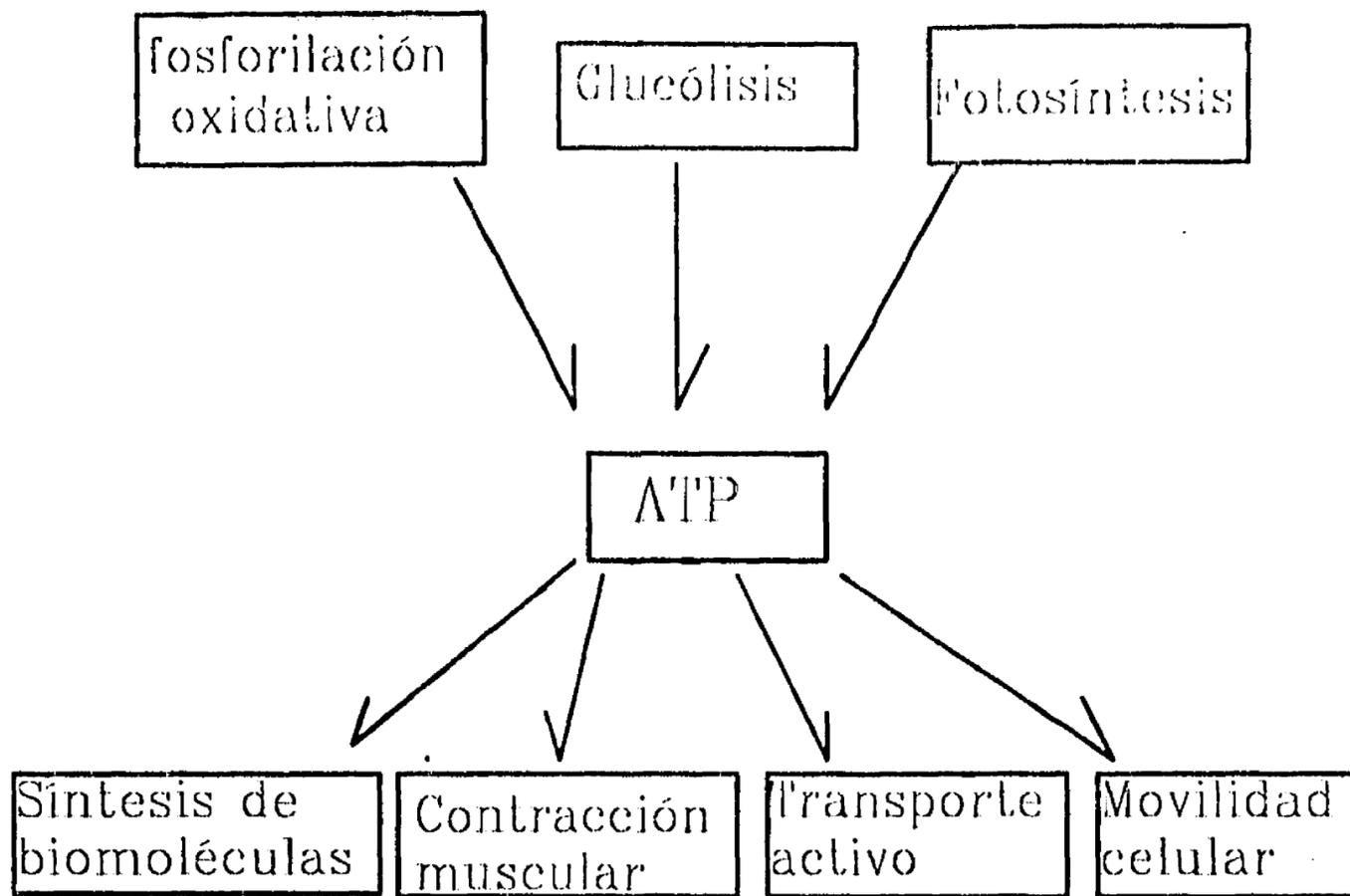


FIG 1

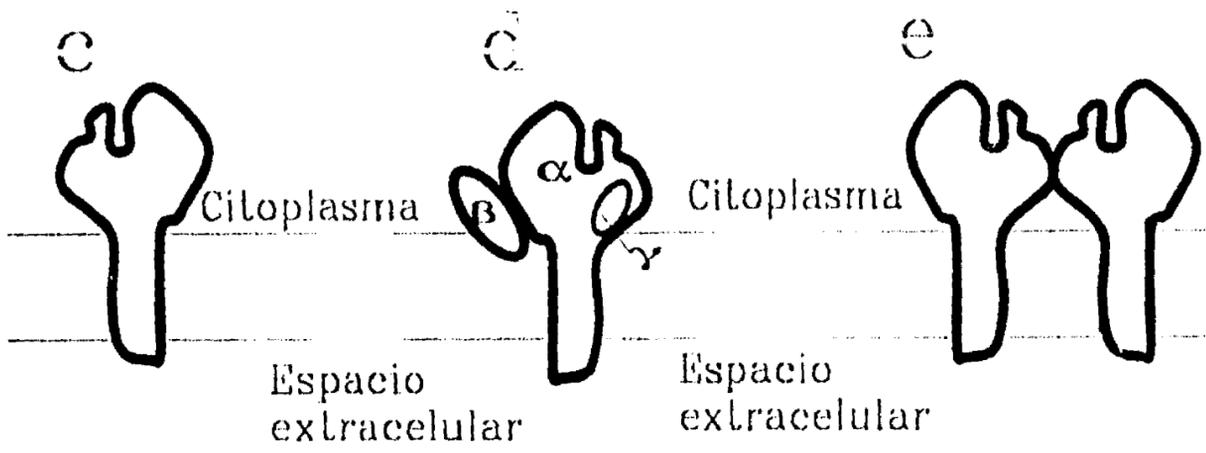
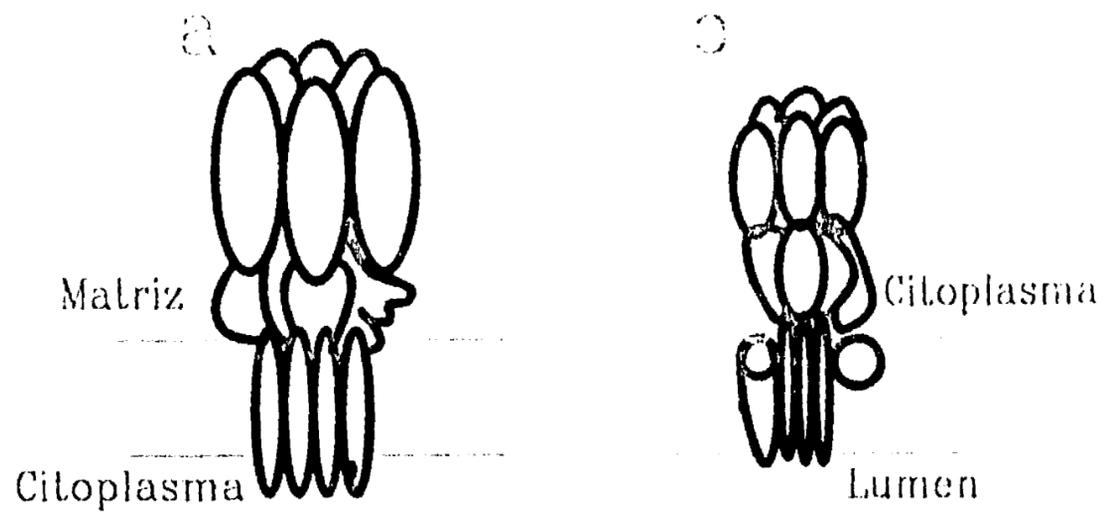


FIG. 2:

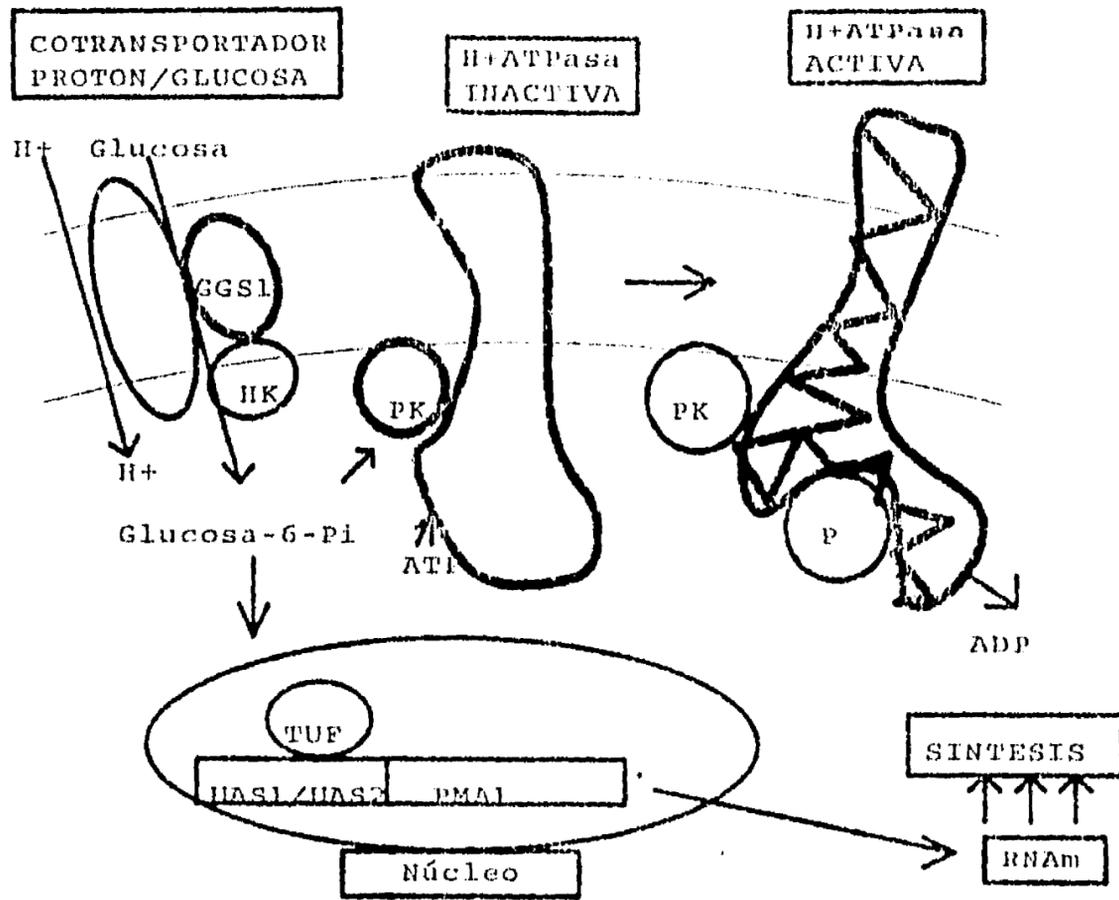


FIG. 3

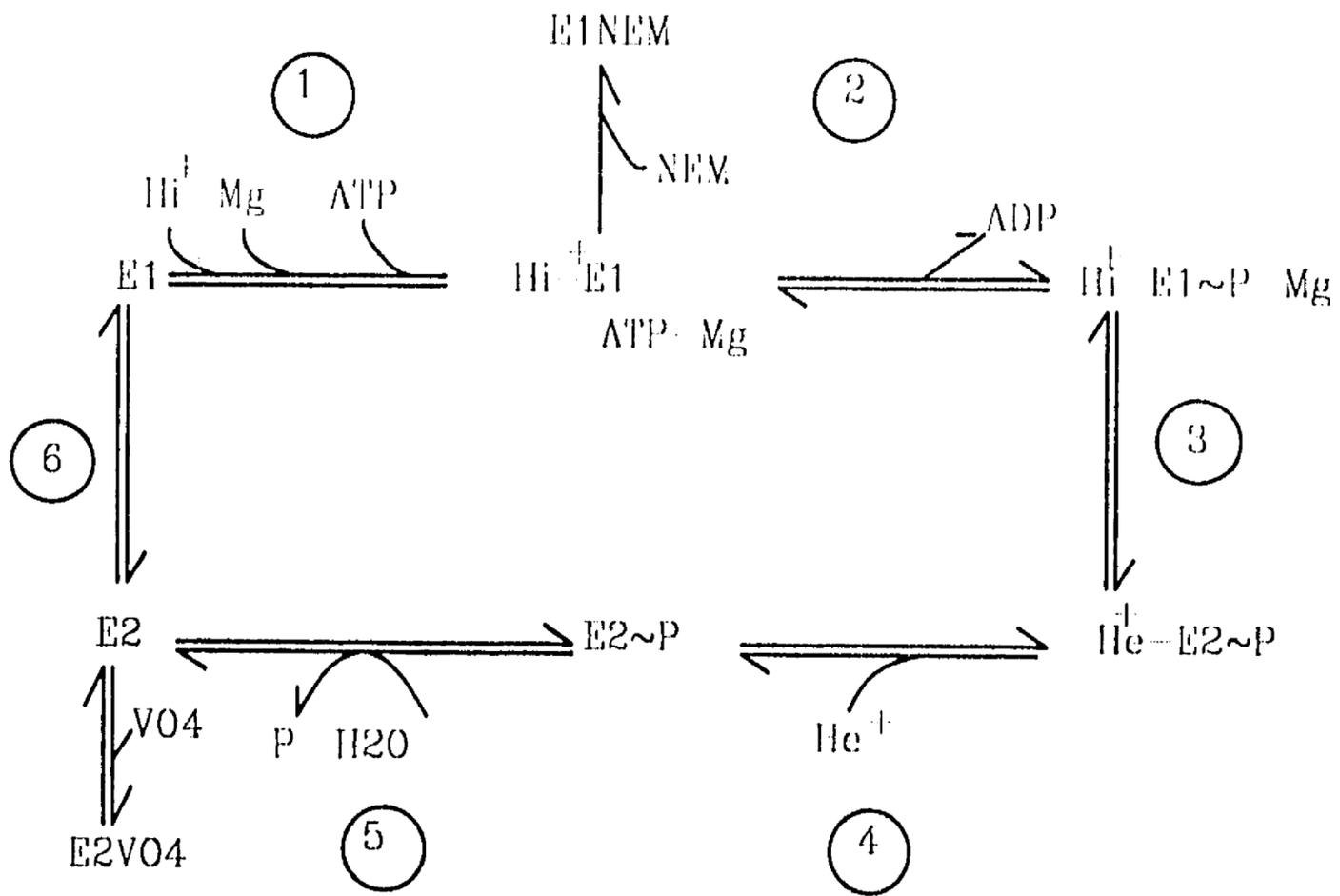


FIG. 4

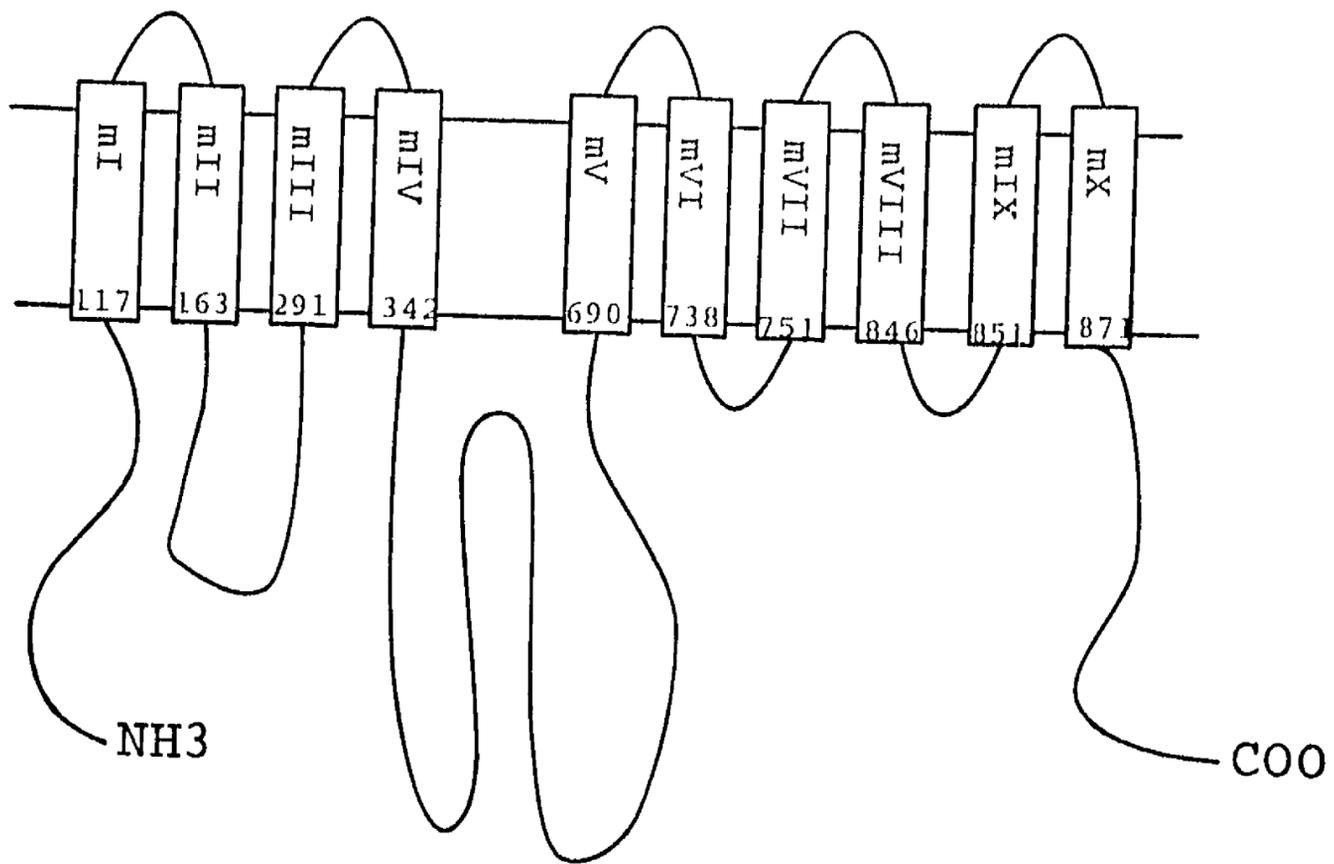


FIG.5

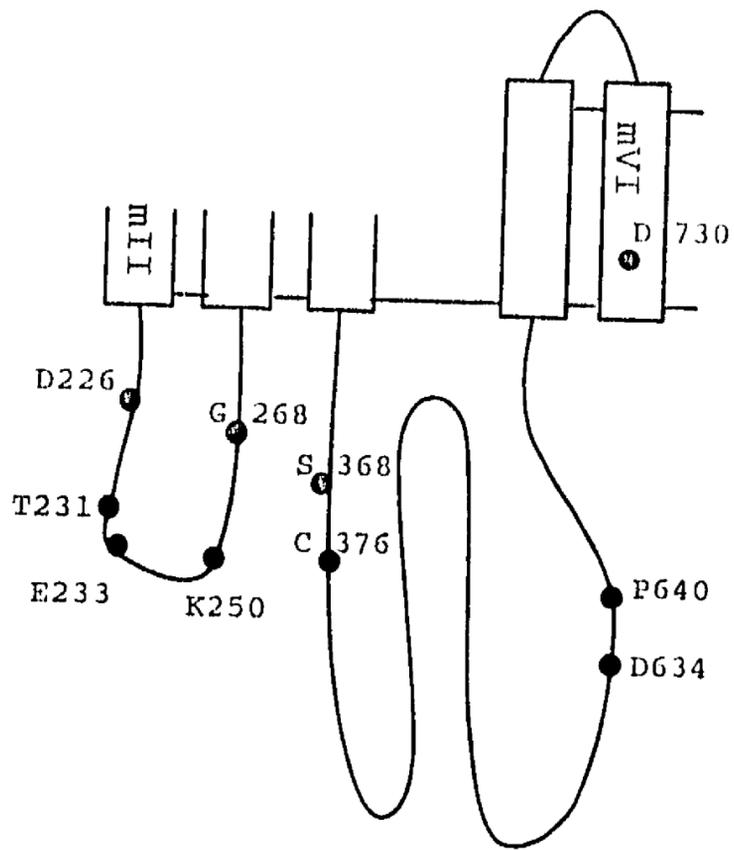


FIG. 6

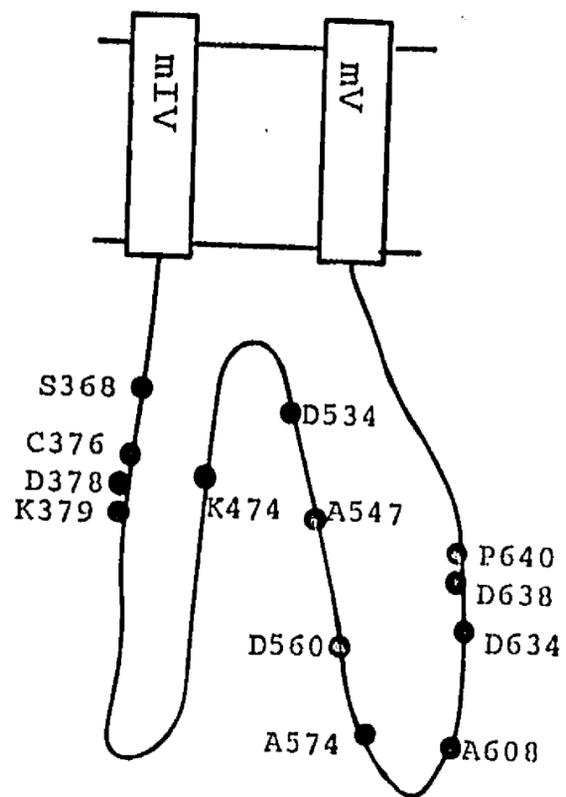


FIG. 7

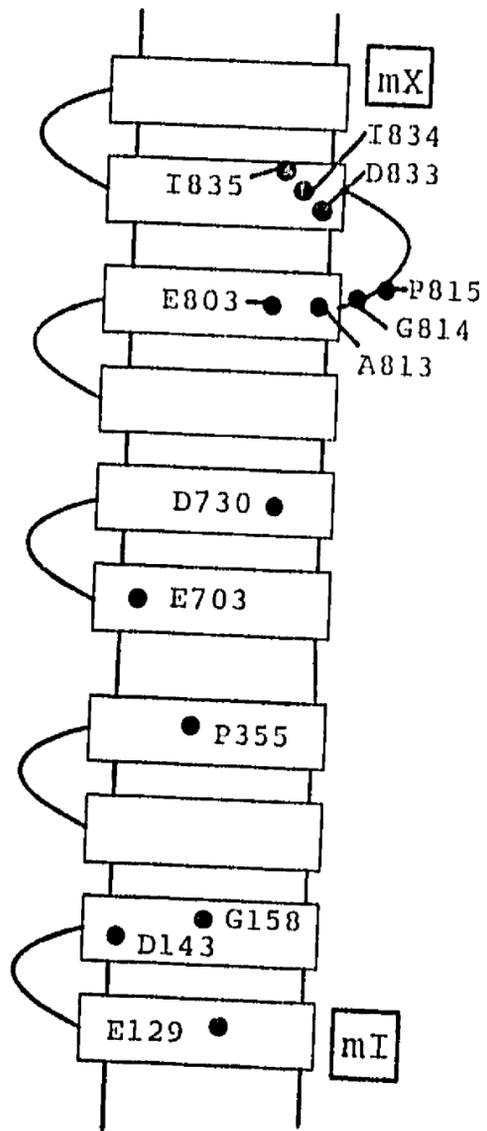


FIG. 8

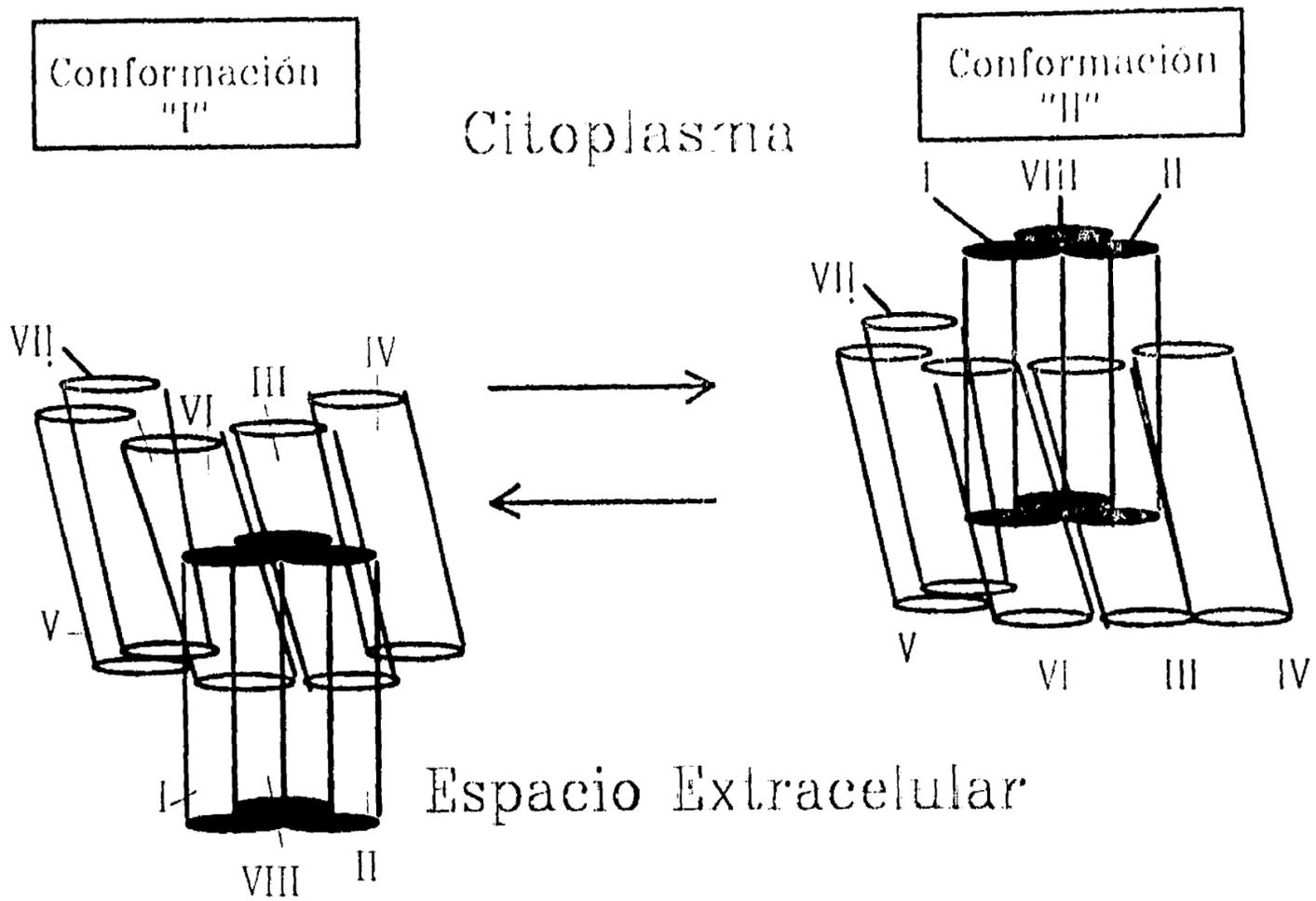


FIG. 9

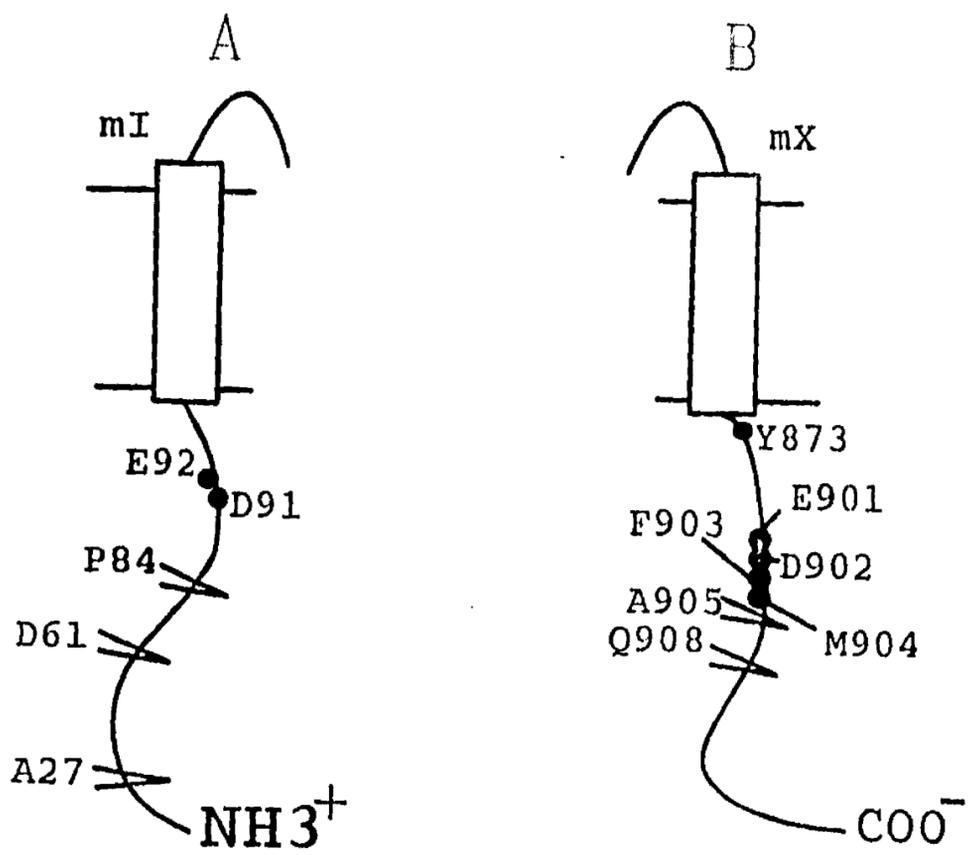


FIG. 10

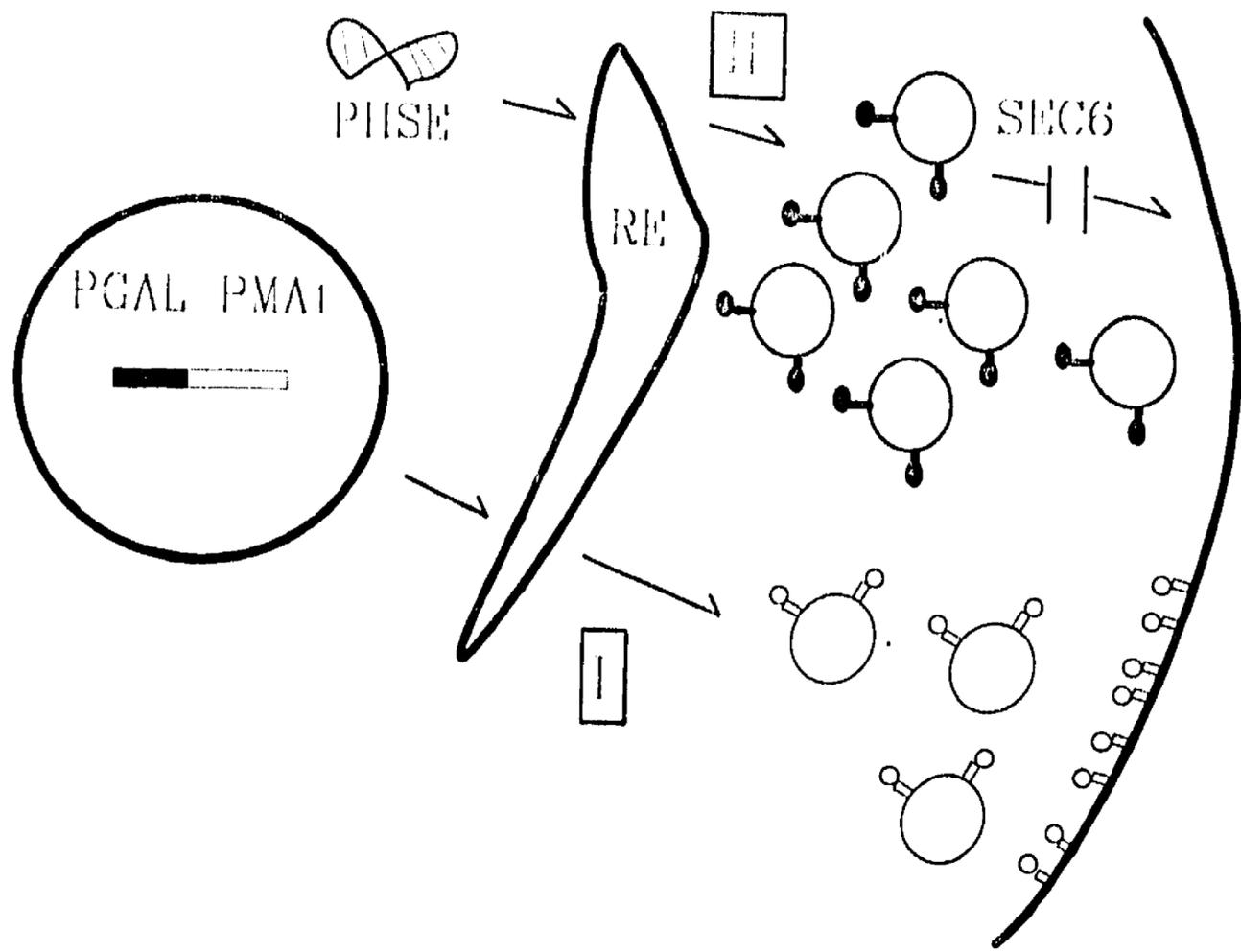


FIG. 11

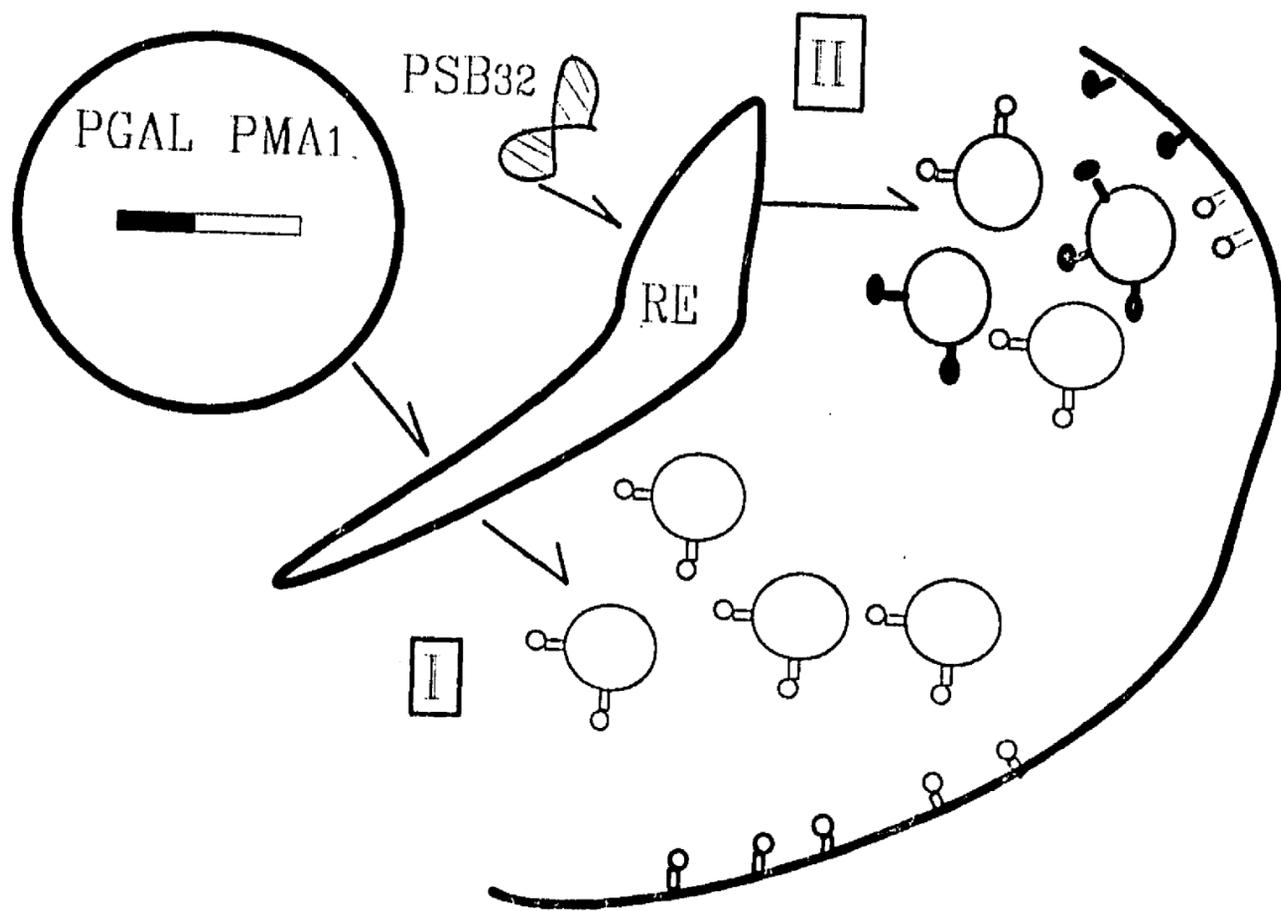


FIG. 12

Sulfhydryl groups essential for the volume-sensitive release of taurine from astrocytes

A. Martínez^a, R.A. Muñoz-Clares^b, G. Guerra^a, J. Morán^a, H. Pasantes-Morales^{a,*}

^aInstitute of Cell Physiology, ^bFaculty of Chemistry, National University of Mexico, Mexico City, Mexico

Received 16 March 1994; Revised version received 8 June 1994; Accepted 14 June 1994

Abstract

The volume-sensitive [³H]taurine efflux from cultured astrocytes was found to be strongly inhibited by the sulfhydryl group-modifying reagent *N*-ethylmaleimide (NEM). This maleimide inhibited taurine efflux evoked by 50% hyposmotic solutions with an IC₅₀ of 54 μM. The inhibition by NEM followed pseudo-first order reaction kinetics. A double log plot of the pseudo-first order constant against NEM concentration gave a linear relationship with a slope of 1.2. The data are consistent with a simple bimolecular reaction mechanism in which one molecule of NEM reacts with one sulfhydryl group per transport unit. The membrane-impermeant maleimide derivative 5-cosin maleimide did not affect the volume-stimulated taurine efflux. The sulfhydryl-modifying mercurial reagents mersalyl and *p*-chloro mercuribenzenesulfonate (0.5–1 mM) increased [³H]taurine efflux under isosmotic conditions and concomitantly decreased the hyposmolarity-evoked efflux. The results demonstrate an essential requirement for sulfhydryl groups for the volume-sensitive taurine efflux.

Key words: Taurine; NEM; Mercurial reagent; Volume regulation; PCMB; Mersalyl

Astrocytes respond to cell swelling elicited by exposure to hyposmotic solutions by an active regulatory process which restores cell volume despite the persistence of the hyposmotic condition [10]. This process is accomplished by the activation of transmembrane fluxes of intracellular solutes followed by osmotically obliged water. Osmolytes involved in this process are the inorganic ions potassium and chloride and organic molecules such as amino acids, amines and polyalcohols. Efflux of taurine as part of the adaptive response of astrocytes to swelling is well documented [11,15,16] but the mechanism involved in this efflux is still unclear. There is evidence suggesting that it may be a diffusional pathway rather than a saturable, carrier-mediated transport [20]. Based on the effect on taurine efflux of inhibitors of the anion exchanger, it has been suggested that this exchanger, presumably with Cl⁻ channel properties, may be in-

involved in taurine efflux [21]. Moreover, results of a recent electrophysiological and pharmacological study in C6 glioma cells showing that taurine is translocated through a Cl⁻ channel exhibiting the same sensitivity to blockers of the anion exchanger, strongly favors the suggestion that an anionic channel may constitute the pathway translocating taurine and possibly other organic osmolytes during volume regulation in astrocytes [7]. To gain insight into the nature of this pathway, the effect of blocking sulfhydryl groups with maleimides and organic mercurials was investigated as it is known that these groups are importantly involved in other diffusional pathways [18].

Astrocytes were cultured from dissociated cerebella of 8-day-old rats in 24-multitest dishes as previously detailed [13]. After 2–3 weeks in culture, astrocytes were preloaded with [³H]taurine (1 μCi/ml) for 1 h in the culture medium. After loading, cells were washed two times (4 min each) with isosmotic medium and subsequently incubated with the tested drugs at the concentrations and time periods indicated. The medium containing the drugs was then removed and cells were incubated for 10 min

*Corresponding author: Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apartado Postal 70-253, 04510, México D.F., Mexico. Fax: (525) 622-5607.

in isosmotic medium and 10 min with 50% hyposmotic medium. Isosmotic medium contains in mM: NaCl 135, KCl 5, MgSO₄ 0.6, CaCl₂ 1, KH₂PO₄ 1.7, glucose 10, HEPES 10. The hyposmotic medium was prepared reducing NaCl concentration to 60 mM. At the end of the experiment, radioactivity in the collected fractions and that remaining in cells was measured by scintillation spectrometry. Results are expressed as fractional release, i.e. the radioactivity in fractions as the percent of total radioactivity in the cells at the start of the experiment, excluding the washing period. Measurements of cell volume were performed using trypsinized astrocytes by electronic sizing in a Coulter counter coupled to a Channelizer, as previously described [17]. Apparent first-order rate constants for the inhibition by the drugs of taurine efflux were calculated by nonlinear fits of the experimental data to a single exponential equation $(E/E_0)100 = e^{-kt}$ using the non-linear regression analysis program of R.S. Leatherbarrow (ENZFITTER, Elsevier, BIOSOFT).

Astrocytes superfused with isosmotic medium, release [³H]taurine at a rate of $1.14 \pm 0.12\%$ per min. Superfusion with medium of reduced osmolarity (50%) leads to a rapid and large increase in taurine release of about 20 times the basal efflux. This increased efflux inactivates shortly after, despite the persistence of the hyposmotic conditions [15]. At the end of the inactivation phase, astrocytes have released 60–70% of the pre-loaded [³H]taurine (Table 1).

The effect on taurine efflux of sulfhydryl-modifying

Table 1
Effect of mercurial reagents and maleimides on taurine efflux from cultured astrocytes

Reagent	Concentration (mM)	[³ H]Taurine efflux (%)	
		Isosmotic	Hyposmotic
None		13.3 ± 0.53	67.1 ± 2.8
PCMBS	0.25	13.1 ± 1.12	65.3 ± 6.6
	0.5	16.5 ± 1.81	54.2 ± 3.9*
	1.0	21.2 ± 1.70*	47.6 ± 3.7*
Mersalyl	0.1	23.5 ± 2.16*	45.8 ± 3.6*
	0.5	49.5 ± 3.19*	31.0 ± 2.8*
NEM	0.025	12.6 ± 1.17	61.1 ± 4.9
	0.05	13.1 ± 1.16	41.2 ± 2.2*
	0.1	13.0 ± 0.71	13.1 ± 1.2*
SEM	1.0	13.2 ± 1.01	65.7 ± 3.9

Cells preloaded with [³H]taurine were incubated during 10 min with the indicated concentrations of the drugs and subsequently for 10 min in isosmotic medium and 10 min in 50% hyposmotic medium. Results are expressed as [³H]taurine released at each incubation period (excluding the washing period) as percent of total radioactivity in the cells at the start of the experiment. Values are means ± S.E.M. of 6–16 experiments. Statistically significant differences from control values: * $P < 0.001$ (Student's *t*-test).

reagents was investigated under isosmotic and hyposmotic conditions. The reagents used were the organic mercurials mersalyl and *p*-chloro mercuribenzenesulfonate (PCMBS) and the maleimides *N*-ethyl maleimide (NEM) and 5-eosin maleimide (SEM). Mersalyl and PCMBS had a dual action increasing taurine efflux under isosmotic conditions and decreasing the efflux under hyposmotic conditions (Table 1). These effects were time- and concentration-dependent (Table 1) and they could be prevented by preincubation with dithiothreitol (results not shown). The large increase of taurine efflux observed under isosmotic conditions, particularly at high concentrations and long incubation periods in the presence of the mercurials makes it likely that the effect of the drugs under hyposmotic conditions may be the result of the depletion of the taurine pool under isosmotic conditions. This effect of mercurials on basal taurine efflux is noteworthy. Increased taurine release in the presence of PCMBS has been described in other cells, presumably as a consequence of cell swelling caused by accumulation of sodium, chloride and osmotically obliged water [9]. This seems, however, not to occur in astrocytes as replacement of chloride in the medium by the impermeant anion gluconate, preventing cell swelling, did not influence the increase in taurine efflux caused by the mercurials (results not shown). This conclusion is further supported by direct measurements of astrocyte volume showing that no increase but rather a decrease (20–30%) in cell volume was observed in the presence of the mercurials ($21 \pm 1.6\%$, $n = 6$ for 1 mM PCMBS; $32 \pm 2.9\%$, $n = 6$, for 0.5 mM mersalyl). Therefore, a mechanism other than swelling is likely to be responsible for the effect of these compounds on the release of taurine under isosmotic conditions. One possibility may be that the sulfhydryl groups sensitive to mercurials are associated with structures in the membrane cytoskeleton which could serve as a permeability barrier for taurine. The increase of taurine efflux in isosmotic media caused by the cytoskeleton disrupting agent cytochalasin B supports this possibility [16].

NEM exerted a very potent inhibitory effect on the hyposmolarity-induced taurine efflux without affecting the basal release. Taurine efflux was abolished after 10 min of exposure to 100 μ M NEM (Table 1). The effect of NEM was concentration and time dependent with an IC₅₀ of 54 μ M. The inhibition by NEM followed pseudo-first order kinetics (Fig. 1A). A plot of the apparent pseudo-first order rate constants against the concentration of NEM was linear and passed through the origin, consistent with a reaction of NEM with the target-transport protein on collision (Fig. 1B). From this plot, a second order rate constant of $68.4 \pm 4.1 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ was calculated. A double log plot of the pseudo-first order rate constants against the NEM concentration gave a linear relationship, with a slope of 1.2 ± 0.2 (Fig. 1C), consistent with a first order reaction and a simple bimolecular

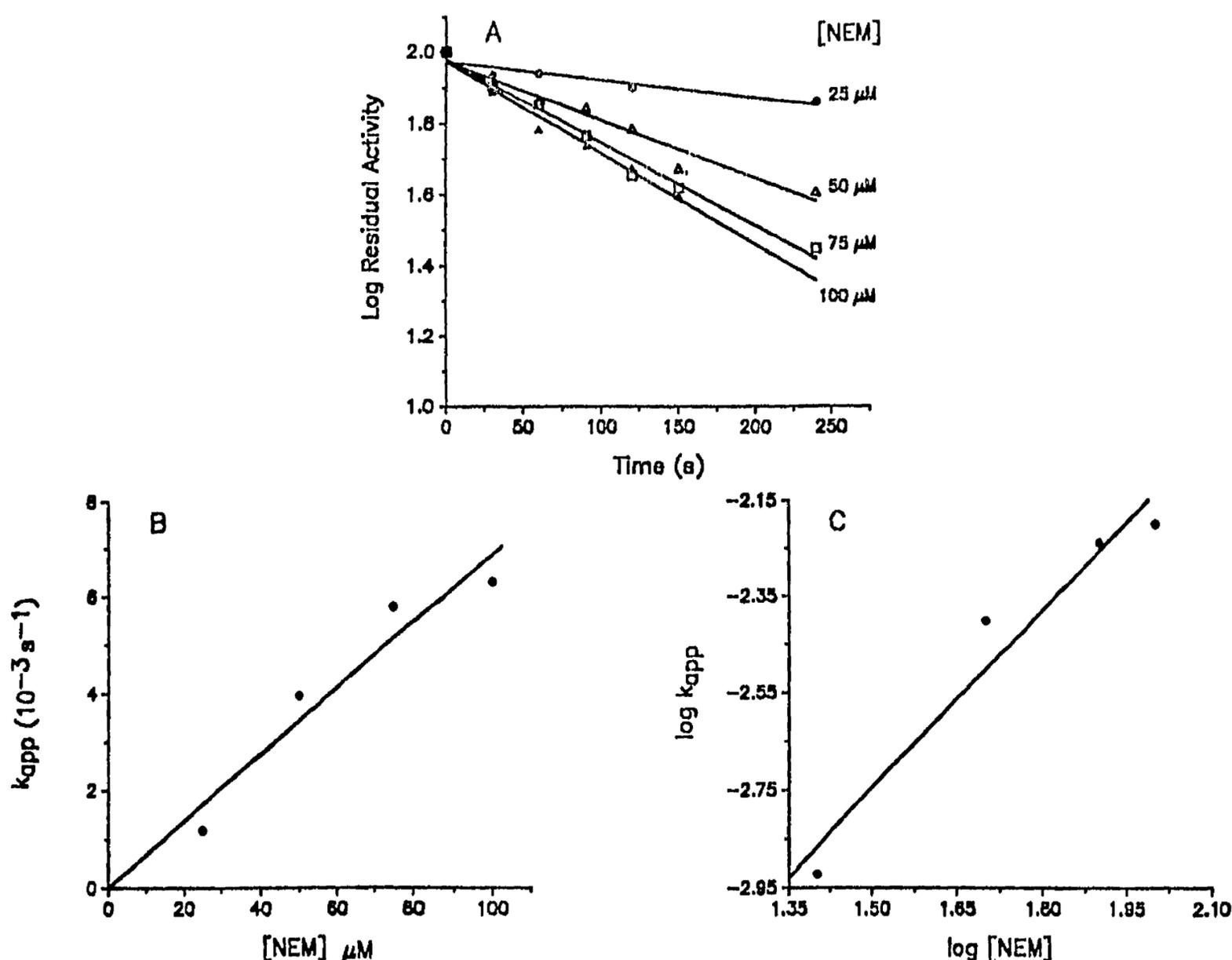


Fig. 1. Effect of NEM on $[^3\text{H}]$ taurine release stimulated by hyposmolarity. Preloaded cells were preincubated with NEM at the indicated concentrations and incubation periods and the release of $[^3\text{H}]$ taurine induced by 50% hyposmolar medium was measured as described in Table 1. In this figure, results are expressed as the residual activity in percent, considering the stimulated $[^3\text{H}]$ taurine release in the control condition as 100%. Stimulated $[^3\text{H}]$ taurine release was calculated as the difference between $[^3\text{H}]$ taurine release under hyposmotic conditions and $[^3\text{H}]$ taurine release under isosmotic conditions. Results are means of 4–16 experiments. A: semi-log plot of percent residual $[^3\text{H}]$ taurine efflux versus incubation time. The lines were calculated by non-linear regression of the data as described in the text. B: apparent pseudo-first order rate constants for inhibition of $[^3\text{H}]$ taurine efflux versus [NEM]. C: plot of $\log k_{\text{app}}$ versus $\log [\text{NEM}]$.

reaction mechanism with a stoichiometry of one sulfhydryl group of the efflux unit modified by one NEM molecule. Preincubation with taurine (5–10 mM) did not prevent the inhibitory effect of NEM (results not shown) indicating that no interference exists between NEM and the taurine recognition site(s) in the membrane. In contrast to NEM, the membrane impermeant maleimide derivative 5EM had no effect on taurine efflux (Table 1) suggesting that exofacial sulfhydryl groups are not involved in taurine release. However, the short time required for NEM to exert its effect indicates that the sulfhydryl groups affected are readily accessible to the reagent.

The present demonstration of a very potent effect of NEM on swelling-related taurine efflux is interesting, NEM being the most potent inhibitor of this process so far reported. This makes this reagent a useful tool to

further characterize the volume-activated pathways for taurine and other osmolytes in astrocytes. It is known that NEM inhibits a variety of transport systems for anions, cations, amines and amino acids [1,4,8,19,22], as well as the facilitated diffusion of glucose [18]. However, the concentration of NEM required for these latter effects, in the millimolar range, is much higher than that found in the present work for the inhibition of taurine efflux. Recent studies have shown that NEM has a potent inhibitory effect on the function of a number of ion channels. The NEM concentrations required for inhibition of these channels is in the micromolar range. Channels affected by NEM include potassium channels activated by muscarinic receptors [3,6], GABA receptor-gated chloride channels [2], L-type calcium channels [14] and calcium currents in neurons of *Aplysia* [5]. Therefore, the present findings of a potent inhibitory action of

NEM on taurine efflux evoked by hyposmolarity may add support to recent evidence suggesting that a channel, presumably an anion channel, is involved in the transmembrane fluxes of taurine activated by swelling [7,21]. It has been suggested that the NEM action on channels may be exerted via an effect on G protein-dependent transduction mechanisms associated with these channels [5,6,12]. Whether or not this may be the case for the taurine release mechanism must await further characterization of this pathway in terms of the involvement of second messenger systems. The effect of NEM described in this report could make this drug a useful tool for future investigations along this line.

The excellent technical assistance of Ms. Claudia Rodríguez and Claudia Peña Segura is gratefully acknowledged. This work was supported in part by a grant from DGAPA-UNAM (IN-202093). A.M. is a recipient of a CONACYT scholarship.

- [1] Alcántara, R., López-Corcuera, B. and Aragón, C., Group-selective reagent modification of the sodium-and chloride coupled glycine transporter under native and reconstituted conditions, *Biochim. Biophys. Acta*, 1067 (1991) 67–40.
- [2] Allan, A.M. and Baier, L.D., Effect of thiol group modification on ion flux and ligand binding properties of the GABA_A-benzodiazepine receptor chloride channel complex, *Synapse*, 10 (1992) 310–316.
- [3] Clark, R.B., Nakajawa, T., Giles, W., Kanai, K., Momose, Y. and Szabo, G., Two distinct types of inwardly rectifying K⁺ channels in bull-frog atrial myocytes, *J. Physiol.*, 424 (1990) 229–251.
- [4] Czech, M.P., Differential effects of sulfhydryl reagents on activation and deactivation of the fat cell hexose transport system, *J. Biol. Chem.*, 251 (1976) 1164–1170.
- [5] Fryer, M.W., An *N*-ethylmaleimide-sensitive G-protein modulators of *Aplysia* Ca²⁺ channels, *Neurosci. Lett.*, 146 (1992) 84–86.
- [6] Ito, H., Sugimoto, T., Kobayashi, K., Takahashi, K., Katada, T. and Kurachi, M., On the mechanism of basal and agonist-induced activation of the G-protein-gated muscarinic K channel in atrial myocytes of guinea pig heart, *J. Gen. Physiol.*, 98 (1991) 517–533.
- [7] Jackson, P.S. and Strange, K., Volume-sensitive anion channels swelling activated inositol and taurine efflux, *Am. J. Physiol.*, 34 (1993) C1489–C1500.
- [8] Kanner, B.I., Active transport of γ -aminobutyric acid by membrane vesicles isolated from rat brain, *Biochemistry*, 17 (1978) 1207–1211.
- [9] Kleinzeller, A., Booz, G.W., Mills, J.W. and Ziyadeh, N., pCMBS-induced swelling of dogfish (*Squalus acanthias*) rectal gland cells: role of the Na⁺, K⁺-ATPase and the cytoskeleton, *Biochim. Biophys. Acta*, 1025 (1990) 21–31.
- [10] Kimelberg, H.K. and Frangakis, M., Volume regulation in primary astrocyte cultures, *Adv. Biosci.*, 61 (1986) 177–186.
- [11] Kimelberg, H.K., Gederie, S.K., Higman, S., Pang, S. and Wamiewski, R.A., Swelling induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures, *J. Neurosci.*, 10 (1990) 1583–1591.
- [12] Kitamura, Y. and Nomura, Y., Uncoupling of rat cerebral cortical α_2 -adrenoceptors from GTP-binding processes by NEM, *J. Neurochem.*, 49 (1987) 1894–190.
- [13] Morán, J. and Patel, A.J., Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons and not astrocytes, *Brain Res.*, 486 (1989) 15–25.
- [14] Morphy, B.J., Washkurak, A.W. and Tuana, B.S., Dihydropyridine binding to the L-type channel in rabbit heart sarcolemma and skeletal muscle-transverse tubules: role of disulfide, sulfhydryl and phosphate groups, *Biochim. Biophys. Acta*, 1052 (1990) 333–339.
- [15] Pasantes-Morales, H. and Schousboe, A., Volume regulation in astrocytes: a role for taurine as an osmoeffector, *J. Neurosci. Res.*, 20 (1988) 505–509.
- [16] Pasantes-Morales, H., Morán, J. and Schousboe, A., Volume-sensitive release of taurine from cultured astrocytes: properties and mechanisms, *Glia*, 3 (1990) 427–432.
- [17] Pasantes-Morales, H., Murray, R.A., Lilja, L. and Morán, J., Regulatory volume decrease in cultured astrocytes. I. Potassium- and chloride-activated permeability, *Am. J. Physiol.*, 35 (1994) C165–C171.
- [18] Regen, D.M., Schraw, W.P., Tarpley, H.L. and Juliao, S.F., Effects of thiol reagents on glucose transport in thymocytes, *Biochim. Biophys. Acta*, 644 (1981) 62–68.
- [19] Robillard, G.T., Schraaf, J.M. and Teelken, A.W., Dithiols and monothiols are linked with GABA transport in membrane vesicles of rat brain synaptosomes, *FEBS Lett.*, 224 (1987) 391–395.
- [20] Sánchez-Olea, R., Morán, J., Schousboe, A. and Pasantes-Morales, H., Hyposmolarity-activated fluxes of taurine in astrocytes are mediated by diffusion, *Neurosci. Lett.*, 130 (1991) 233–236.
- [21] Sánchez-Olea, R., Peña, C., Morán, J. and Pasantes-Morales, H., Inhibition of volume regulation and efflux of osmoregulatory amino acids by blockers of Cl⁻ transport in cultured astrocytes, *Neurosci. Lett.*, 156 (1993) 141–144.
- [22] Sokol, P.P., Holohan, D. and Ross, C.R., Essential disulfide and sulfhydryl groups for organic cation transport in renal brush-border membranes, *J. Biol. Chem.*, 267 (1986) 3282–3287.

Reactivity of the H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis* to Sulfhydryl Reagents¹

Guadalupe Guerra,* Salvador Uribe,* and Juan Pablo Pardo†²

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, México, D.F., 04510, México; and †Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-159, México, D.F., 04510, México

Received April 26, 1995

N-Ethylmaleimide (NEM) inhibited the H⁺-ATPase (EC 3.6.1.35) from *Kluyveromyces lactis* with a second-order constant of 200 M⁻¹ min⁻¹. H⁺-ATPase was partially protected by Mg-ADP. Low concentrations of Mg protected ATPase from the effects of NEM, while high Mg sensitized ATPase to NEM. The reaction of ¹⁴C-NEM with the native enzyme modified three cysteine residues/monomer, two of which were involved in 80% of the inactivation of the enzyme. In the presence of Mg-ADP, NEM binding to the first residue had only a slight effect on the activity (10–20% inhibition). After further incubation, the modification of a second cysteine residue (probably cys-221) inactivated the ATPase. Methyl methanethiosulfonate did not inhibit the H⁺-ATPase but resulted in a NEM-resistant H⁺-ATPase. There seems to be at least one cys (probably cys-532) at, or near, the nucleotide binding site of the H⁺-ATPase, which does not appear to be essential for activity. Modification of a second cys residue (cys-221) also resulted in inactivation by NEM; this residue was not protected by ADP and thus probably is not at the ATP binding site. © 1995 Academic Press, Inc.

Key Words: proton ATPase, *Kluyveromyces lactis*, sulfhydryl reagents, *N*-ethylmaleimide, methyl-methanethiosulfonate, cysteine.

During the past few years, the use of the yeast *Kluyveromyces lactis* has been markedly increased, both for genetic engineering purposes and for a variety of industrial applications (1, 2). When compared to the better-

known baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* (16 chromosomes and a genome size of 14,000 kb), *K. lactis* is simpler, as it contains only 10 chromosomes and a genome no longer than 12,000 kb (3, 4). Furthermore, *K. lactis* is easily grown in the laboratory and readily lends itself to cell fractionation and protein purification.

The plasma membrane of *K. lactis* contains an ATP-dependent H⁺-ATPase, which belongs to the P-type ATPases. P-ATPases are constituted by a large catalytic subunit of 100 kDa, hydrolyze ATP forming a covalent β -aspartyl phosphate reaction intermediate, and are inhibited by micromolar concentrations of vanadate; P-ATPases transport specific cations across cell membranes. The H⁺-ATPase from the plasma membrane of *K. lactis* and other fungi ejects protons from the cell generating an electrochemical gradient that drives the uptake of sugars, amino acids, and inorganic ions (5). The H⁺-ATPase is essential for cell viability and growth; thus, understanding the factors that control the production, stability, and activity of this enzyme is an important goal of current research.

The reactivity of the cysteine residues contained in the H⁺-ATPase was examined with the aim of studying the kinetic properties of this enzyme. Gene cloning has recently established that the *K. lactis* enzyme contains nine cysteines [*K. lactis* H⁺-ATPase gene; GeneBank Accession Number L37875 (6)]. Six of these cysteines are conserved in the H⁺-ATPases of other fungal species (6–8). The effects of a highly specific SH³ reagent, *N*-ethylmaleimide (NEM), on the activity of the H⁺-

¹ Partially supported by Grants IN206689 and IN200694 from the DGAPA, UNAM. G.G. is a Ph.D. fellow from the CONACYT and from the PADEP, UACPYP, CCH, UNAM.

² To whom correspondence should be addressed. Fax: (525) 622 5630. E-mail: pardov@servidor.unam.mx.

³ Abbreviations used: AMPSO, 3-[1,1-dimethyl-2-hydroxyethyl]-aminol-2-hydroxypropanesulfonic acid; NEM, *N*-ethylmaleimide; MMTS, methyl methanethiosulfonate; DTT, dithiothreitol; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PVDF, polyvinylidene difluoride; SH, sulfhydryl; EGTA, ethylene glycol bis(β -aminoethyl ether)-*N,N'*-tetraacetic acid.

ATPase were analyzed, together with data from parallel labeling with ^{14}C -NEM. The results suggested that three cysteines are capable of reacting with NEM in the native protein, and modification of two of these residues leads to enzyme inactivation. Mg-ADP partially prevented the NEM-mediated inhibition. The small SH reagent MMTS blocked the reaction of NEM with the H^+ -ATPase, although the enzyme remained fully active.

Our results are different from the reports on the *Neurospora crassa* H^+ -ATPase (9, 10). The *N. crassa* enzyme is totally protected by Mg-ADP against NEM inactivation (9), while in the *K. lactis* enzyme protection is partial. In *N. crassa*, only one cysteine seems to participate in the NEM-mediated inhibition of ATPase (10), while in *K. lactis* there seems to be two cysteines involved: one at or near the active site and another removed from it.

MATERIALS AND METHODS

Materials. All reagents were of the best quality available commercially. NEM, MMTS, rabbit muscle pyruvate kinase, iodoacetamide, $\text{Na}_2\text{-ATP}$ (vanadate free), $\text{Na}_2\text{-ADP}$, phosphoenolpyruvate, PMSF, liticase, and asolectin were from Sigma Co. (St. Louis, MO). PVDF membranes were from Bio-Rad Laboratories, Inc. Sephadex G-50 was from Pharmacia (Upsala). ^{14}C -NEM (sp act, 39 mCi/mmol) was from New England Nuclear DuPont Co. (DE).

H^+ -ATPase preparation. *K. lactis* strain WM27 was grown in YPD at 30°C for 20 h; the cells were harvested at midlog phase by centrifugation. The plasma membrane was isolated according to the procedure used for *N. crassa* (11) with the following modifications: cells were resuspended ($\frac{1}{5}$ w/v) in 1 mM sorbitol, pH 7.5, 1 mM EDTA, and 5% β -mercaptoethanol. Liticase (500 units/g cells) and PMSF (1 mM) were added. The suspension was kept on ice and was sonicated 4 \times 1 min at 30-s intervals. Differential centrifugation was performed according to Ref. (10). Specific ATPase activity was 2–6 $\mu\text{mol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

H^+ -ATPase was purified from the membranes as described by Bowman *et al.* (12) with the following modifications: the plasma membrane was diluted to 2 mg/ml with buffer A (75 mM Tris, pH 7.2, 0.6 M KCl, and 6 mM EDTA), 1 mM EGTA, pH 7.2 (Tris), and deoxycholate (0.09% w/v) and incubated for 10 min at 4°C. The membranes were centrifuged at 100,000g for 1 h at 4°C. The pellet was resuspended in a small volume (<10 ml) of buffer B (25 mM Tris, pH 7.25, 45% glycerol, 0.3 M KCl, and 2 mM EDTA) in a glass homogenizer with a Teflon pestle. In this step, protein concentration was measured by Lowry as modified by Bensadoun and Weinstein (13) and adjusted to a final concentration of 5 mg/ml with buffer B. Then, asolectin was added (5 mg/ml) and zwittergent 3,14 was added slowly to obtain a zwittergent/protein ratio of 0.85 (w/w). The suspension was homogenized with four to five strokes of the Teflon pestle and centrifuged at 100,000g for 1 h at 4°C. The supernatant was subjected to centrifugation on a discontinuous glycerol gradient (65, 60, 55, and 50% glycerol in 10 mM Tris, pH 7, 1 mM EDTA, 0.1% deoxycholate, 1 mg asolectin/ml) at 100,000g for 14 h at 2°C in a 60Ti rotor. The upper half of the supernatant was discarded and the remaining supernatant and the pellet were diluted twofold with 1 mM EGTA–Tris, pH 7.2, and centrifuged at 100,000g for 2 h. In a typical gel scan of a polyacrylamide gel, the 100,000 M_r band constituted at least 50% of the total protein concentration. The pellet was resuspended in a small volume of 1 mM EGTA–Tris, pH 7.2, and kept at –70°C until used. H^+ -ATPase specific activity was 20 to 30 $\mu\text{mol P}_i \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

Assay of ATPase activity. The standard ATPase assay mixture contained 5 mM $\text{Na}_2\text{-ATP}$, 5 mM MgSO_4 , 10 mM Mes, 5 mM Na-azide, 5 mM phosphoenolpyruvate, pH 6.25 (KOH), and rabbit muscle pyruvate kinase (NH₄SO₄) (21 $\mu\text{g/ml}$). The assay was carried out at 30°C for 10 min and was terminated by the addition of 6% trichloroacetic acid (w/v). Inorganic phosphate was determined by the method of Fiske and Subbarow (14).

Treatment with sulphydryl reagents. The H^+ -ATPase was suspended in 50 mM Hepes, pH 7.5, 1 mM MgSO_4 (0.3–0.6 mg protein/ml) and preincubated at 30°C for 5 min. The inhibition reaction was initiated by the addition of NEM or MMTS (from a fresh stock solution in distilled water). Aliquots were removed at the indicated times and diluted 50-fold into the ATPase assay mixture. When prelabeling with MMTS, the enzyme was incubated with 5 mM MMTS for 40 min at 30°C and passed through a spin column containing Sephadex G-50 (15).

Effect of Mg^{2+} or Mg-ADP. The enzyme (0.6 mg protein/ml) was suspended in 50 mM Hepes, pH 7.5, and the indicated concentrations of Mg-ADP or MgSO_4 . To avoid interference by sodium due to the added ligand (e.g., Mg-ADP-Na), the Na^+ concentration was adjusted to 100 mM. The enzyme was preincubated at 30°C for 5 min, and the SH reagent was added.

Effect of pH. The H^+ -ATPase (0.6 mg protein/ml) was incubated in 50 mM buffer (at the indicated pH), 1 mM MgSO_4 at 30°C for 2 min. The inhibition reaction was started with the indicated concentration of NEM. Activity was assayed as described above.

Labeling of H^+ -ATPase with ^{14}C -NEM. The ATPase (0.6 mg protein/ml) was incubated at 30°C in 50 mM Hepes, pH 7.5, 1 mM MgSO_4 in the presence or absence of 10 mM Mg-ADP. The inhibition reaction was initiated by adding 360 μM ^{14}C -NEM (39 mCi/mmol). At the indicated times, aliquots were used to determine the ATPase activity, and the rest of the reaction mixture (620 μl) was diluted in 3 ml 50 mM Hepes, pH 7.5, 50 mM dithiothreitol. The protein was recovered by centrifugation at 100,000g for 1 h, at 4°C, and resuspended in a small volume of 1% SDS, 50 mM DTT. The preparation was subjected to SDS-PAGE in the Laemmli system (16). The protein associated to the ATPase band was measured according to Ball (17). Briefly, the bands were cut and incubated for 24 h at 37°C in 1 ml 3% SDS, 50% isopropanol. The eluted Coomassie was read at 595 nm. In parallel, a standard curve with bovine serum albumin was prepared under the same experimental conditions. To measure the radioactivity associated with the ATPase, the bands were cut, transferred to a glass vial, and incubated at 80°C with 1 ml 30% H_2O_2 until the bands were dissolved. Radioactivity was measured in 10 ml scintillation liquid. For total labeling with ^{14}C -NEM, the H^+ -ATPase was denatured with 1% SDS, incubated in the presence of 1 mM ^{14}C -NEM for 3 h at 30°C, and treated as described above.

RESULTS

NEM-mediated inhibition of H^+ ATPase. NEM mediated a time- and concentration-dependent inactivation of the H^+ -ATPase from *K. lactis* (Fig. 1A). Activity was markedly reduced during the first 6 min of incubation. With 0.5 mM NEM, activity fell to 40% of the control in 8 min, following pseudo-first-order kinetics. At higher concentrations, kinetics were linear only in the first minutes of incubation, followed by complete inactivation at longer times (data not shown). The plot of the initial rate constant of inactivation versus NEM concentration resulted in a linear relationship, consistent with a second-order reaction between the SH groups of the enzyme and NEM. From the slope of this

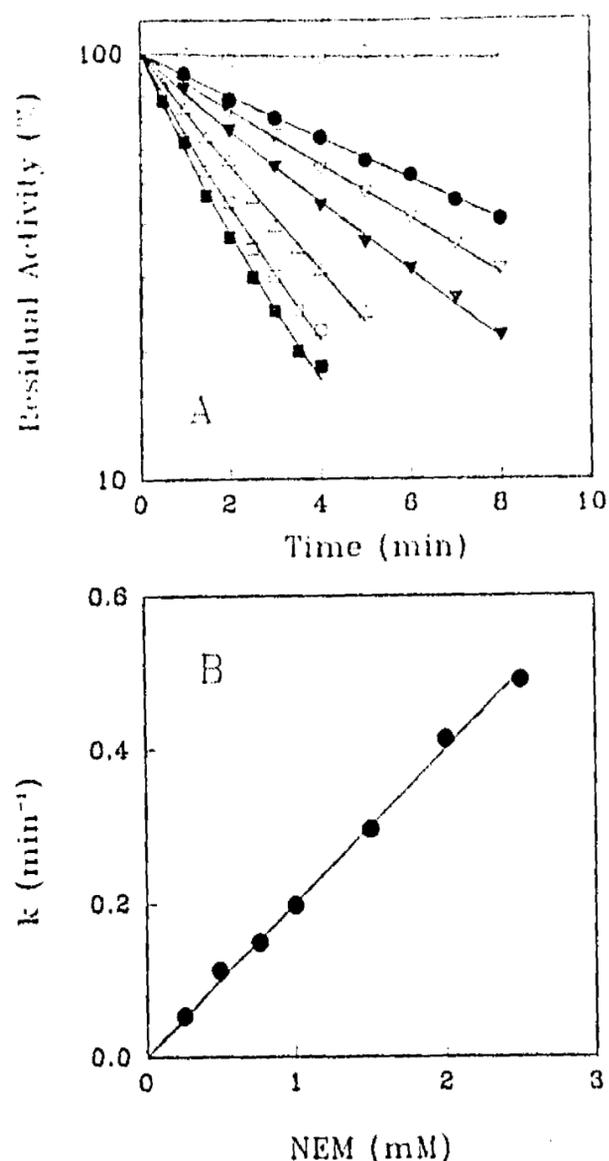


FIG. 1. Inactivation of the H⁺-ATPase by *N*-ethylmaleimide. (A) Time course of the inactivation of the H⁺-ATPase by NEM. The enzyme (0.6 mg/ml) was incubated as described under Materials and Methods at 30°C and in the presence of the following NEM concentrations: (○) 0, (●) 0.5 mM, (▽) 0.75 mM, (▼) 1.0 mM, (△) 1.5 mM, (□) 2.0 mM, and (■) 2.5 mM. (B) Dependence of the initial pseudo-first-order rate constant of inactivation on the concentration of NEM.

plot, a second-order rate constant of 200 M⁻¹ min⁻¹ was calculated (Fig. 1B).

Effect of Mg²⁺ on the inhibition of the H⁺-ATPase by NEM. Magnesium is required for the hydrolysis of ATP by the fungal H⁺-ATPases (18). In addition, Mg²⁺ can modulate the inhibition mediated by NEM in some H⁺-ATPases (19). Therefore, the effects of different concentrations of free Mg²⁺ on the inhibition of the H⁺-ATPase from *K. lactis* by NEM was examined. As shown in Fig. 2, the inhibition by NEM decreased in the presence of low concentrations of Mg²⁺, but increased above 1 mM Mg²⁺. If two sites for magnesium are assumed, one of these would have higher affinity for magnesium ($K_d = 190 \pm 69 \mu\text{M}$) than the other ($K_d = 4.9 \pm 1.2 \text{ mM}$).

Effect of pH on the NEM-mediated inhibition of the H⁺-ATPase. To determine the pH at which the NEM-mediated inhibition of the *K. lactis* H⁺-ATPase was half-maximal and acquire an idea of the pK_a of the groups involved, the pH of the medium was varied from 6.5 to 10 (Fig. 3). At pH 10 and in the absence of NEM, the H⁺-ATPase was rapidly inactivated; thus, the highest pH tested was 10.0. Inhibition by NEM was marginal at low pH, although it drastically increased above pH 7.0. This is in agreement with the suggestion that NEM reacts with the unprotonated lateral chain of cysteine by nucleophilic addition across the NEM double bond (20). The pH effects on the H⁺-ATPase were described by

$$k = \frac{K_a k^*}{K_a + [\text{H}^+]}, \quad [1]$$

where k^* is the pH-independent second-order rate constant of inactivation and K_a the acid dissociation constant. This equation was deduced from a model in which the inhibitor reacts with a single, deprotonated group of the enzyme (or several groups with the same pK_a) leading to inhibition of the activity. This model seemed to apply only when the experimental pH range used was from 6.5 to 8.5; here a pK_a of 9.04 ± 0.07 and a $k = 4.38 \pm 0.55$ were estimated and the experimental points showed a good fit with the theoretical line (Fig. 3, inset). When inactivation was measured at pH 9.0, 9.5, or 10.0, the pK_a varied depending on the pH: when the upper pH was 9.0, the calculated parameters were

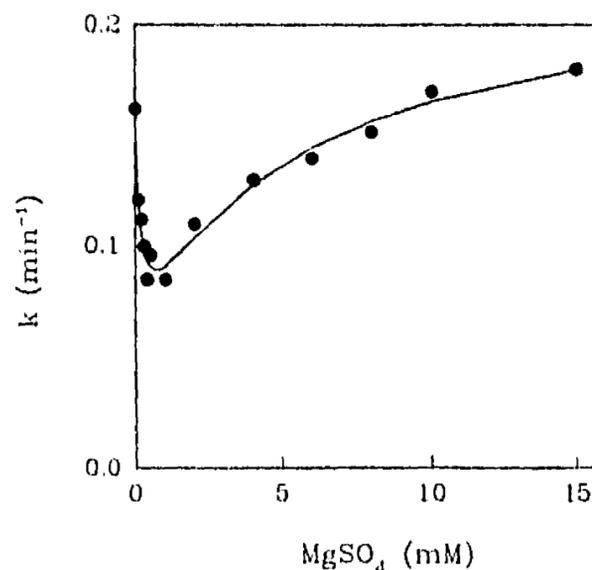


FIG. 2. Effect of Mg²⁺ on the inhibition of the H⁺-ATPase by NEM. The enzyme (0.6 mg/ml) was incubated at 30°C and pH 7.5 in the presence of different concentrations of MgSO₄ (0–15 mM). The inhibition reaction was started by the addition of 1 mM NEM and aliquots were withdrawn for ATPase assay. The plot shows the dependence of the pseudo-first-order rate constant of inactivation on the concentration of Mg.

pK_a of 11.45 ± 34.5 and $k = 1385 \pm 108,400$; when the pH range included pH 9.5 as the upper limit, the results were pK_a 11.69 ± 5.2 and $k = 2476 \pm 27,820$. When the selected range was pH 6.5 to 10.0, pK_a was 12.34 ± 14.6 . When using the data from pH 9.0 and higher, we observed large standard deviations and a continuous overestimation of k by the theoretical curve, resulting in a poor fit to the experimental points (Fig. 3, inset). The results suggest that at pH 9.0 and higher, diverse groups are becoming deprotonated and reactive to NEM, thus complicating the reaction. In contrast, when the range of pH 6.5 to 8.5 was used, the theoretical-experimental fit was very good while the deviations observed were minimal. Therefore, the predicted pK_a of 9.02 for the groups reacting at pH 7.5 is probably accurate.

Protection by Mg-ADP against the NEM-mediated inhibition of the H^+ -ATPase. In many enzymes, the presence of physiological ligands can greatly affect the rate of the NEM-mediated inactivation (9, 21, 22). In the H^+ -ATPase from *K. lactis*, the competitive inhibitor Mg-ADP was selected to explore whether ligand binding protects against NEM inhibition. The binding of the ligand to the enzyme decreased the rate of inactivation (Fig. 4A). However, the enzyme was only partially protected, even when the concentration of Mg-ADP was

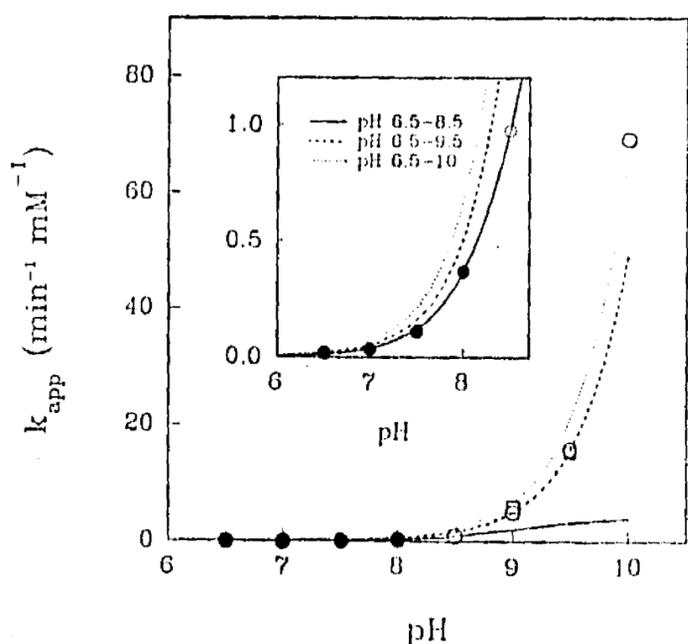


FIG. 3. Effect of pH on the inhibition of the H^+ -ATPase by NEM. The enzyme (0.6 mg/ml) was incubated at 30°C at different pH levels in the presence of 1 mM $MgSO_4$ and different concentrations of NEM depending on the pH value. The buffer was always 50 mM as follows: HEPES was used for pH levels ranging from 6.5 to 8.0 (●); AMPSO for pH levels ranging from 8.5 to 10.0 (○); and TAPS for pH levels 9.0 and 9.5 (□). The titration curves show the theoretical dependence of the second-order rate constant of inactivation as a function of pH (Eq. (1)) using the pH range indicated: (—) 6.5 to 8.5, (---) 6.5 to 9.5, and (···) 6.5 to 10.0. The inset presents a magnification of the plot in the range 6.5 to 8.5 to show fit of experimental points to each curve.

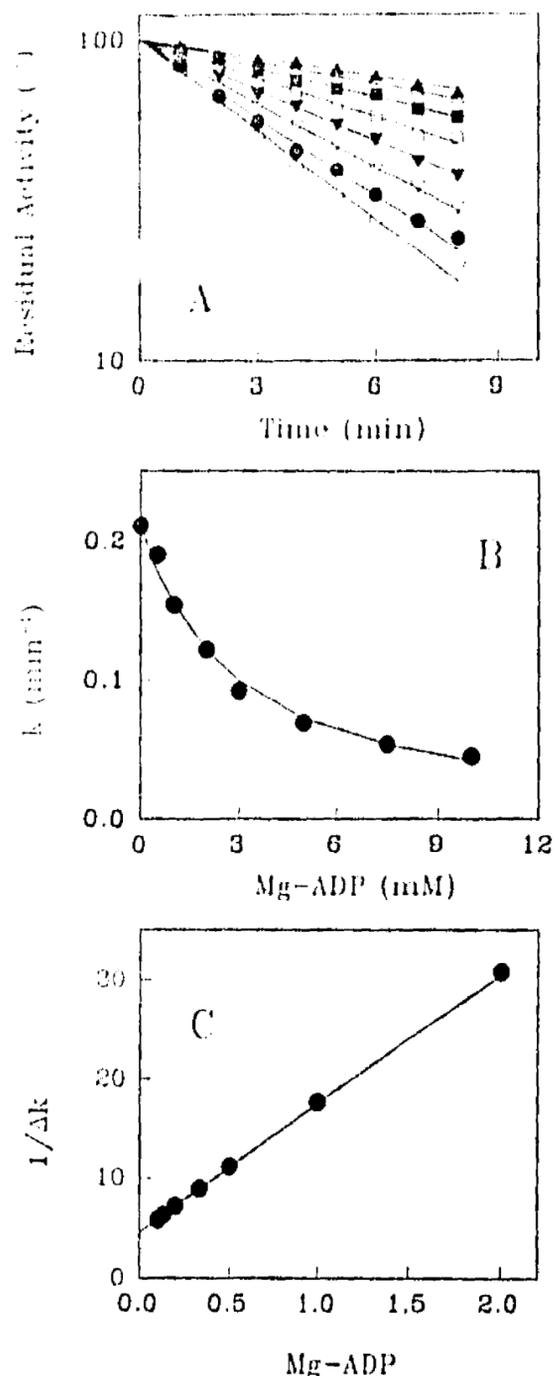


FIG. 4. Effect of Mg-ADP on the inhibition of the ATPase by NEM. The ATPase was incubated at 30°C and pH 7.5 at a protein concentration of 0.6 mg/ml, with 1 mM NEM and 100 mM Na^+ , in the presence Mg-ADP. (A) Time course of the inhibition at the following concentrations of Mg-ADP: (○) 0, (●) 0.5 mM, (▽) 1.0 mM, (▼) 2.0 mM, (□) 3.0 mM, (■) 5.0 mM, (△) 7.5 mM, and (▲) 10.0 mM. (B) The difference between the pseudo-first-order rate constant in the absence and presence of Mg-ADP is plotted against the Mg-ADP concentration. (C) Double reciprocal of the data in B.

raised to 20 mM. Figure 4B illustrates the partial protection elicited by the nucleotide. The data were fitted to

$$k = \frac{k_1 K_d + k_2 [Mg-ADP]}{K_d + [Mg-ADP]} \quad [2]$$

derived from a model of partial protection (23). The K_d for ADP was 2.9 ± 0.4 mM. The pseudo-first-order rate constant of inactivation at saturating concentrations of

Mg-ADP (k_2) was $0.017 \pm 0.005 \text{ min}^{-1}$, and the rate constant of inactivation in the absence of ligand (k_1) was 0.211 min^{-1} . The above equation can be arranged into a straight line as

$$\frac{1}{\Delta k} = \frac{1}{(k_1 - k_2)} + \frac{K_d}{(k_1 - k_2)} * \frac{1}{[\text{Mg-ADP}]}, \quad [3]$$

where Δk is the difference between the rate constants in the absence and in the presence of Mg-ADP at each Mg-ADP concentration tested (23). The plot of $1/\Delta k$ versus $1/[\text{Mg-ADP}]$ was a straight line, consistent with Eq. [3] (Fig. 4C).

Interaction of MMTS with the H⁺-ATPase and subsequent addition of NEM. The results described above indicate that some sulfhydryl groups contained in the H⁺-ATPase from *K. lactis* reacted with NEM, resulting in loss of activity and suggesting that these residues might be essential; alternatively, the inhibition by the bulky NEM could be due to steric hindrance. To test this, a small sulfhydryl reagent was examined: MMTS which is highly specific for cysteines (24). No appreciable loss of activity was detected when MMTS reacted with the H⁺-ATPase. In addition, the MMTS-modified ATPase was fully protected against inhibition by NEM, indicating that MMTS reacted efficiently with the same sulfhydryl groups as NEM (results not shown).

Stoichiometry of the reaction of NEM with the cysteines in the H⁺-ATPase. The number of cysteines involved in the NEM-mediated inhibition of the H⁺-ATPase was determined by labeling the protein with ¹⁴C-NEM, either in the presence or absence of Mg-ADP (Fig. 5A). The ATPase was partially protected by Mg-ADP, with a pseudo-first-order rate constant of inactivation of 0.017 min^{-1} in the presence of Mg-ADP and 0.082 min^{-1} in its absence. The inhibition of the ATPase departed from pseudo-first-order kinetics at the longer times tested and above 80–90% inhibition. In addition, the gradual incorporation of NEM into the native H⁺-ATPase was studied (Fig. 5B). The binding parameters characterizing each curve were obtained by fitting the data to

$$A = A^{\infty} * (1 - e^{-kt}), \quad [4]$$

where A is ¹⁴C-NEM bound/H⁺-ATPase at time t , A^{∞} is ¹⁴C-NEM bound/H⁺-ATPase at infinite time, and k is the rate constant of incorporation. When the ATPase was incubated with NEM in the absence of Mg-ADP, 3.15 cysteine residues/ATPase were modified with $k = 0.048 \text{ min}^{-1}$. In the presence of Mg-ADP, only 1.8 cys/ATPase ($k = 0.054 \text{ min}^{-1}$) were labeled (Fig. 5B).

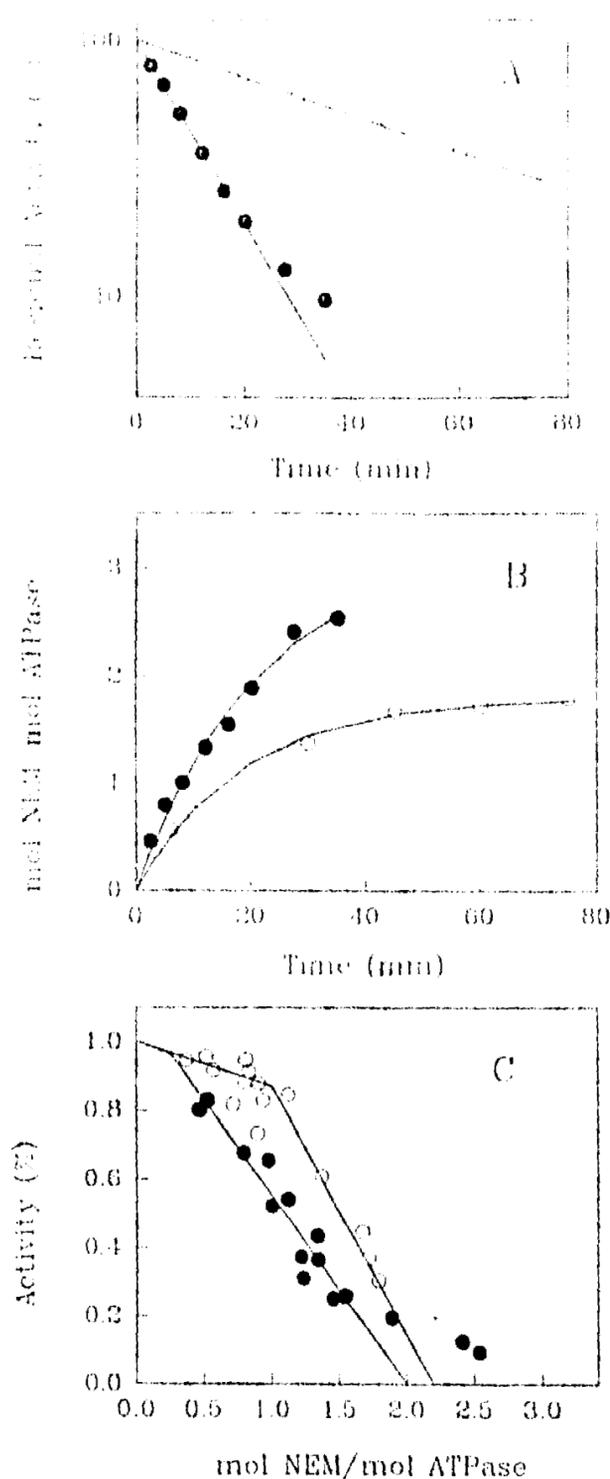


FIG. 5. ¹⁴C-NEM labeling. Effects on the activity of the *Kluyveromyces lactis* H⁺-ATPase in the absence and presence of Mg-ADP. The enzyme (0.6 mg/ml) was incubated at 30°C and pH 7.5, in 1 mM MgSO₄, 100 mM Na⁺, and 1 mM ¹⁴C-NEM in the absence (●) and presence (○) of 10 mM Mg-ADP. (A) Time course of the inhibition of the ATPase activity by NEM. (B) Time course of the incorporation of NEM into the ATPase. (C) Relationship between the activity and the incorporation of NEM into the ATPase.

The plot of inhibition of H⁺-ATPase versus incorporation of NEM (Fig. 5C) showed that in the absence of Mg-ADP, extrapolation of the linear region of the plot to the x axis suggested that two of the three cysteines labeled by NEM were involved in the inhibition of H⁺-ATPase. In the presence of Mg-ADP, incorporation of the first NEM elicited only a slight inhibition (10 to 20%), while up to 80% inhibition was attained after

FALLA DE ORIGEN

2. Swinkels, B. W., van Ooyen, A. J. J., and Bonekamp, F. J. (1993) *Antonie van Leeuwenhoek* **64**, 187-201.
3. Johnston, J. R., Contopoulou, C. R., and Mortimer, R. K. (1988) *Yeast* **4**, 191-198.
4. Sor, F., and Fukuhara, H. (1989) *Yeast* **5**, 1-10.
5. Goffeau, A., and Slayman, C. W. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **639**, 197-225.
6. Miranda, M., Ramirez, J., Peña, A., and Coria, A. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 2360-2367.
7. Wach, A., Slessor, A., and Goffeau, A. (1992) *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 309-317.
8. Hager, K. M., Mandala, S. M., Davenport, J. W., Speicher, D. W., Benz, E. J., and Slayman, C. W. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 7693-7697.
9. Brooker, R. J., and Slayman, C. W. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 12051-12055.
10. Brooker, R. J., and Slayman, C. W. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 222-226.
11. Bowman, E. J., Bowman, B. J., and Slayman, C. W. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 12336-12342.
12. Bowman, B. J., Blasco, F., and Slayman, C. W. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 12343-12349.
13. Bensadoun, A., and Weinstein, D. (1976) *Anal. Biochem.* **70**, 241-250.
14. Fiske, C. H., and Subbarow, Y. (1925) *J. Biol. Chem.* **66**, 375-400.
15. Penefsky, H. S. (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 2891-2899.
16. Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685.
17. Ball, E. H. (1986) *Anal. Biochem.* **155**, 23-27.
18. Amory, A., Goffeau, A., McIntosh, D., and Boyer, P. D. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 12509-12516.
19. Brooker, R. J., and Slayman, C. W. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 8833-8838.
20. Lundbald, R. L. (1991) in *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2nd ed., chap. 6, pp. 59-93, CRC Press, Boca Raton, FL.
21. Kantz, F. B., and Sussman, M. R. (1987) *Plant. Physiol.* **83**, 977-981.
22. Winslow, J. W. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 9522-9531.
23. Renosto, F., Seubert, P. A., Knudson, P., and Segel, I. H. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 1535-1544.
24. Smith, D. J., Maggio, E. T., and Kenyon, G. L. (1975) *Biochemistry* **14**, 766-771.
25. Cantor, Ch. R., and Schimmel, P. R. (1980) in *Biophysical Chemistry Part I. The Conformation of Biological Molecules*, Chap. 2, pp. 41-153, Freeman, NY.
26. Bowman, B. J. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 13002-13007.
27. Pardo, J. P., and Slayman, C. W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 9373-9379.
28. Taylor, W. R., and Green, N. M. (1989) *Eur. J. Biochem.* **179**, 241-248.
29. Ghislain, M., Schlessor, A., and Goffeau, A. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 17549-17555.
30. Serrano, R., and Portillo, F. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1018**, 195-199.