

2011

71179

71179

MFN:
Clasif:
T-741

71179



Trabajo de Tesis Doctoral presentado por Noelia Edith Monesterolo para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Director de Tesis Doctoral:

Dr. Cesar Horacio Casale

Miembros del jurado de Tesis:

Dra. María Cristina Miras

Dr. Hugo Pedro Adamo

Dr. Carlos Enrique Argaraña

Río Cuarto, Noviembre de 2011

*A mi esposo, Marcelo*

*y a mis padres*

Quiero agradecer de corazón a todas las personas que me ayudaron, apoyaron, confiaron y estuvieron a mi lado a lo largo de estos años, para que pueda alcanzar esta encantadora realidad.... Muchísimas gracias a todos.

Especialmente:

A Cesar por enseñarme tantas cosas, por su generosidad, por darme aliento a seguir adelante, por aconsejarme no solo en el trabajo sino como amigo y por brindarme un lugar en su laboratorio de tubulina!!! Gracias a Gaby y Vero por enseñarme, por escucharme y ayudarme un millón de veces, gracias a los tres por compartir un montón de hermosos momentos...

A Carlos y su grupo (Guille, Mauge, Gastón y Kio) por toda su enseñanza y paciencia...

A mi Amiga del alma "planti" Rafa AKT y a su familia, por ayudarme en todo, por aconsejarme y por compartir conmigo un millón de momentos importantes.

A Alexis mi compañero de experimentos y viajes!!! Muchísimas gracias por tu ayuda y a mis compañeros de laboratorio Sofí, Ayi y Juan por compartir con alegría y cariño el día a día.

A los jurados de esta tesis, Cristina, Carlos y Hugo por su valioso aporte en este trabajo.

A mi alma gemela y mi luz Marcelo por estar siempre a mi lado, porque junto con Azul y Angie son mi refugio, mi hogar y mi cielo azul infinito.

A mis padres, hermanos, cuñados, mis tías, mis primas, mi abu, Mirta y Alberto, por ser piedra fundamental en mi vida y a mis tres sobrinos porque con una sonrisa me regalan el sol.

A mi amiga del alma Loli por compartir muchísimas vivencias día a día y aguantarse cada raye con una sonrisa.

A mis Amigas Romi, Lauri, Pepa, Ivi, Vero y Naty, por acompañarme y compartir tantas charlas y momento inolvidables que guardo como tesoro en mi corazón.

A Cele, Buba, Marinita y Laury por su ayuda y afecto durante estos años.

A mis compañeras de docencia, Naty, Vero, Lore y Dany porque gracias a las comisiones conocí a estas hermosas personas que me ayudaron y me dieron su cariño.

A Alejandro por brindarme tanta alegría y emoción

A Miguel Bueno, Leo y Pablo por ayudarme incontables veces con las ratas! y a Mariela Wolke por su apoyo.

Al Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas: CONICET por financiar esta tesis.

A todas las personas del departamento de Biología Molecular y Ciencias Naturales que de diferente manera han aportado en este trabajo y han hecho que estos años sean realmente hermosos.

¡Gracias de corazón a todos!

<i>Índice</i>	1
<i>Abreviaturas</i>	4
<b>1. Resumen</b>	6
<b>2. Objetivos Generales</b>	10
<b>3. Introducción</b>	
3.1. El citoesqueleto	12
3.1.1. Filamentos de Actina	12
3.1.2 Filamentos Intermedios	13
3.1.3 Microtúbulos	13
3.2 Tubulina	17
3.2.1 Modificaciones postraduccionales	18
3.3 Calcio en la célula	20
3.4 Membranas celulares	21
3.4.1 Función de la membrana plasmática	23
3.4.2 Ensamblaje de una membrana	24
3.5 ATPasas de membrana	26
3.6 P-ATPasas de membrana plasmática	27
3.6.1 Ca <sup>2+</sup> ATPasa	27
3.6.2 H <sup>+</sup> ATPasas	34
3.6.3 Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPasa	35
3.7 Interacción de las P-ATPasas con tubulina	36
3.8 Efecto de los lípidos sobre la funcionalidad de PMCA y tubulina	37
<b>4. Procedimientos Experimentales</b>	
4.1 Materiales	41
4.2 Cultivo Celular	41
4.3 Preparación de eritrocitos	41
4.4 Obtención de Membrana Plasmática de eritrocitos	41

4.5	Obtención de Membrana de eritrocitos de cerdo	42
4.6	Obtención de Membrana Plasmática de vesícula de cerebro de rata	42
4.7	Purificación de PMCA	43
4.8	Medición de la actividad PMCA	
4.8.1	Captación de $^{45}\text{Ca}^{2+}$	44
4.8.2	Hidrolisis de [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP	44
4.8.3	Sistema enzimático acoplado	45
4.8.4	Determinación de la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ incorporado en PMVs por Fura 2 AM	46
4.8.5	Determinación de la concentración de $\text{Ca}^{2+}$ en células vivas	47
4.9	Inmunofluorescencia	48
4.10	Preparación de anticuerpos unidos a sefarsa	48
4.11	Procedimiento de inmunoprecipitación	48
4.12	Obtención y determinación del complejo tubulina acetilada/PMCA	49
4.13	Electroforesis e inmunoblot	
4.13.1	Electroforesis	49
4.13.2	Tinción de geles	50
4.13.3	Western blot	50
4.14	Obtención de tubulina	51
4.15	Obtención y medición de actividad de PLC	51
4.16	Determinación de proteínas	52
4.17	Análisis estadístico	52
<b>5</b>	<b>Resultados</b>	
5.1	Presencia del complejo tubulina acetilada/PMCA en PMVs	54
5.2	Efecto de etanol y calmodulina sobre el complejo tubulina acet/PMCA	56
5.3	Efecto de calmodulina sobre la actividad de PMCA y el complejo tubulina acetilada/PMCA luego del tratamiento con etanol	61
5.4	Efecto de tubulina acetilada exógena sobre la actividad PMCA en PMVs	63

5.5	Efecto de drogas que interaccionan con tubulina sobre la actividad de PMCA y la formación del complejo tubulina acetilada/PMCA	65
5.6	Efecto del tratamiento con etanol sobre la actividad PMCA en células	
5.6.1	Células Cos	67
5.6.2	Eritrocitos	69
5.6.3	Células CAD	70
5.7	Influencia de los lípidos sobre la regulación producida por tubulina sobre la actividad de PMCA	73
5.8	Purificación de PMCA	73
5.9	Actividad de PMCA purificada en diferentes reconstituciones de lípidos	76
5.10	Efecto del entorno lipídico sobre la interacción tubulina acet/PMCA y la actividad enzimática	
5.10.1	PMCA isoforma 4 de humanos (hPMCA4xb)	79
5.10.2	PMCA purificada a partir de PMVs	80
5.11	Efecto de la generación in situ de DAG en PMVs sobre la actividad de PMCA y transporte de Ca <sup>2+</sup>	86
<b>6. Conclusión y Discusión</b>		
6.1	Efecto de la tubulina acet. sobre la actividad PMCA	94
6.2	La tubulina acetilada y PMCA forman parte de un mismo complejo	95
6.3	La tubulina acetilada regula la actividad PMCA in vitro e in vivo	97
6.4	El entorno lipídico del complejo tubulina/PMCA afecta la regulación enzimática	100
6.5	Estado actual del conocimiento sobre las interacciones tubulina/P-ATPasa	102
<b>7. Anexo</b>		
7.1	Medición de la actividad Ca <sup>2+</sup> ATPasa con fura 2AM; buffers	106
<b>8. Referencias</b>		
		112



**Abreviaturas**

<i>A23187</i>	<i>Calcimycin</i>
<i>ATP</i>	<i>Adenosina 5' Trifosfato</i>
<i>BE</i>	<i>Extracto de cerebro bovino</i>
<i>BSA</i>	<i>Albúmina sérica bovina</i>
<i>C<sub>12</sub>E<sub>10</sub></i>	<i>Lauril éter de polioxietileno</i>
<i>COL</i>	<i>Colesterol</i>
<i>DAG</i>	<i>Diacilglicerol</i>
<i>DMEM</i>	<i>Dulbeco's modified Eagle's medium</i>
<i>DTT</i>	<i>Ditiotreitol</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ácido etilendiaminotetraacético</i>
<i>EGTA</i>	<i>Etilenglicol-bis(β-aminoetileter)-ácido tetraacetico</i>
<i>GTP</i>	<i>Guanosin trifosfato</i>
<i>HAT</i>	<i>Tubulina Acetilada Hidrofóbica</i>
<i>HDAC6</i>	<i>Histona deacetilasa 6</i>
<i>HEPES</i>	<i>N-[2-hidroxietilpiperazina-N-] etanoácido sulfónico</i>
<i>IP<sub>3</sub></i>	<i>Inositol trifosfato</i>
<i>MAPs</i>	<i>Proteínas Asociadas a Microtúbulos</i>
<i>MES</i>	<i>(2-N-morfolino)-etanoácido sulfónico</i>
<i>MTs</i>	<i>Microtúbulos</i>
<i>NADH</i>	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido reducido</i>
<i>NKA</i>	<i>Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa</i>
<i>NXC</i>	<i>Intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup></i>
<i>PA</i>	<i>Ácido fosfatídico</i>

<i>PBS</i>	<i>Buffer Fosfato Salino</i>
<i>PC</i>	<i>Fosfatidil colina</i>
<i>PEP</i>	<i>Fosfoenolpiruvato</i>
<i>PIP<sub>2</sub></i>	<i>Fosfatidilinositol 4,5 bifosfato</i>
<i>PK</i>	<i>Piruvato kinasa</i>
<i>PLC</i>	<i>Fosfolipasa C</i>
<i>PMCA</i>	<i>Calcio-ATPasa de membrana plasmática</i>
<i>PMSF</i>	<i>Fluoruro de fenilmetilsulfonilo</i>
<i>p-NPPC</i>	<i>p-nitrofenilfosforilcolina</i>
<i>SDS</i>	<i>Dodecil Sulfato de Sodio</i>
<i>SDS-PAGE</i>	<i>Electroforesis en Gel de Poliacrilamida</i>
<i>SERCA</i>	<i>Ca<sup>2+</sup> ATPasa de Retículo Sarcoendoplásmico</i>
<i>SPCA</i>	<i>Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de Vías Secretoras (SPCA).</i>
<i>SPM</i>	<i>Esfingomielina</i>
<i>TBS</i>	<i>Tris-Solución amortiguadora salina</i>
<i>TCPasa</i>	<i>Tubulina carboxipeptidasa</i>
<i>TRIS</i>	<i>2-amino-2-hidroximetil-1.3 propanodiol</i>
<i>TRITÓN X-114</i>	<i>Octilfenoxipolietoxietanol</i>

## *1. Resumen*

PMCA expulsa el calcio desde el interior celular, esta proteína es una de las principales enzimas involucradas en la mantención de las concentraciones de este ion en la célula. El calcio es un segundo mensajero temprano que desempeña un papel clave en procesos fisiológicos incluyendo la proliferación, diferenciación y apoptosis. Nuestros estudios muestran que PMCA se asocia parcialmente a tubulina acetilada, modificando su actividad enzimática. Varios puntos refuerzan la idea de que tubulina acetilada y PMCA forman un complejo (a) PMCA y tubulina acetilada están presentes en las membranas que aislamos (b) Cuando los PMVs son solubilizados en detergente y particionados en Tritón X-114, tanto PMCA como tubulina acetilada se encuentran en la fase detergente, mientras que tubulina acetilada es un componente hidrofílico que particionaría en la fase acuosa (c) Cuando las membranas se solubilizaron con Tritón X-100 y subsecuentemente se inmunoprecipitó con 6-11B-1 o 5F10 unido a las perlas de sefarosa, PMCA precipita junto con tubulina acetilada (d) Cuando las membranas son depletadas de tubulina acetilada (por tratamiento con etanol) y solubilizadas con detergente e inmunoprecipitadas con anti-tubulina acetilada unido a perlas de sefarosa, PMCA no precipita, sin embargo cuando las membranas han sido previamente incubadas con tubulina acetilada purificada exógena, PMCA precipita (e) Cuando preparaciones que contenían PMCA purificada y tubulina purificada fueron particionadas con Tritón X-114, ambas proteínas fueron encontradas en la fase detergente.

La formación del complejo tubulina acetilada/PMCA modifica a la actividad de la enzima. Cuando el complejo tubulina acetilada/PMCA es disociado, tubulina no se encuentra en la fase detergente, sino en la fase acuosa de la partición con Tritón X-114. La disociación del complejo (disminución de tubulina acetilada en la fase detergente) por etanol ó calmodulina resulta en una estimulación de PMCA lo que indica que la interacción de tubulina con PMCA inhibe la actividad de PMCA en PMVs y que el comportamiento hidrofóbico de tubulina se debe a su asociación con un componente hidrofóbico (PMCA o un complejo que contiene a PMCA). La disociación del complejo tubulina/PMCA es confirmada por experimentos de inmunoprecipitación. Nuestros resultados demuestran que tubulina acetilada puede interaccionar con PMCA y de esta manera regular la actividad de PMCA.

Se ha demostrado previamente que el isotipo acetilado de tubulina es indispensable para la interacción con la bomba sodio (Santander y col., 2006). Aquí, hemos demostrado que el mismo isotipo de tubulina es necesario para la interacción con la bomba calcio y que la isoforma PMCA4 participa en la formación de complejo. Es posible que tubulina acetilada interaccione y regule la actividad de todas las P-ATPasas.

Nuestros resultados muestran que la estabilidad de los microtúbulos afecta a la actividad de PMCA, ya que ante el agregado de taxol la actividad de PMCA se ve incrementada, y la formación de complejo tubulina acetilada/PMCA disminuido. Lo mencionado anteriormente refuerza la idea postulada que ante la disociación del complejo tubulina acetilada/PMCA la actividad se ve estimulada y cuando hay mayor formación del complejo la actividad de PMCA se ve disminuida, esto también fue observado in vivo con la utilización de células en cultivo. En efecto en células COS, CAD y eritrocitos la concentración de calcio intracelular disminuyó por acción de PMCA ante el agregado de etanol acompañado por una disminución en la formación del complejo tubulina acetilada/PMCA.

Otros experimentos demuestran que los lípidos que rodean al complejo influyen sobre el efecto que causa la tubulina acetilada sobre la actividad de PMCA. Cuando la enzima purificada a partir de PMVs es reconstituida en lípidos ácidos la formación del complejo tubulina/PMCA estimula la actividad enzimática, mientras que si la reconstitución de PMCA se realiza en lípidos neutros el efecto que provoca la tubulina es dependiente de la concentración de tubulina, así a bajas concentraciones de tubulina purificada observamos una estimulación de la actividad, mientras que a altas concentraciones de tubulina en estas preparaciones no se observan cambios en la actividad enzimática. En otros experimentos observamos que cuando los PMVs son tratados con tubulina purificada exógena la actividad de PMCA resulta inhibida, pero si en los PMVs aumenta la cantidad de DAG por acción de PLC, la inhibición producida por tubulina acetilada exógena es revertida.

En conjunto estos estudios nos permiten concluir que PMCA y tubulina acetilada forman un complejo y que la actividad de PMCA es regulada por tubulina acetilada, esta regulación es dependiente de la concentración de tubulina y la composición lipídica que rodea al complejo.

### *Summary*

Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (PMCA) is an enzyme responsible for transport of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) from the inside to the outside of all eukaryotic cells, and a crucial component of the pump mechanism responsible for maintenance of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration.  $\text{Ca}^{2+}$  is a second messenger involved in early stages of many physiological processes, including proliferation, differentiation, and apoptosis. Many findings in this laboratory clearly indicate that partially acetylated tubulin (abbreviated hereafter as "AcTub") forms a complex with PMCA, and there by alters its enzyme activity; *e.g.*: (a) PMCA and AcTub are both present in isolated membranes; (b) When plasma membrane-derived vesicles (PMVs) are solubilized in detergent Triton X-114 and subjected to phase partition, PMCA and AcTub are both found in detergent phase, whereas acetylated tubulin is a component hydrophilic that partitions in the aqueous phase; (c) When membranes are solubilized with Triton X-100 and then immunoprecipitated with anti-AcTub mAb 6-11B-1 and anti-PMCA mAb 5F10 bound to Sepharose beads, PMCA and AcTub are co-precipitated; (d) When membranes are depleted of AcTub by treatment with ethanol, solubilized with detergent, and immunoprecipitated with mAb 6-11B-1, PMCA is not precipitated, whereas when membranes are pre-incubated with purified AcTub PMCA is precipitated; (e) When preparations containing purified AcTub and purified PMCA are partitioned with Triton X-114, both proteins are found in detergent phase.

Formation of AcTub/ PMCA complex modifies activity of the enzyme. When the complex is solubilized with Triton X-114 and partitioned, AcTub is found mainly in detergent phase. Dissociation of the complex by calmodulin or ethanol results in decrease in AcTub in detergent phase, indicating that interaction of AcTub with PMCA inhibits the enzyme activity in PMVs, and that this interaction takes place between hydrophobic AcTub and another hydrophobic component (PMCA, or some complex containing PMCA). Dissociation of the AcTub/ PMCA complex was confirmed by immunoprecipitation experiments. These findings clearly demonstrate that AcTub can interact with PMCA and thereby regulate the enzyme activity.

In a previous study (Santander et al., 2006), we found that the acetylated isotype of tubulin is essential for interaction with the sodium ( $\text{Na}^+$ ) pump. We now show that the acetylated isotype is also required for interaction with the  $\text{Ca}^{2+}$  pump, and the

isoform PMCA4 is involved in complex formation. It is possible that AcTub interacts with and regulates the activity of all P-ATPases.

Treatment with taxol (a drug which stabilizes microtubules) increased PMCA activity and reduced AcTub/ PMCA complex formation, indicating that enzyme activity depends on microtubule stability.

The above reinforces the idea postulated that in the dissociation of acetylated tubulin/PMCA activity is stimulated and when there are more complex formation PMCA activity is diminished, this was also observed *in vivo* using cultured COS cells, CAD cells, and erythrocytes, in which AcTub membrane depletion by ethanol treatment resulted in stimulated PMCA activity, decrease intracellular  $Ca^{2+}$  concentration, and reduced AcTub/PMCA complex formation.

The composition of lipids surrounding the complex influences the effect of AcTub on PMCA activity. When PMCA purified from PMVs is reconstituted in the presence of acidic lipids, AcTub/ PMCA complex formation stimulates enzyme activity. When reconstitution of PMCA takes place in the presence of neutral lipids, the effect of purified AcTub depends on its concentration; low concentration stimulates enzyme activity, whereas high AcTub concentration has no effect on enzyme activity.

When PMVs were treated with exogenous purified AcTub, PMCA activity was inhibited. When the level of diacylglycerol (DAG) in PMVs was increased by treatment with phospholipase C (PLC), the inhibitory effect of exogenous AcTub on PMCA activity was reversed.

These findings, taken together, demonstrate that AcTub forms a complex with PMCA that the enzyme activity of PMCA is regulated by AcTub, and that such regulation is affected by AcTub concentration and by composition of lipids surrounding the complex.

## 2. *Objetivos generales*

En esta tesis doctoral se ha propuesto estudiar la interacción entre tubulina y PMCA y el efecto de esta interacción sobre la regulación de la actividad enzimática.

Los objetivos específicos planteados fueron:

- 1) Determinar si la tubulina interacciona con PMCA *in situ*. Se determinará si hay una interacción física entre tubulina y PMCA. Determinaremos la presencia del complejo tubulina/PMCA.
- 2) Trabajos previos de nuestro grupo de investigación demuestran que la tubulina acetilada inhibe la actividad de NKA, teniendo en cuenta que PMCA pertenece a la misma familia de P-ATPasas; se establecerá si tubulina acetilada causa inhibición sobre la actividad de PMCA y el comportamiento de diferentes efectores (calmodulina, y etanol) sobre la inhibición que produce tubulina en la actividad PMCA.
- 3) Los lípidos que rodean a PMCA afectan a su actividad enzimática, teniendo en cuenta que la tubulina acetilada regula la actividad de PMCA, nos propusimos estudiar si los lípidos que rodean a PMCA afectan a la regulación que ejerce la tubulina sobre la actividad  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa.

# *Introducción*



### 3.1 EL CITOESQUELETO

La célula en su camino evolutivo ha logrado la compartimentalización de sus actividades genéticas y metabólicas; uno de los compartimientos más relevantes por su tamaño y complejidad es el núcleo el cual, separado del citoplasma mediante una doble capa de membranas, contiene casi la totalidad del ADN celular. El espacio que rodea al núcleo es el citoplasma que contiene el citosol y las organelas, en este compartimiento se llevan a cabo las reacciones del metabolismo y la síntesis de proteínas. Dentro del citoplasma se encuentra una red tridimensional de filamentos que le proporcionan a la célula su arquitectura y dinamismo. Esta compleja red, denominada citoesqueleto, tiene funciones de soporte y transporte de organelas, está constituida principalmente por tres tipos de filamentos: filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos (Fig. 1). Cada tipo de filamento está compuesto por una proteína principal y una serie de proteínas asociadas, las cuales le proporcionan diversas propiedades características en cuanto a su estabilidad y dinamismo.

#### 3.1.1. FILAMENTOS DE ACTINA

Los filamentos proteicos de actina o microfilamentos son polímeros proteicos de 7-9 nm de diámetro formados principalmente por actina, esta proteína existe en dos estados, uno globular, denominado actina-G y otro en forma polimerizada constituyendo filamentos o actina-F. Cada hebra de actina está unida a una molécula de adenosín trifosfato (ATP) o de adenosín difosfato (ADP) asociada a su vez a un catión  $Mg^{2+}$ . De las distintas combinaciones posibles entre las formas de actina y el nucleótido, en la célula predominan la actina G-ATP y la actina F-ADP (Graceffa y col., 2003; Reisler, 1993).

Los microfilamentos sirven como apoyo a la membrana plasmática y por lo tanto determinan la forma de la célula. La formación de estas estructuras es un proceso dinámico y proporciona un andamiaje que le permite a la célula remodelarse rápidamente en respuesta a su entorno o a señales del organismo, por ejemplo, aumentando la superficie celular para la absorción o proporcionando soporte a la adhesión de las células para formar tejidos. Sobre este andamiaje se pueden anclar otras

enzimas y orgánulos como el cilio, haciendo posible una variedad de eventos celulares tales como la deformación de la membrana celular externa, lo que permite la ingestión celular o la citocinesis. Además, la red de actina puede producir movimiento, bien por ella misma o ayudada de motores moleculares, de ese modo contribuye a procesos como el transporte intracelular de vesículas y orgánulos, la contracción muscular, o la migración celular, importante en el desarrollo embrionario, reparación de heridas o invasividad del cáncer. La actina también se asocia a muchas otras proteínas, principalmente a la miosina, para formar estructuras que generan fuerzas de contracción (Alberts y col., 2004).

### 3.1.2. FILAMENTOS INTERMEDIOS

Los filamentos intermedios están formados por agrupaciones de proteínas fibrosas. Su nombre deriva de su diámetro, de 10 nm, menor que el de los microtúbulos, de 24 nm, pero mayor que el de los microfilamentos de actina, de 7 nm. Son ubicuos en las células animales. Están compuestos por proteínas fibrosas que se combinan en dímeros helicoidales y que se asocian para formar tetrámeros alargados llamados protofibrillas. Así, un filamento intermedio se conforma por cuatro protofibrillas. Son apolares y funcionan para mantener principalmente la fuerza de tensión celular y como soporte mecánico. Varían ampliamente en tamaño de un tipo celular a otro y en las diferentes especies. Tienen distinta composición proteica según la célula de donde procedan, por ejemplo, en las células epiteliales, están compuestos fundamentalmente por queratinas, láminas nucleares, que se sitúan bajo la envoltura nuclear, en células musculares están compuestos por vimentinas y desminas; en fibroblastos por neurofilamentos (Magendantz y col., 1985).

### 3.1.3 MICROTÚBULOS

Los microtúbulos (MTs) son estructuras subcelulares de aspecto filamentoso que se extienden por todo el citoplasma sin penetrar al núcleo (Hyanms y col., 1993). Estas estructuras son polímeros cilíndricos huecos de 24 nm de diámetro formados en un 85 % por subunidades de la proteína globular *tubulina* (Fig. 1), la cual es un heterodímero

formado por una subunidad  $\alpha$  y una subunidad  $\beta$  y el 15 % restante por proteínas accesorias denominadas proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (Solomon, 1980).

Para la formación de un microtúbulo la tubulina debe formar previamente protofilamentos lineales los cuales se forman con dímeros de tubulina unidos de manera cabeza-cola, es decir la subunidad  $\alpha$  de un dímero se une a la subunidad  $\beta$  del dímero de tubulina siguiente (Tilney y col., 1973).

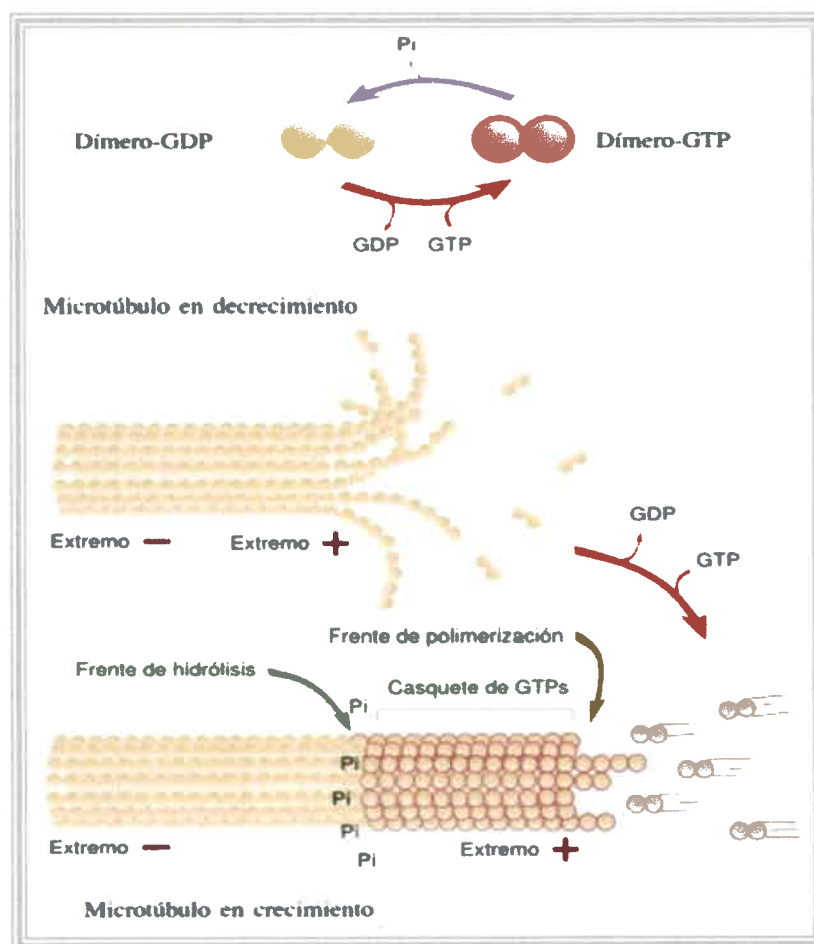


**Figura 1: Componentes de citoesqueleto.** Se observan los principales componentes del citoesqueleto: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos (www.biologiadelcélula.com.ar).

Los microtúbulos poseen un extremo denominado “+”, cuya velocidad de crecimiento por adición de tubulina es más rápida que el otro extremo denominado extremo “-”. Con respecto a la cinética de polimerización de la tubulina, se ha observado *in vitro* que la formación de microtúbulos es dependiente de la concentración crítica de tubulina ( $C_c$ ) presente en el medio. Por encima de la  $C_c$  la tubulina se

ensambla y por debajo de dicha concentración se desensambla. Tanto el ensamble como el desensamble, tienen lugar preferentemente sobre el extremo “+” de los microtúbulos.

El heterodímero de tubulina presenta dos sitios de unión a moléculas de Guanosín trifosfato (GTP), un sitio de unión se encuentra en la subunidad  $\alpha$  donde el GTP no es hidrolizable, mientras que el segundo sitio, localizado en la  $\beta$  tubulina, une GTP reversiblemente que puede ser hidrolizado a GDP luego que el dímero de tubulina se adiciona a los extremos de un microtúbulo en crecimiento.

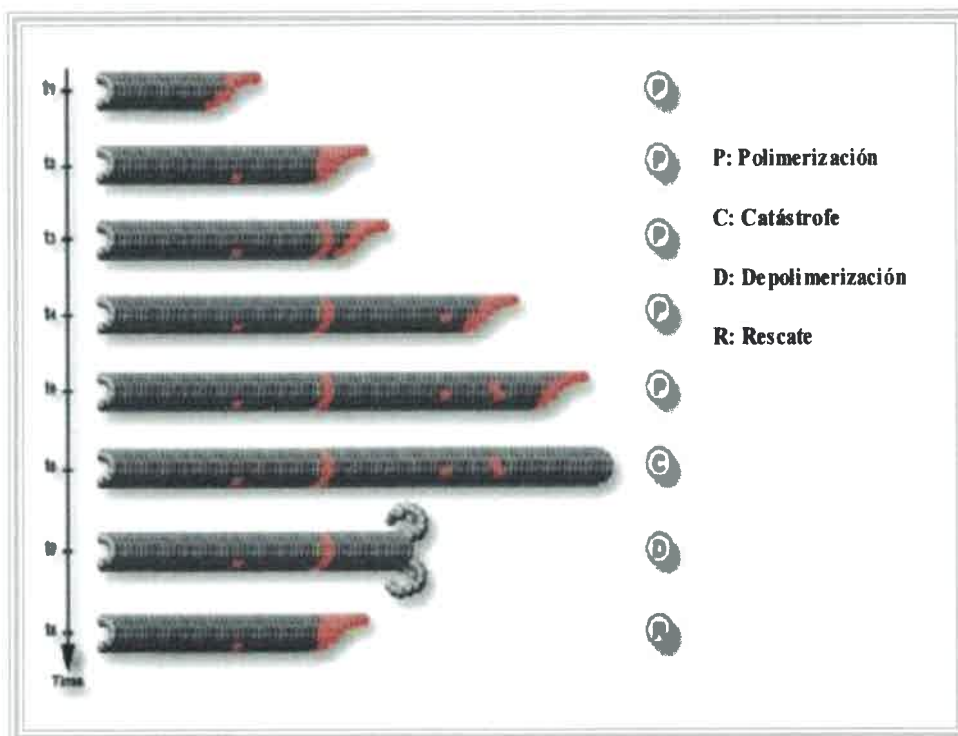


**Figura 2: Polimerización de microtúbulos.** Representación esquemática del proceso de polimerización de la tubulina ([www.webs.uvigo.es](http://www.webs.uvigo.es)).

Así el extremo de un microtúbulo consistirá transitoriamente de subunidades de tubulina que contienen GTP mientras que el centro del microtúbulo estará enriquecido en tubulina-GDP (Fig. 2). Uno de los parámetros que determina la estabilidad de un microtúbulo es la velocidad a la cual la tubulina-GTP se adiciona al extremo “+”.

Experimentos en diferentes tipos de células han demostrado que mientras algunos tipos de microtúbulos crecen, simultáneamente otros se depolimerizan. Más aún, un microtúbulo puede oscilar temporalmente entre fases de crecimiento y acortamiento, este comportamiento complejo de los microtúbulos se ha denominado *inestabilidad dinámica* (Kirschner y col., 1986).

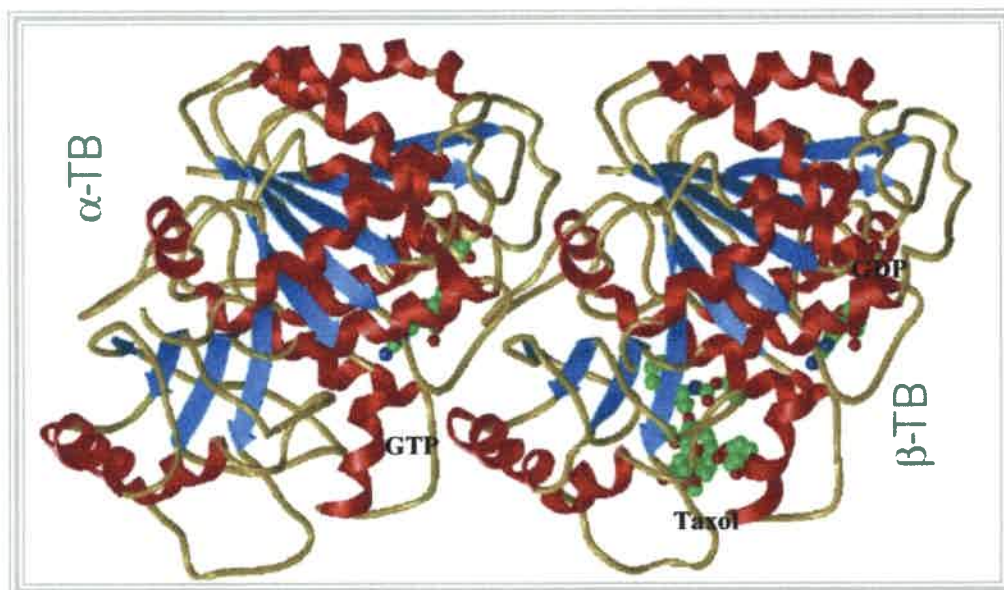
El dinamismo de los microtúbulos varía en función de los requerimientos celulares. La inestabilidad dinámica de los microtúbulos, alterna fases de crecimiento y acortamiento separados por eventos de catástrofe y rescate; el primer evento comprende la depolimerización de los microtúbulos, mientras que el segundo comprende la polimerización un microtúbulo previamente depolimerizado (Fig. 3). En el extremo “+” se observa mayor proporción de GTP-unido a tubulina, cuya presencia es esencial para prevenir eventos de catástrofe. Recientemente se ha demostrado que restos de GTP unido a tubulina se encuentran en regiones más antiguas del microtúbulo (hidrólisis incompleta de GTP durante la polimerización), posiblemente estos restos de GTP unido a tubulina sean los responsables de los eventos de rescate que ocurren en los microtúbulos luego de eventos de catástrofe (Dimitrov y col., 2008).



**Figura 3: Esquema de estabilidad dinámica de microtúbulos.** Eventos de crecimiento, acortamiento, catástrofe y rescate en microtúbulos (Dimitrov y Col. Science 2008).

### 3.2 TUBULINA

El nombre tubulina hace referencia a una familia de proteínas globulares de 55 kDa formada por: tubulina alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ), las cuales comparten una identidad entre sus cadenas de aminoácidos de 35-40 % (Oakley y col., 1989). Las tubulinas  $\alpha$  y  $\beta$  son las subunidades esenciales de los microtúbulos, mientras que la tubulina- $\gamma$  es un componente fundamental del centrosoma. Existen asimismo otras variantes menores, que no están presentes en todos los organismos eucariotas, denominadas tubulina-delta ( $\delta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) y zeta ( $\zeta$ ) (Oakley, 2000). Generalmente, se denomina tubulina a un heterodímero formado por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ) que al ensamblarse de manera altamente organizada genera microtúbulos. Se ha observado que la estructura del monómero es muy compacta (Fig. 4) pero se puede dividir en tres dominios funcionales: un sitio N-terminal el cual posee una región de unión a GTP, un dominio intermedio de unión a la droga taxol (droga antimitótica ampliamente usada como estabilizante de microtúbulos) y un dominio C-terminal el cual constituye la superficie de unión para proteínas motoras y MAPs (Nogales y col., 1998).



**Figura 4: Diagrama de cinta del dímero de tubulina.** Dímero de tubulina visto desde el lado exterior del microtúbulo, se muestra a la izquierda la subunidad de  $\alpha$ -tubulina con su sitio de unión a GTP y a la derecha la subunidad  $\beta$ -tubulina conteniendo GDP y taxol (Nogales y col., 1998).

La variabilidad observada en las moléculas de tubulina se debe en parte a que la familia de la tubulina  $\alpha$  está codificada por al menos seis genes independientes, lo mismo sucede con la tubulina  $\beta$ . Una variabilidad aún mayor se obtiene mediante modificaciones postraduccionales que pueden sufrir las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  o ambas. Estas modificaciones de la tubulina caracterizadas hasta el presente son acetilación, fosforilación, poliglutamilación, poliglicinación, detirosinación-tirosinación (Westermann y col., 2003; Hammond y col., 2008).

### 3.2.1 Modificaciones postraduccionales:

#### a) Acetilación de $\alpha$ -tubulina

La acetilación/deacetilación de la tubulina ocurre sobre el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina 40 de la subunidad  $\alpha$  (L'Hernault y col., 1985). Acetilación es la única entre las modificaciones de tubulina que se produce en esta ubicación, se cree que ocurre en la cara luminal de los microtúbulos (Hammond y col., 2008). Esta modificación es llevada a cabo por acetilasas específicas, no se ha identificado aun específicamente, pero se ha demostrado la presencia de una histona acetiltransferasa, NAT-10 (Shen y col., 2009). La deacetilación de tubulina es catalizada por histona deacetilasa 6 (HDAC6) y la SIRT2 (Hubbert y col., 2002, North y col., 2003). Se ha observado que los microtúbulos acetilados provenientes de distintas fuentes, incluyendo las neuronas, son más resistentes que los microtúbulos no acetilados a los efectos despolimerizantes de drogas antimitótica (LeDizet y col. 1986; Baas y col. 1990).

Por otro lado, en nuestro grupo de trabajo se ha determinado que la acetilación de la tubulina es indispensable para asociación de esta proteína con la enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa (Santander y col., 2006).

#### b) Fosforilación de $\alpha$ y $\beta$ tubulina

La fosforilación de  $\alpha/\beta$  tubulina ocurre en residuos de serina en el extremo carboxi-terminal (Ser 441/444) y aunque su función no está completamente establecida se cree que cumple un papel importante en la regulación de algunas MAPs, es importante destacar que esta parece ser una modificación minoritaria para los microtúbulos (Eipper, 1972).

c) Poliglutaminación de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina

La glutamilación de la tubulina constituye en el agregado de residuos glutámicos (1-20) sobre residuos glutámicos ubicados en la región C-terminal de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de tubulina (Edde y col., 1990; Regnard y col., 1998). Se piensa que diferentes enzimas glutamilan tanto  $\alpha$ - como  $\beta$ -tubulina y que, aunque la glutaminación se lleva a cabo preferencialmente en microtúbulos, tanto la forma soluble como polimérica de la tubulina son sustratos de la reacción (Audeber y col., 1993). Se ha propuesto como función de los microtúbulos poliglutaminados la maduración y estabilidad de centriolos, movilidad flagelar/ciliar y regulación de la interacción con MAPs (Westermann y col., 2003).

d) Poliglicinación de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina

La poliglicinación de tubulina consiste de la adición post-traducción de 3-34 residuos de glicina sobre el carboxilo  $\gamma$  del ácido glutámico del C-terminal de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina (Redeker y col., 1994; Vinh y col., 1999). La tubulina poliglicinada es detectada en arreglos de microtúbulos muy estables tal como los del axonema de cilias y flagelos (Levilliers y col., 1995; Bressac y col., 1995). Se ha descrito que la tubulina poliglicinada es esencial para la organización de axonemas, movilidad ciliar y citocinesis de *Tetrahymera* (Westermann y col., 2003).

e) Tirosinación- detirosinación:

Una de las modificaciones más ampliamente estudiada es la reacción de tirosinación-detirosinación de la tubulina (Barra y col., 1973, 1974; Arce y col.1975).

La modificación post-traducción comienza con la eliminación de un residuo de tirosina ubicado en el extremo C-terminal de la subunidad  $\alpha$ . Esta reacción es catalizada por la acción de la enzima tubulina carboxipeptidasa (TCPasa) (Hallak y col. 1977). Debido a esta reacción, la  $\alpha$  tubulina expone ahora ácido glutámico como aminoácido C-terminal de la cadena. Otra enzima, denominada tubulina tirosina ligasa, tiene la capacidad de adicionar un residuo tirosina sobre el ácido glutámico de dicha subunidad (Barra y col. 1973). Existen evidencias de que la alteración del ciclo de tirosinación-detirosinación afecta la interacción de microtúbulos con los motores moleculares (Ikegami y col 2010).



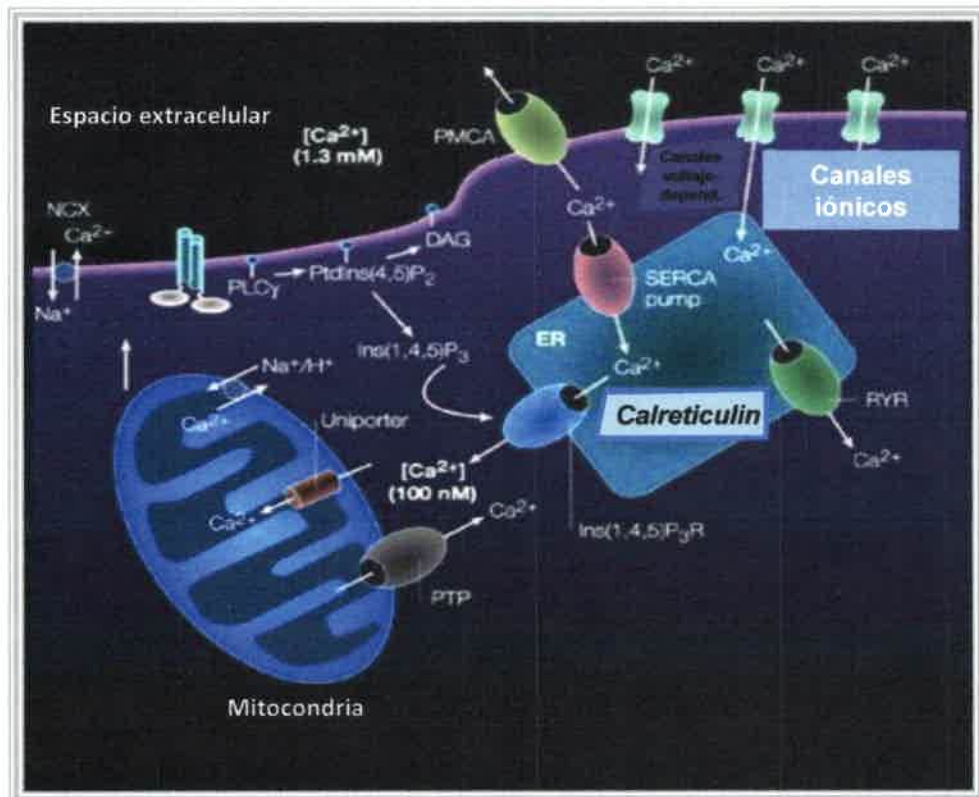
### 3.3 CALCIO EN LA CÉLULA

En el curso de la evolución, una serie de agentes surgieron como portadores de señales que son esenciales para el correcto funcionamiento de la vida celular, entre ellos el ion calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) es el más versátil dado que otros mensajeros normalmente están involucrados en la regulación de una única función en la célula (Fig.5). El  $\text{Ca}^{2+}$  regula una lista muy grande de funciones esenciales comenzando por el origen de la vida, en la fertilización y terminando con el proceso de muerte celular programada. Entre estos dos eventos, el calcio transmite señales a funciones tan importantes tales como la transcripción de genes, la contracción muscular (y la movilidad en general), secreción (incluida la de neurotransmisores) y generación de intermediarios en diversas rutas metabólicas (Carafoli, 2003).

Debido a que la participación de calcio en la célula es fundamental para muchos procesos, naturalmente exige un control eficiente y preciso. La tarea es realizada por proteínas especializadas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  con gran especificidad y afinidad en el espacio intracelular, en la mayoría de los casos la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre es alrededor de 100 nM. Estas proteínas, también llamados sensores de  $\text{Ca}^{2+}$ , pertenecen a dos grandes clases: las proteínas intrínsecas de membrana que transportan calcio y las proteínas que no son de membrana pero están involucradas en la transducción de señales que involucra al calcio (Brini y col., 2009, Ebashi y col., 1968).

En las células existen grandes diferencias en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el citoplasma, los orgánulos celulares y el exterior celular. De esta forma, se producen flujos de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de las membranas que varían la concentración citosólica de este ión según el requerimiento celular. También existen proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma que intervienen en su regulación. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol de la célula se produce por canales específicos existentes en la membrana plasmática (canales sensibles a voltaje o sensibles a ligandos) y en la membrana de orgánulos subcelulares que actúan como reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  (receptor de  $\text{IP}_3$  y receptor de Rianodina). La disminución de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico se produce por diferentes transportadores localizados en las membranas: el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (situado en la membrana plasmática, con una gran capacidad de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol al exterior celular, pero con una baja afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ , el uniportador de  $\text{Ca}^{2+}$  (localizado en la membrana mitocondrial, utiliza el gradiente electroquímico de protones para la entrada

de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la matriz) y las ATPasas transportadoras de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas o bombas de calcio), que presentan una alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$ . Se han identificado tres familias de bombas de  $\text{Ca}^{2+}$ :  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa de Retículo Sarco(Endo)plásmico (SERCA),  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de Membrana Plasmática (PMCA) y  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de Vías Secretoras (SPCA).

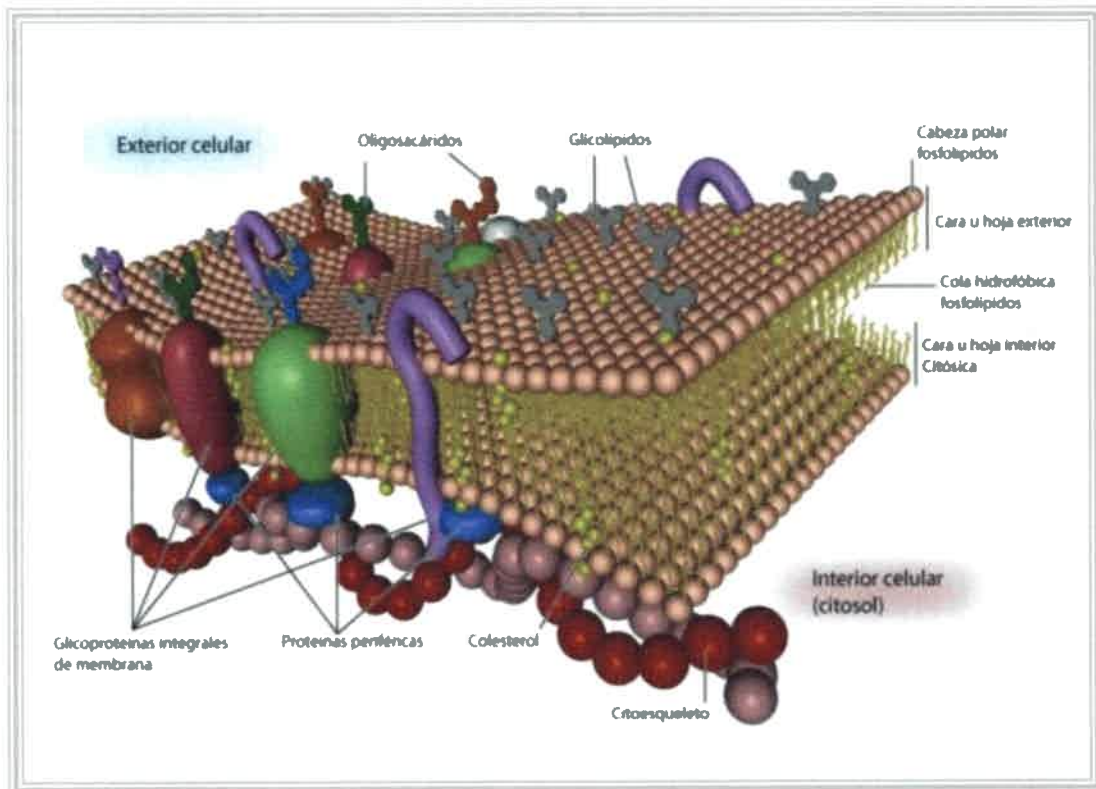


**Figura 5: Regulación del calcio.** Las actividades celulares están reguladas por un sistema de señalización intracelular y el calcio es un importante mensajero intracelular ubicuo para el control de una amplia gama de procesos celulares, tales como la transcripción de genes, la contracción muscular y la proliferación celular (Hofer, 2005). En respuesta a los estímulos adecuados, la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta, oscila y disminuye, dando lugar a la activación, la modulación e inhibición de la función celular. Numerosos canales y bombas permiten que el  $\text{Ca}^{2+}$  entre o salga de las células y se mueva entre los compartimientos y el citosol (Imagen SABiosciences).

### 3.4 MEMBRANAS CELULARES

Todas las células están rodeadas y separadas de su ambiente exterior por una membrana plasmática, con una permeabilidad selectiva, que define los límites de la

célula, su perímetro y actúa como barrera que separa su contenido interno del medio externo. El modelo actual describe la organización estructural de la membrana plasmática conteniendo diversas proteínas embebidas en una matriz de fosfolípidos. Los fosfolípidos en la membrana forman una bicapa lipídica de un grosor aproximado de 7.5 nm con las cabezas polares dirigidas hacia el exterior y las colas hidrofóbicas hacia el interior de la bicapa (Fig.6).



**Figura 6: representación de membrana plasmática (www.portales.educared.net)**

La membrana plasmática contiene de diferentes tipos de proteínas (generalmente glicoproteínas) embebidas en una bicapa de fosfolípidos. El conjunto se mueve en el plano de la membrana como si fuera un fluido. Las membranas biológicas son entidades dinámicas, estructuras fluidas, la mayoría de sus lípidos y proteínas son capaces de moverse en el plano de la membrana, además de sufrir un continuo recambio de componentes.

Esta estructura compleja está construida por diferentes elementos, proteínas, fosfolípidos y esteroides. Más del 50% está constituido por: cuatro fosfolípidos, tres fosfoglicéridos principales fosfatidilcolina, fosfatidiletalonamina, y fosfatidilserina y la esfingomielina. Los esteroides, como el colesterol, tienen un importante papel en la regulación de las propiedades fisico-químicas de la membrana biológicas regulando su resistencia y fluidez. La cantidad relativa de estos componentes varían de membrana en membrana, y los tipos de lípidos en la membrana también pueden variar.

Las proteínas integrales (llamadas también proteínas transmembrana) cruzan completamente la bicapa lipídica. Las proteínas periféricas se asocian con la membrana principalmente a través de interacciones no covalentes específicas con las proteínas integrales o lípidos de membrana. Las cadenas de oligosacáridos se encuentran unidos covalentemente a muchas proteínas extracelulares y al dominio exoplasmático de muchas proteínas transmembrana.

### 3.4.1 FUNCIÓN DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

La membrana plasmática, tiene un doble papel fisiológico en la célula, por una parte aísla (medio interno celular/ambiente exterior) pero a su vez media la interacción entre la célula y su entorno al permitir intercambio selectivo de materia y energía e información (diferentes tipos de señales físicas y químicas). Este intercambio es necesario para mantener una adecuada homeostasis del medio interno. Esta doble función de la membrana plasmática es debido a la naturaleza aislante de la bicapa lipídica en medio acuoso y por las funciones de transporte que desempeñan las proteínas embebidas en la membrana (Fig.6). Es la actividad específica de proteínas transportadoras las que determinan la permeabilidad selectiva de las biomembranas. Mientras que las moléculas hidrofóbicas, que son solubles en lípidos pueden pasar fácilmente la membrana, moléculas pequeñas como el oxígeno, dióxido de carbono, nitrógeno pueden difundir entre los fosfolípidos de membrana, pero moléculas hidrofílicas pequeñas como agua, nutrientes como la glucosa e iones [ $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ , etc] no pueden pasar directamente a través de los fosfolípidos de la membrana plasmática. Estos compuestos deben pasar a través de proteínas de transporte específico situadas en la membrana.

### 3.4.2 ENSAMBLAJE DE UNA MEMBRANA

La formación de una bicapa lipídica es un proceso espontáneo en el que fuerzas intermoleculares como interacciones de van der Waals, e interacciones hidrofóbica (mediada por el efecto hidrofóbico) favorecen que las colas de los lípidos se autoasocien y autoensamblen espontáneamente en una bicapa lipídica con las cabezas polares orientadas hacia el agua, y las colas hidrofóbicas hacia el interior. Así, cuando los fosfolípidos se “disuelven” en agua forman espontáneamente las siguientes estructuras (Fig. 7):



**Figura 7:** Representación de diferentes ensamblajes de fosfolípidos anfipáticos en soluciones acuosas ([www.portales.educared.net](http://www.portales.educared.net)).

- I- Micela: en estas estructuras las cadenas hidrofóbicas de los ácidos grasos están secuestradas en el núcleo de la esfera. No hay agua en el interior hidrofóbico.
- II- Bicapa: son unidades con forma de cilindro (cabeza de igual tamaño que la cadena). En una bicapa abierta todas las cadenas hidrofóbicas están protegidas del agua, excepto las situadas en los bordes.
- III- Liposoma: son estructuras esféricas huecas con una pared en forma de bicapa lipídica y una cavidad interior acuosa.

La imagen de la Fig. 7 muestra los distintos niveles de organización membrana biológica. Biomembrana típica que se ensambla con fosfolípidos (fosfogliceridos, esfingolípidos) y esteroides (principalmente colesterol). Aunque todos los lípidos de membrana tienen su carácter anfipático en común (con cabezas polares-hidrofílicas y colas apolares-hidrofóbicas) difieren en su estructura química, abundancia y funciones en las membranas biológicas.

La membrana plasmática es una estructura asimétrica. Las dos monocapas que forman la bicapa lipídica, la monocapa o cara externa que mira al medio extracelular y la otra que mira al citosol (el medio interno de la célula). La cara citosólica tiene distinta composición, y distribución de fosfolípidos, así como de colesterol como también en la organización de las proteínas embebidas o asociadas a la membrana.

La cara externa de la membrana plasmática está compuesta principalmente de fosfatidilcolina y esfingomiélin, mientras que la fosfatidietalonamina y fosfatidilserina son los fosfolípidos predominantes de la cara interna o citosólica. Otro fosfolípido, el fosfatidilinositol, también se encuentra en la cara interna de la membrana. Los oligosacáridos unidos a lípidos (glicolípidos) y a las proteínas integrales de membrana (glicoproteínas) miran siempre hacia el exterior celular.

Todas las biomembranas conocidas muestran una asimetría en la disposición y distribución de los componentes lipídicos y proteicos en ambas monocapas u hojas que componen la bicapa lipídica, la cara citosólica (que mira al citosol) y la cara extracelular (que mira hacia el exterior). Tal asimetría en la distribución confiere distintas propiedades funcionales a las dos caras de la membrana. Esta asimetría es tanto una asimetría lateral como transversal. En la asimetría lateral los lípidos o proteínas de un tipo particular se agrupan en un plano o zona concreto de la membrana, mientras que la asimetría transversal es la que existe a través de la membrana desde el lado exterior al lado citosólico. Los lípidos se distribuyen asimétricamente tanto lateral como transversalmente, su asimetría transversal se observa claramente en la membrana de los eritrocitos (glóbulos rojos) donde fosfatidilcolina comprende el 30% de los fosfolípidos totales, pero de este porcentaje el 30 % se encuentra en la monocapa exterior y el 70% en la hoja que mira hacia el interior. La asimetría lateral de los lípidos es requerida en formación de ciertas estructuras especializadas de la membrana, por ejemplo para llevar a cabo diferentes mecanismos de endocitosis, y también es importante para el correcto funcionamiento de proteínas integrales de membrana. Por otra parte, las proteínas embebidas integralmente en la membrana tienen una orientación definida asimétrica dentro de la bicapa mostrando una única orientación polarizada debido a que se sintetizan y se insertan en la membrana de una manera asimétrica.

### 3.5 ATPasas de MEMBRANA

Dentro de las proteínas de membrana podemos encontrar a las ATPasas, estas enzimas se insertan en la membrana a manera de proteína integral y cumplen funciones dependiendo de la célula en la que se encuentran, pero la función está determinada por la estructura de la ATPasa y sus componentes (Fig. 8), todas consumen ATP pero varían en su función biológica. Las ATPasas se clasifican en tres grandes grupos:

- 1.- F-ATPasas: Encargadas de catalizar el paso transmembrana de protones en forma reversible.
- 2.- V-ATPasas: Responsable de la acidificación de compartimentos en muchos organismos, lo que permite el correcto funcionamiento de proteasas y otras enzimas hidrolíticas.
- 3.- P-ATPasas: La mayoría de los miembros de esta familia son transportadores específicos para el bombeo de una gran variedad de cationes, sin embargo, una subfamilia mueve fosfolípidos para mantener la naturaleza asimétrica de la biomembrana.
- 4.- ABC-ATPasas: Pueden actuar exportando solutos hacia el exterior del citoplasma, o importando solutos. Contiene un dominio transmembrana muy diverso entre las diferentes bombas y un dominio citoplásmico más conservado (de unión del ATP, ABC), en donde reside la actividad ATPasa. Sufren cambios conformacionales durante el transporte, pero no se fosforilan durante el mismo.

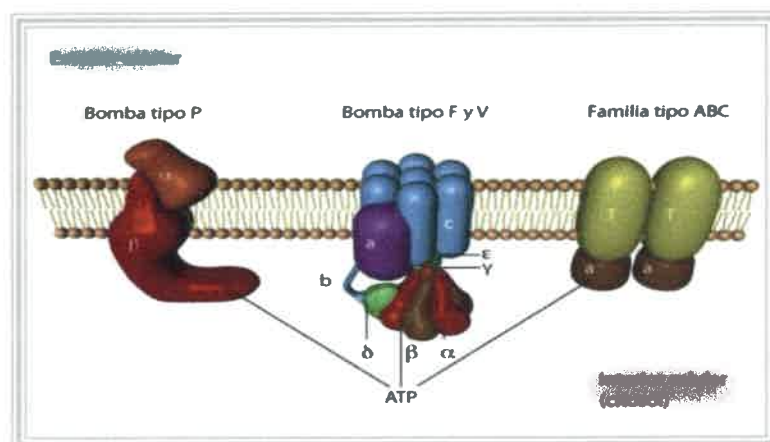


Figura 8: Esquema de ATPasas: tipo P, F y V, ABC (www.portales.educared.net).

### **3.6 P-ATPasas de membrana plasmática**

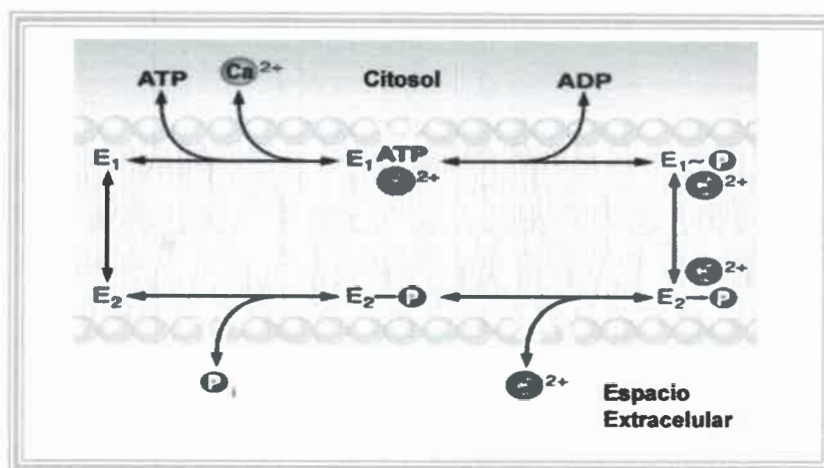
Las ATPasas de tipo P, también conocidas como E<sub>1</sub>-E<sub>2</sub> ATPasas, son un grupo evolutivamente relacionado con las bombas de iones que se encuentran en bacterias, arqueas y eucariotas. La denominación de estas ATPasas se debe a que forman un intermediario fosforilado al obtener energía del ATP en su ciclo de reacción. Todas las ATPasas de tipo P comparten homología en la secuencia de aminoácidos y todas son sensibles a la inhibición por el vanadato, que es similar al fosfato y toma su lugar en una de las fases del funcionamiento de la enzima. Además, en su mecanismo de acción interconvierten entre al menos dos conformaciones diferentes, denotado por E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>. Este tipo de proteínas es muy importante por su amplia distribución. Esta familia incluye a Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, H<sup>+</sup>-ATPasa y Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPasa. Estas P-ATPasas son fundamentales para el mantenimiento del potencial de membrana en las células animales; conservando el interior de la célula negativo y el exterior positivo, permitiendo el paso de iones y moléculas cargados positivamente por transporte pasivo al interior celular (Bublitz y col., 2010).

#### **3.6.1 Ca<sup>2+</sup>-ATPasas**

Las Ca<sup>2+</sup>-ATPasas son responsables del transporte activo de iones Ca<sup>2+</sup> a expensas de la hidrólisis de ATP en distintos tipos de membrana celulares, de esta manera existe una Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de retículo sarcoendoplasmico (SERCA), una Ca<sup>2+</sup>-ATPasa ubicada en vías secretoras, principalmente complejo de golgi y vesículas secretoras (SPCA) y Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de membrana plasmática (PMCA).

El ciclo catalítico de estas ATPasas presenta características comunes (Fig. 9). La primera etapa del ciclo de reacción de estas enzimas, consiste en la unión de Ca<sup>2+</sup> al dominio citosólico de la enzima en su conformación de alta afinidad (E<sub>1</sub>) y la inmediata fosforilación de un residuo de ácido aspártico por ATP. La enzima fosforilada (EP<sub>1</sub>) cambia su conformación a estado EP<sub>2</sub> que expone el Ca<sup>2+</sup> al interior luminal (SERCA, SPCA) o al exterior celular (PMCA) y se produce la liberación de Ca<sup>2+</sup> y la hidrólisis del intermediario fosforilado, causada por la baja afinidad a Ca<sup>2+</sup> de la forma EP<sub>2</sub> de la bomba. Tras la disociación del intermediario fosforilado, la bomba vuelve a su estado conformacional E<sub>1</sub> completando el ciclo catalítico (Lee y col., 2002).





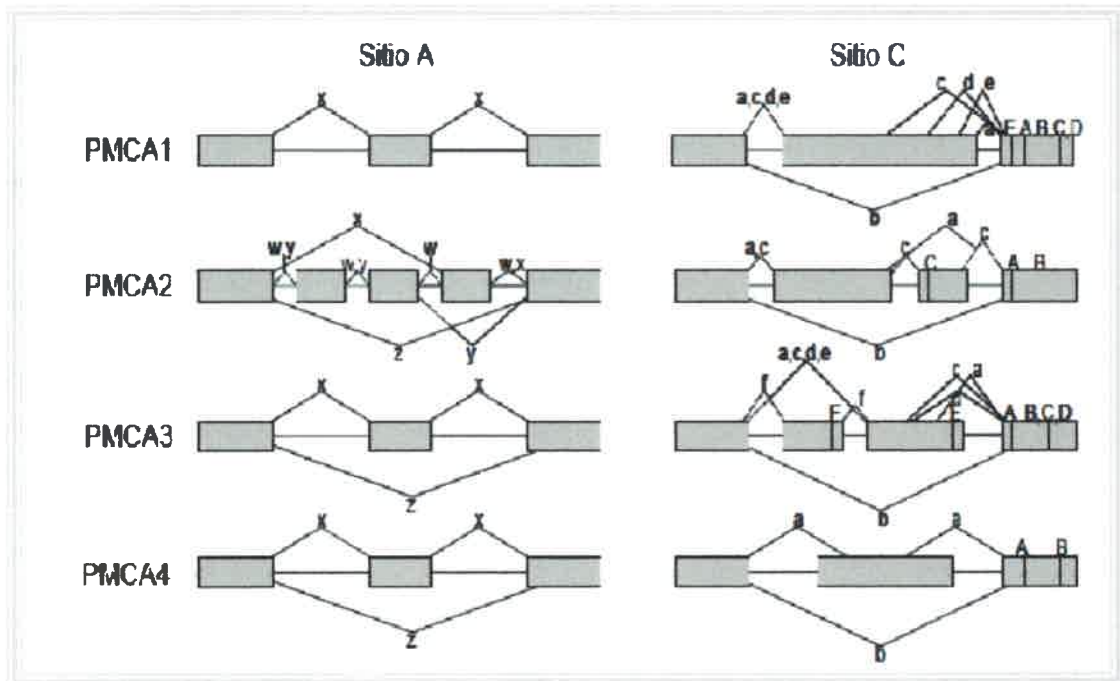
**Figura 9: Esquema del ciclo de reacción de  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa.** Primer estado conformacional (E1) se une a  $\text{Ca}^{2+}$  con alta afinidad del lado citoplasmático de la membrana, el segundo (E2) tiene menor afinidad por calcio y lo libera al otro lado de la membrana (Brini y Col. 2009).

### $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática

#### Generalidades

La bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana plasmática PMCA se identificó y purificó por primera vez en eritrocitos (Schatzmann, 1966; Niggli y col., 1979) donde se ha estudiado tradicionalmente por ser el único tipo de bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  en esta célula. La PMCA utiliza la energía de hidrólisis del ATP (estequiometría de un ion de  $\text{Ca}^{2+}$  por cada molécula de ATP hidrolizada) en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  para transportar  $\text{Ca}^{2+}$  del citosol al exterior de la célula. Esta bomba es el único transportador de  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidad de la membrana plasmática, lo que implica un papel importante, no solo en la regulación global del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, sino también en el ajuste fino de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en eventos próximos a la membrana plasmática que engloban picos y oscilaciones en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ . La PMCA tiene gran afinidad, su  $K_m$  es de 100 a 200 nM a baja velocidad, esto está en contraste con el intercambiador que tiene una baja afinidad pero alta capacidad. Así, PMCA es eficaz en la unión a calcio, aun cuando sus concentraciones dentro de la célula son muy bajas, por lo que es adecuado para el mantenimiento de calcio a sus niveles muy bajos en la normalidad (Carafoli, 1991).

La PMCA se expresa en la mayoría de las células eucariotas, pero en un porcentaje muy bajo, alrededor del 0,1% del total de proteínas de membrana (Garrahan y col., 1990), existen cuatro isoformas de la enzima (PMCA1, PMCA2, PMCA3, PMCA4), cada isoforma es codificada por genes diferentes, a su vez el ARNm sufre “splicing” alternativo generando diferentes subtipos de cada isoforma (Strehler y col., 2001).



**Figura 10: Opciones de procesamiento alternativo para las cuatro isoformas PMCA.** Modificado de Strehler y Zacharias (2001).

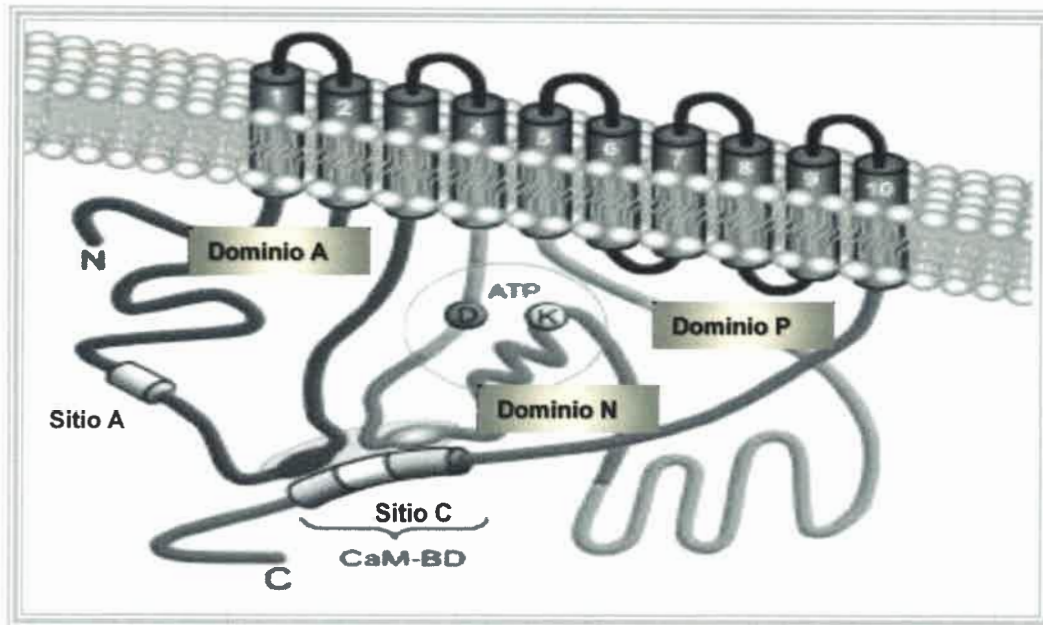
El procesamiento alternativo en la PMCA tiene lugar a partir de dos regiones principales (Fig. 10): *sitio A* (cercano al sitio de unión de fosfolípidos del primer dominio citosólico) y *sitio C* (localizado en el dominio de regulación del C-terminal). Por combinaciones en estos sitios se obtienen las distintas variantes. Todos los tejidos y tipos celulares expresan al menos una PMCA, aunque su distribución a nivel de isoforma y variantes parece ser dependiente del tipo celular.

<i>GEN</i>	<i>ISOFORMA</i>	<i>DISTRIBUCION</i>
<i>ATP2B1</i>	<i>PMCA1 a, b</i>	<i>Todos los tejidos</i>
<i>ATP2B2</i>	<i>PMCA2 z/b, z/a, w/b, w/a</i>	<i>Cerebro, glándulas mamarias</i>
<i>ATP2B3</i>	<i>PMCA3 a, b</i>	<i>Cerebro, cordón espinal, glan. adrenales</i>
<i>ATP2B4</i>	<i>PMCA4 a, b</i>	<i>Todos los tejidos</i>

**Tabla1:** genes, isoformas de PMCA y distribución. Modificado de Brini y col. (2009)

Los genes muestran diferente patrón de expresión, PMCA2 y PMCA3 son expresadas exclusivamente en cerebro, mientras que PMCA1 y PMCA4 son expresadas en todos los tejidos, aunque mayoritariamente la isoforma PMCA1 se encuentra en cerebro, pulmón e intestino y la isoforma 4 principalmente en riñón, eritrocitos, músculo esquelético, estomago, intestino, cerebro y espermatozoides (Stauffer y col., 1995).

Estructuralmente PMCA es una proteína anfipática de unos 1.200 aminoácidos y con una masa molecular alrededor de 140 kDa. Posee 10 segmentos que atraviesan la membrana plasmática, mientras que los extremos carboxilo y amino se localizan en la parte citoplasmática (Fig. 11). La mayor parte de PMCA se encuentra localizada hacia el citosol y consiste en 3 grandes fragmentos: el primer dominio citosólico, *dominio de transducción*, limitado por los segmentos transmembrana 2 y 3, contiene una región de unión de fosfolípidos ácidos y uno de los dos sitios de interacción con el dominio de unión a calmodulina; el segundo dominio, *dominio catalítico*, se encuentra entre los segmentos 4 y 5 y contiene el sitio de formación del aspartil fosfato y el sitio de unión de ATP. Finalmente una larga "cola" a continuación del último segmento transmembrana, el tercer dominio o *dominio de regulación*, es el dominio autoinhibitorio y contiene distintos sitios de interacción con moléculas implicadas en la regulación de la actividad de la bomba, entre ellos el de unión a fosfolípidos ácidos y calmodulina (Strehler y col., 2001).



**Figura 11: Topología de PMCA:** Los 10 dominios transmembrana (TM) están simbolizados por los cilindros numerados 1-10. En el primer loops citoplasmático (entre TM2 y TM3) se encuentra el sitio A, de splicing alternativo. En el segundo loops (entre TM4 y TM5) contiene el sitio de formación del aspartil fosfato y el sitio de unión de ATP. En el C-terminal se encuentra el dominio autoinhibitorio, además del sitio de unión a calmodulina (CaMBD) que se une a un fragmento del primer y segundo loops (Di Leva y Col 2008).

### Regulación de PMCA

La PMCA se encuentra altamente regulada dado la importancia que tiene el calcio en la célula, el primer regulador descrito ha sido la calmodulina. La calmodulina posee 4 sitios de unión con alta afinidad para calcio, puede interactuar con el dominio de regulación de la bomba (Fig. 11), desplazándolo y eliminando la autoinhibición, de esta manera se logra incrementar considerablemente la afinidad de PMCA por  $\text{Ca}^{2+}$  y la actividad enzimática (Carafoli, 1994). La afinidad por calmodulina es diferente para cada isoforma de PMCA, posiblemente esto esté relacionado con la regulación global del calcio en la célula.

Además de calmodulina se han descrito numerosos reguladores de la actividad PMCA, así el medio ambiente lipídico donde está inmersa PMCA tiene un efecto sobre su actividad, ya que la enzima posee dos sitios de unión para fosfolípidos ácidos (Enyedi y col., 1987; Zvarich y col., 1990). Es probable que la activación por fosfolípidos ácidos sea muy importante fisiológicamente. En membranas de eritrocitos humanos la concentración de fosfatidilserina en el ambiente que rodea a PMCA sería suficiente para mantener a la enzima permanentemente activada a un 50% de su

actividad máxima (Nigli y col., 1981). El fosfolípido más efectivo en la activación sería el PIP<sub>2</sub> porque su concentración en la membrana se modula durante los procesos de señalización de calcio y estos cambios en la concentración de PIP<sub>2</sub> ocurren muy rápidamente.

Estudios realizados por Pérez-Gordonez y col. (2009) en preparaciones de PMCA purificada a partir de eritrocitos humanos se ha demostrado que PMCA es estimulada de manera dosis dependiente por diacilglicerol (DAG), alcanzando un máximo de activación por el agregado de 30  $\mu$ M de DAG. Además han demostrado que existe una interacción directa entre PMCA y DAG. La activación inducida por DAG es aditiva a la producida por calmodulina, proteína quinasa C y etanol, lo cual implica que DAG interacciona con PMCA a través de diferentes mecanismos (Perez-Gordones y col., 2009).

La proteólisis parcial de PMCA produce una activación en la enzima, porque se elimina su dominio de autoinhibición (Zurini y col., 1984). La calpaina produce un clivaje inmediatamente por encima del sitio de unión a calmodulina en el COOH-terminal de PMCA (James y col., 1989<sup>a</sup>), esto provoca una activación irreversible de la actividad enzimática ya que es insensible a su regulación por calmodulina, se cree que esto podría ocurrir en algunas patologías (salamino y col., 1994).

El etanol y otros alcoholes de cadena corta estimulan la actividad de PMCA, de manera específica para cada isoforma de PMCA, la isoforma PMCA2CI es la más sensible al efecto de etanol, este efecto de etanol es aditivo al estimulatorio que produce calmodulina (Benaim y col., 1994; Cervino y col., 1998). Debido a que el etanol no es un efector fisiológico, se ha investigado compuestos que tengan la misma capacidad de activación sobre la bomba de calcio. Para este propósito se estudió el efecto de algunos esfingolípidos que tienen grupos hidroxilos libres, uno de ellos fue la ceramida que demostró tener un efecto activador sobre PMCA, mientras que la esfingosina demostró tener capacidad inhibitoria sobre la enzima (Colina y col., 2002).

Las proteínas quinasas A y C pueden fosforilar los residuos de serina y treonina ubicados en el dominio de regulación y de esa manera aumentar la velocidad máxima de la enzima (James y col., 1989b; Zylinska y col., 1998).

Finalmente se ha demostrado que el anormal funcionamiento de PMCA o fallas en su regulación y/o expresión, se asocian a condiciones patológicas tales como sordera neurosensorial, en esta enfermedad se encuentra afectada la isoforma 2 de PMCA, que se expresa abundantemente en el cerebro, en particular en la célula de Purkinje del cerebelo y en las células ciliadas del órgano de Corti del oído interno, donde se localiza específicamente a los estereocilios. El análisis molecular de esta enfermedad revela que PMCA2 tiene elevada su actividad enzimática en ausencia de calmodulina y no responde a su regulación por esta proteína, es decir, que PMCA expulsa continuamente calcio fuera de la célula.

Además del oído interno, PMCA2 también se expresa mayormente en diferentes regiones del cerebro, y su disfunción puede tener un papel en algunas enfermedades neurodegenerativas (Brini y col., 2009). También se ha demostrado que disfunción en PMCA se relaciona con patologías como la diabetes e hipertensión (Horn y col., 1995; Dean, 2010)

### **Proteínas que interactúan con PMCA**

PMCA interactúa con numerosas proteínas, algunas de ellas encargadas del reclutamiento y mantención de PMCA en la membrana, otras son reguladoras de la actividad enzimática de PMCA (Fig. 12). La mayoría de las proteínas interactúan con PMCA a través del dominio PDZ localizado en el C-terminal, por ejemplo: los miembros de la familia de quinasas MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase), estas proteínas interactúan con el citoesqueleto de actina, por lo tanto puede anclar la red de citoesqueleto a la membrana.

Otras proteínas también interactúan con PMCA por su dominio PDZ, por ejemplo, NHERF1 (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange Regulatory Factor 2, específica y selectiva de la isoforma PMCA2b); El Óxido Nítrico Sintasa I (NOS-I); PISP (PMCA-Interacting Single-PDZ domain), CASK (Calcium/Calmodulin-Dependent Serine Protein Kinase), CLP36 (proteína que interactúa con la actina).

Además de las asociaciones que ocurren en el dominio PDZ, otras regiones de PMCA interactúan con proteínas, por ejemplo en PMCA4b (entre TM4-5) se ha encontrado a la proteína supresora de tumores RASSF1 (Ras-Associated Factor 1) y

también a CaN ( $\alpha$ -1 syntrophin y calcineurin). La región N-terminal de PMCA tiene poca homología entre las distintas isoformas, esto se refleja en la selectividad de algunas interacciones con otras proteínas, por ejemplo, la proteína 14-3-3 interacciona con las isoformas 1, 3 y 4 pero no con la isoforma 2, probablemente la interacción ocurra en este sitio. El resultado de esta interacción es la inhibición de la actividad de PMCA (Di Leva y col., 2008).

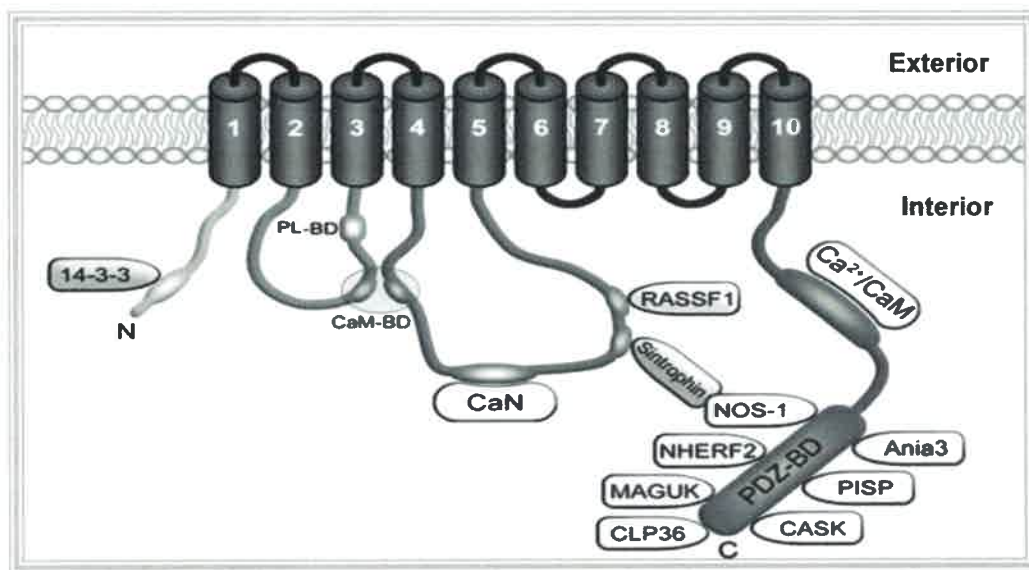


Figura 12: Esquema de las proteínas que interaccionan con PMCA (Di Leva y Col 2008).

### 3.6.2 H<sup>+</sup>-ATPasas

La H<sup>+</sup>-ATPasa se encuentra principalmente en membrana plasmática de plantas y en hongos inferiores como *S. cerevisiae* donde es la P-ATPasa más abundante.

Es una proteína monomérica encargada de generar un gradiente electroquímico necesario para el transporte de nutrientes dentro de la célula, el cual es obtenido por el bombeo de H<sup>+</sup> que realiza la enzima.

La hidrólisis de ATP por la ATPasa, forma un intermediario acil-fosfato como parte del ciclo de reacción, este intermediario cambia del estado E1 al estado E2 y entre ellos difieren en su conformación.

Se estima que la ATPasa consume entre el 10 y el 15 % del ATP producido durante el crecimiento de la levadura (Gancedo y col., 1989).

En tejidos como mucosa gástrica, corazón, colon y médula renal, existe una bomba de protones que cumple la misma función que la  $H^+$ -ATPasa en levaduras, pero en estos tejidos se intercambia  $H^+$  por  $K^+$ , por lo que el nombre de la enzima es  $H^+$ ,  $K^+$ -ATPasa (Civelek y col., 1996).

Por ejemplo en el estómago,  $H^+$ ,  $K^+$  ATPasa es la bomba de protones y, como tal, es la principal enzima responsable de la acidificación del contenido del estómago (ácido gástrico).  $H^+$ ,  $K^+$  ATPasa se encuentra en las células parietales, que son células epiteliales altamente especializadas, formando la mucosa gástrica. Las células parietales poseen un sistema de membrana secretora extensa y la  $H^+$ ,  $K^+$  ATPasa es la proteína principal.

### 3.6.3 $Na^+$ , $K^+$ -ATPasa

La bomba de sodio-potasio está constituida por dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , esta enzima bombea iones de  $Na^+$  hacia el exterior celular e iones de  $K^+$  hacia el interior, ambos en contra del gradiente de concentración; de esta manera consigue que la concentración de  $Na^+$  sea mayor en el exterior y que ocurra lo contrario con la de  $K^+$ .

La subunidad alfa está compuesta por ocho segmentos transmembrana y en ella se encuentra el centro de unión del ATP que se localiza en el lado citosólico de la membrana. También posee dos centros de unión al potasio extracelulares y tres centros de unión al sodio intracelulares que se encuentran accesibles para los iones en función de si la proteína está fosforilada.

La subunidad beta contiene una sola región helicoidal transmembrana y no parece ser esencial para el transporte ni para la actividad ATPasa sino que sería necesaria para su unión a la membrana celular, de hecho esta subunidad está glicosilada en la cara externa como las mayorías de las proteínas de membrana (Lemas y col., 1994). Por cada molécula de ATP hidrolizada se transportan tres iones de sodio hacia el exterior de la célula y dos iones de potasio hacia el interior (Sweadner, 1989).



### 3.7 INTERACCIÓN DE LAS P-ATPASAS CON TUBULINA

La tubulina se ha descrito principalmente como proteína citoplasmática, sin embargo en algunos casos adquiere un comportamiento hidrofóbico, debido a su asociación con componentes de la membrana plasmática.

Parte de la tubulina de membrana del tejido nervioso, muestra un comportamiento hidrofóbico que no se observa con la tubulina citosólica (Beltramo y col. 1994). En tejido nervioso, la tubulina adquiere un comportamiento hidrofóbico por asociarse a 2 proteínas de peso molecular de 29 y 100 kDa. Mediante la determinación de la secuencia de aminoácidos se estableció que la proteína de 100 kDa corresponde a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (Alonso y col. 1998). Esta proteína se asocia preferentemente con el isotipo acetilado y como consecuencia de la asociación, la actividad de la enzima es inhibida. Casale y col. (2001) demostraron que en membrana plasmática de cerebro el grado de inhibición de la actividad de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa está relacionado con la cantidad de tubulina acetilada convertida en un componente hidrofóbico.

Posteriormente Casale y col. (2003), demostraron que la tubulina acetilada participa en la regulación de la actividad de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa *in vivo* en astrocitos. Para ello modificaron farmacológicamente la actividad de la enzima en cultivos de astrocitos, adicionando L-glutamato exógeno el cual estimula la actividad de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa (Pellerin y col. 1997), y determinaron la cantidad de Tubulina Acetilada Hidrofóbica (HAT) para cuantificar la tubulina asociada con la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasa. Como resultado del transporte del aminoácido al interior de la célula, observaron que disminuye el contenido de tubulina acetilada con comportamiento hidrofóbico. Recientes resultados de Zampar y col. (2009) demuestran que el dominio citoplasmático 5 (CD5) de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa interacciona con un sitio de tubulina acetilada. Además de concluir que la interacción entre tubulina y esta ATPasa es directa, también se concluyó que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPasa actúa como un sitio de anclaje para los microtúbulos a la membrana a través de la interacción entre tubulina acetilada y CD5 de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa.

Amaiden y col. (2011) demostraron en eritrocitos humanos la presencia y distribución de diferentes fracciones de tubulina, que pueden ser definidas operacionalmente (membrana, estructura sedimentable y fracción soluble), encontrándose que la tubulina acetilada forma un complejo con la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ATPasa e inhibe la actividad de la enzima en la membrana. En membrana de eritrocitos de

individuos hipertensos la tubulina esta aumentada un 150 % y la actividad  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa parcialmente inhibida comparada con los controles normotensos, observándose que la tubulina que forma parte de la membrana y de la fracción sedimentable es la involucrada en la regulación de la actividad enzimática (Amaiden y col., 2011).

En otros estudios Serrano (1983) demostró que el agregado de D-glucosa a un cultivo de *S. cerevisiae* aumenta aproximadamente 8 veces la actividad  $\text{H}^+$ -ATPasa de membrana plasmática en un período de tiempo relativamente corto. Campetelli y col. (2005) demostro que en *S. cerevisiae* el aumento en la actividad enzimática producido por glucosa se debe a una disociación del complejo  $\text{H}^+$ -ATPasa-tubulina acetilada (Campetelli y col., 2005).

### **3.8 EFECTO DE LOS LÍPIDOS SOBRE LA FUNCIONALIDAD DE PMCA Y TUBULINA**

Se ha reportado ampliamente que los lípidos influyen sobre la actividad de PMCA (Missiaen y col., 1989; Verbist y col., 1991; Sepúlveda y col., 2006; Jiang y col., 2007; Cura y col., 2008). En particular, la composición de fosfolípidos que rodea a PMCA, tiene una gran influencia sobre la actividad enzimática (Pang y col., 2005; Tang y col., 2006), sugiriendo una importante función de los fosfolípidos como reguladores *in vivo* de la actividad PMCA.

Se conoce que los fosfolípidos ácidos y ácidos grasos poliinsaturados son capaces de activar la bomba por su facultad de unirse a dos regiones distintas de la enzima, una de estas regiones está localizada en el primer dominio citoplasmático, la segunda región es el domino de unión a calmodulina o CaM-BD, la unión de los lípidos a este último dominio impide la autoinhibición de la enzima. Diferentes autores han demostrado que entre los lípidos probados fosfatidilinositol bisfosfato ( $\text{PIP}_2$ ), un fosfolípido minoritario de las membranas plasmáticas implicado en diferentes procesos de transducción de señales, es el activador más potente de PMCA (Carafoli y col., 1982; Choquette y col., 1984). Otros estudios demuestran que la estimulación de la actividad de PMCA por fosfolípidos con carga negativa se basa en la unión de PMCA con los lípidos y las cargas negativas son un modulador importante en la interacción, lo que sugiere que

dado el alto número de cargas presentes en la molécula de PIP<sub>2</sub>, este fosfolípido podría unirse más fuertemente a la bomba (Verbist y col., 1991). Dado que el PIP<sub>2</sub> puede cambiar su concentración rápidamente en la membrana plasmática en respuesta a estímulos externos, es de particular interés como modulador potencial de la bomba (Di Leva y col., 2008).

Los lípidos y la diversidad estructural de la membrana lipídica tomado desde un punto de vista biológico, es muy importante, ya que se ha determinado que los lípidos pueden actuar como segundos mensajeros y además de reguladores de proteínas, en los últimos años se encontró que los lípidos pueden agruparse formando plataformas (rafts) o caveolas formadas por esfingolípidos, como esfingomielina (SPM) y colesterol (COL), que sirven como plataforma para la ubicación de algunas proteínas para la señalización celular. Se ha demostrado que PMCA se localiza en mayor proporción en caveolas que en lípidos que no forman estas plataformas (Fujimoto 1993). Pang y col. (2005) demostraron que la actividad de PMCA disminuye cuando se encuentra en dominios ricos en SPM/COL (caveolas). En concordancia, Sepúlveda y col. (2006) demostraron que en preparaciones de cerebelo de cerdo, PMCA4 está localizada principalmente en dominios ricos en SPM/COL, el mismo resultado fue obtenido del análisis en cultivo primario de neuronas principalmente para PMCA1 (Jiang y col., 2007).

Dada la influencia que ejercen los lípidos sobre la actividad PMCA, se ha demostrado que dependiendo de los lípidos utilizados en la reconstitución de preparaciones de enzima purificada se modifica la actividad resultante de la PMCA.

Por otro lado también se ha descrito una relación entre tubulina y los lípidos. La presencia de tubulina en rafts lipídicos ha sido frecuentemente reportada, especialmente en tejido nervioso y mielina, aunque su cantidad es muy variable (Wolff, 2009).

También se ha demostrado que PIP<sub>2</sub> »PIP<sub>3</sub>~ PI (Popova y col., 2002) se unen a tubulina y previenen el ensamblado de microtúbulos y por lo tanto incrementa la cantidad de tubulina como dímero, sugiriendo algún grado de especificidad entre tubulina/PIP<sub>2</sub>,PIP<sub>3</sub>,PI y una conexión a la transducción de señales (Popova y col.,1997, Wolff 2009).

Finalmente se ha reportado que tubulina es capaz de interaccionar e inhibir la actividad de PLD (Chae y col., 2005). Popova y col., (2002) han demostrado que a bajas concentraciones de tubulina, PLC $\beta_1$  es activada, pero a altas concentraciones de tubulina esta enzima se encuentra inhibida, además la tubulina es capaz de unirse a PIP $_2$ , privando a PLC $\beta_1$  de su sustrato. Estas enzimas están involucradas en la generación de señales celulares mediadas por lípidos. De esta manera, no solo los lípidos modificarían el dinamismo de MT, sino que también tubulina sería capaz de modificar el entorno lipídico de una determinada membrana generando así diferentes señales.

*Procedimientos  
Experimentales*



#### 4.1 MATERIALES

Tritón X-114, ATP, taxol, nocodazol, anti-mouse IgG conjugado con peroxidasa, mouse mAb (ascites fluid) 6-11B-1 específico para tubulina acetilada, mAb 5F10 específico para PMCA, JA9 específico para PMCA4, calmodulina, calcimycin (A23187), L- $\alpha$  fosfatidilcolina, L-  $\alpha$  ácido fosfatídico, BE (extracto de cerebro bovino, fracción 1), DAG (1,2-Dioctanoyl-*sn*-glycerol), agarosa-calmodulina, C<sub>12</sub>E<sub>10</sub> (decaetilen glicol monododecil eter), son de Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA) y mAb PI3-kinase p110 (D-4) es de Santa Cruz Biochnology (Santa Cruz, CA, USA), Fura 2-AM de molecular probes, <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> (12 mCi/mg) obtenido de Perkin-Elmer Life Science (Wellesley, MA, USA).

#### 4.2 CULTIVO CELULAR

Células CAD (células tumorales de cerebro de rata) fueron cultivadas en medio DMEM/F12 (1:1) de Sigma® y las células COS (fibroblasto de riñón de mono verde africano) en medio DMEM, ambos suplementados con 10% de suero fetal bovino (Carlsbad, CA, EE.UU.) a 37 °C en aire/CO<sub>2</sub> (19:1). El medio de cultivo fue renovado cada 48 hs.

#### 4.3 PREPARACIÓN DE LOS ERITROCITOS

Eritrocitos recientemente extraídos, heparinizados son lavados por centrifugación y resuspensión dos veces con buffer HBS conteniendo: 135 mM NaCl, 5 mM ClK, 1 mM Cl<sub>2</sub>Mg, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM D-glucosa, 25 mM HEPES, pH 7,4 y utilizados en el momento.

#### 4.4 OBTENCION DE MEMBRANA PLASMATICA DE ERITROCITOS

Membranas de eritrocitos se aislaron de eritrocitos humanos por lisis hipoosmótica como lo describe Mariani y col., (1993). Los eritrocitos fueron separados de los demás componentes de la sangre por centrifugación y lavadas con PBS-glucosa (10 mM fosfato, 140 mM NaCl, 5 mM KC1, 0,5 mM EDTA, 5 mM D-glucosa, pH 7,4).

Las membranas fueron preparadas a partir de los eritrocitos por lisis hipotónica. Los eritrocitos fueron incubados 30 min en hielo en 50 volúmenes de buffer de lisis E que contiene (5 mM de fosfato, 1 mM EDTA, pH 7,4). Luego de la lisis las membranas fueron lavadas por centrifugación/resuspensión a 20.000 xg con buffer de lisis E hasta la desaparición de hemoglobina.

#### **4.5 OBTENCION DE MEMBRANA DE ERITROCITOS DE CERDO**

Membranas de eritrocitos de cerdo se aislaron por lisis hipoosmótica como lo describe Cura y col., (2008). Sangre de cerdo (1,5lt) fue centrifugada a 3.000 xg por 5 min, los eritrocitos fueron lavados con 150 mM NaCl y lisados en 1 mM de EGTA, 10 mM Tris-Cl pH 7,4 a 4 °C (buffer E). El hemolisado fue centrifugado a 16.000 xg por 20 min. El pellet fue lavado con el buffer E hasta la obtención de las membranas libres de hemoglobina, luego resuspendidas en Hepes-K 10 mM y almacenadas en nitrógeno líquido hasta ser utilizadas.

#### **4.6 OBTENCION DE MEMBRANA PLASMATICA DE VESICULA DE CEREBRO DE RATA (PMVs)**

Los PMVs fueron obtenidos según lo describe Michaelis y col., (1983) con algunas modificaciones. Los cerebros de ratas, Swiss Albino de entre 25 y 30 días de edad, con un peso promedio de 250 gr. adultas fueron resuspendidos para su homogenización en 10 volúmenes de buffer I (10 mM de HEPES/KOH, 0,32 M sacarosa, 0,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM β-Mercaptoetanol, pH 7,4) a 4°C; el homogenato fue centrifugado a 1.500 xg durante 10 min, para lograr separar el tejido conectivo de las células, el sobrenadante fue centrifugado a 20.000 xg por 20 min, el precipitado obtenido fue resuspendido en buffer I y sometido a centrifugación diferencial en un gradiente de sacarosa preparado con 3 ml de solución al 40% (P/V) y 3 ml de 20 % (P/V). Después de la centrifugación por 45 minutos a 63.000 xg los sinaptosomas fueron colectados de la interfase (20/40) del gradiente de sacarosa y resuspendidas en 25 vol. de 10 mM HEPES/KOH, pH 7,4, centrifugados nuevamente a 20.000 xg por 30 min, el precipitado obtenido fue resuspendido en 100 volúmenes de la solución de lisis (10 mM de HEPES/KOH, 1 mM EDTA, 2 mM β-mercaptoetanol pH 7,4) a 4 °C por 45

min. Luego, fue centrifugado a 20.000 xg por 30 min, el precipitado obtenido fue resuspendido en 10 mM HEPES/KOH, pH 7,4, a una concentración final de 5 µg de prot/µl. Todo el procedimiento fue realizado con 1 mM de PMSF para evitar proteólisis. La suspensión fue conservada a -80 °C para su posterior utilización.

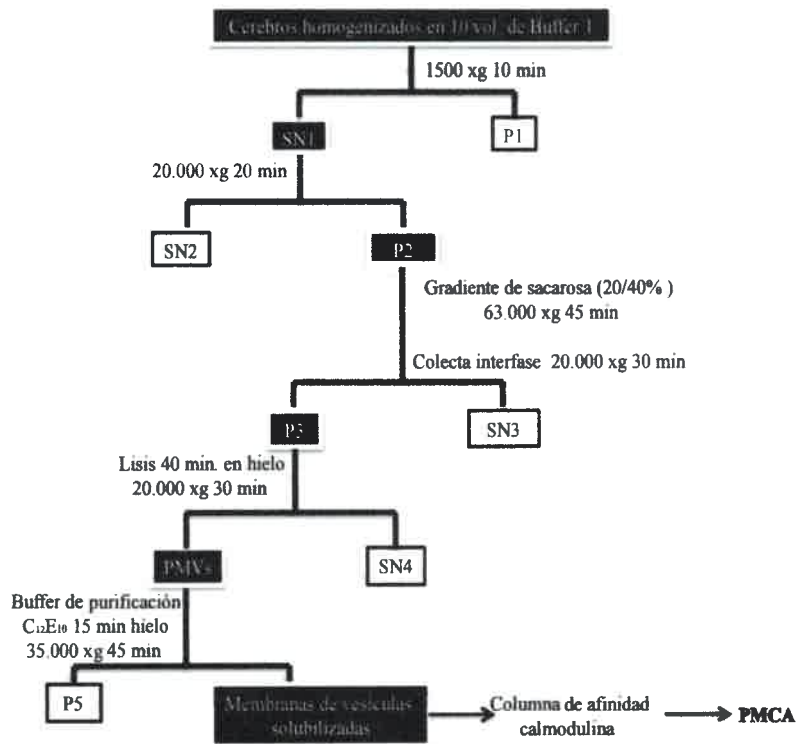


Figura 13: Esquema del procedimiento para la obtención de PMVs y PMCA. SN: sobrenadante; P: precipitado.

#### 4.7 PURIFICACIÓN DE PMCA

PMCA fue purificada de PMVs según el método de Salvador y Mata (1996) con modificaciones. Los PMVs (45 mg de proteína) se suspendieron en 10 ml de 20 mM HEPES/KOH, pH 7,40, 20% de glicerol, 130 mM KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1 mM PMSF y 0,5 mM de CaCl<sub>2</sub> ("buffer de purificación"). Luego, la membrana se solubilizo a 4° C durante 10 min por adición lenta de C<sub>12</sub>E<sub>10</sub> (2 mg de detergente por mg de proteína total de la membrana) con 0,1% de L-α-fosfatidilcolina XVI (PC). La membrana soluble en detergente se centrifugó a 100.000 xg por 30 min a 4°C. La



fracción sobrenadante se usó para purificar PMCA por cromatografía de afinidad a calmodulina tal como lo describe Niggli y col. (1979). Después de la eliminación de proteínas contaminantes PMCA se eluyó con un buffer similar al "buffer de purificación", excepto que 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> fue sustituido por 1 mM EGTA y utilizamos C<sub>12</sub>E<sub>10</sub> a una concentración final de 0,05%. Las fracciones eluidas que contenían las concentraciones más altas de PMCA (detectada por Western blot), se agruparon en una alícuota y se almacenaron en N<sub>2</sub> líquido. Todos los procedimientos y tratamientos para el manejo de los animales fueron revisados y aprobados por el comité de ética del CONICET (Res. Número 1806-1804).

#### 4.8 MEDICION DE LA ACTIVIDAD PMCA

La actividad PMCA fue determinada por cinco métodos diferentes según el diseño del experimento:

##### 4.8.1 Captación de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>

La metodología utilizada para medir la actividad PMCA por transporte de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> fue medida según lo describe Adamo y col., (1998), sujeto a modificaciones. La mezcla de reacción conteniendo los PMVs (50-75 µg de proteínas) en 0,3 ml de buffer de transporte I ( 50mM de Tris-HCl, pH 7,4; 100 mM ClK, 20 mM PO<sub>4</sub>Na<sub>3</sub>, 95 µM EGTA, 5 mM NaN<sub>3</sub>, 400 nM thapsigargin, 2,5 mM Cl<sub>2</sub>Mg y <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> (1 x 10<sup>5</sup>dpm/nmol)) para tener una concentración libre de Ca<sup>2+</sup> de 10 µM. Estas concentraciones libres de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> fueron calculadas usando el programa de Fabiato y Fabiato (1979). Los PMVs fueron preincubadas a 37 °C durante 5 minutos, la reacción fue iniciada por la adición de 1,5 mM ATP y detenida luego de 5 minutos por filtración a través de filtros de 0,45 µm. El <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> captado por los PMVs fue luego determinado por cuantificación en el contador de centelleo líquido. En los PMVs de cerebro la actividad de PMCA fue estimada luego de descontar el valor de la actividad en ausencia de ATP.

##### 4.8.2 Hidrolisis de [<sup>32</sup>P] ATP

La actividad Ca<sup>2+</sup>-ATPasa se estimó a partir de la liberación de [<sup>32</sup>P] Pi a partir de la hidrólisis de [<sup>32</sup>P] ATP a 37 °C, como describe Cura y col., (2008).

PMCA purificada de eritrocitos (1  $\mu\text{g}$ ) fue reconstituida con 0.83% de PC o una mezcla de lípidos ácidos (BE), posteriormente incubado con tubulina durante 20 min a 37 °C; la preparación se adiciono al buffer de reacción en un volumen final de 0,30 ml que contiene: 50 mM HEPES-K (pH 7,0 a 37 °C), 100 mM KCl, 4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500  $\mu\text{M}$  EGTA y  $\text{CaCl}_2$  para obtener una concentración de calcio libre de 1  $\mu\text{M}$ , calculada utilizando el programa *WEBMAXC STANDARD*. Luego de 5 minutos a 37 °C la reacción es iniciada por la adición de 3 mM ATP. La reacción fue detenida por la desnaturalización con ácido después de 20 minutos. La actividad de PMCA fue calculada restando los valores de hidrolisis de [ $^{32}\text{P}$ ] Pi obtenidos en ausencia de calcio.

#### 4.8.3 Sistema enzimático acoplado

La actividad enzimática se midió con el sistema acoplado de enzimas piruvato kinasa-lactato deshidrogenasa (East y Lee, 1982). Este procedimiento se basa en el acoplamiento de la hidrólisis de ATP por la ATPasa con la oxidación de NADH (en relación estequiométrica 1/1), mediante la acción conjunta de piruvato kinasa y lactato deshidrogenada. Como el NADH absorbe a 340 nm, su oxidación puede seguirse midiendo la disminución de esta absorbancia con el tiempo. Las reacciones tienen lugar de la siguiente manera:

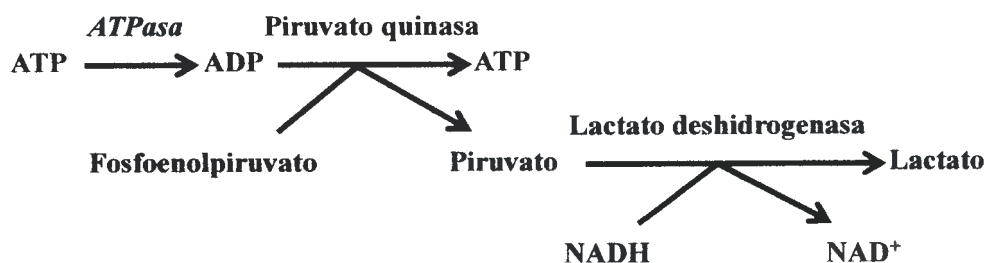


Figura 14: esquema de reacciones enzimáticas que se producen en el sistema acoplado de enzimas piruvato-quinasa lactato deshidrogenasa.

Muestras de PMCA purificada (5-10  $\mu\text{g}$ ) fueron reconstituidas con los lípidos especificados en cada experimento en un radio de 5,33 mg de lípido/mg de proteína, o PMVs (0,25 mg) posteriormente incubado con tubulina en los experimentos en los

cuales se detalla durante 20 min a 37 °C; Luego la preparación se adiciono al buffer de reacción en un volumen final de 0,34 ml que contiene: 50 mM de HEPES/KOH, pH 7,4; 100 mM ClK; 5 mM NaN<sub>3</sub>, 2 mM Cl<sub>2</sub>Mg; 0.22 mM NADH; 0.42 mM fosfoenolpiruvato; 3,4 I.U piruvato kinasa y 9,5 I.U lactato deshidrogenasa y el calcio necesario para alcanzar una concentración de Ca<sup>2+</sup> libre igual 2,4 μM (establecido por CaCl<sub>2</sub>/EGTA), calculada utilizando el programa *WEBMAXC STANDARD*. Luego de 5 minutos la reacción es iniciada por la adición de 1 mM ATP. La reacción es llevada a cabo en baño termostatzado a 37 °C.

La actividad fue calculada como la diferencia en la hidrolisis de ATP de muestras incubadas en presencia y ausencia de PMCA (también se sustrae la diferencia de actividad en presencia y ausencia de calcio).

La actividad fue también ensayada en presencia de tubulina; en este caso la tubulina fue pre-incubada 20 min con PMCA reconstituida en lípidos y luego adicionada a la mezcla de reacción.

#### *4.8.4 Determinación de la concentración de calcio incorporado en PMVs con Fura 2AM.*

Se realizó mediante el método Fura-2 AM de Grynkiewicz y col., (1985) con algunas modificaciones. Los PMVs obtenidos como se ha descrito anteriormente fueron resuspendidos en HEPES 10 mM e incubados con 10 μM Fura-2AM, durante 30 min a 30 °C con agitación suave. Luego fueron lavados por centrifugación y resuspensión en HEPES 10 mM para la eliminación de Fura-2AM excedente. Para la realización de las mediciones 0,15 mg de PMVs fueron resuspendidos en buffer de transporte II conteniendo: 50 mM de Tris-ClH, pH 7,4, 100 mM ClK, 75 μM EGTA, 5 mM NaN<sub>3</sub>, 400 nM thapsigargin, 2,5 mM Cl<sub>2</sub>Mg y 0,1 mM CaCl<sub>2</sub> para tener una concentración libre de Ca<sup>2+</sup> de 4 μM. La excitación utilizada fue 340 nm y 380 nm; la emisión fue medida en 510 nm. La fluorescencia de Fura-2 en respuesta de la concentración intracelular de calcio ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) se ha calibrado del radio de proporción de 340/380 nm (fura libre es excitado a 340 nm y fura unido a calcio a 380 nm, ambos emiten a 510 nm) después de restar los valores de fluorescencia de fondo en las células en 340 nm/380 nm, según lo descrito por Grynkiewicz y col., (1985).

$$[Ca^{2+}] = K_d (R - R_{\min} / R_{\max} - R) \times (S_f / S_b)$$

Donde  $K_d$  constante de disociación de fura 2AM, en el buffer utilizado la misma tiene un valor de 224  $\mu\text{M}$ ; R es el cociente de las lecturas a las longitudes de onda utilizadas (340/380 nm);  $R_{\max}$  y  $R_{\min}$  se calcularon midiendo el cociente de fluorescencia a 340 nm y 380 nm, de una solución saturada de calcio y fura, y de una solución sin  $Ca^{2+}$  y con EGTA respectivamente.  $S_f/S_b$  es el cociente de fluorescencia a 380 nm de una solución sin calcio, dividida por el de la saturada.

#### *4.8.5 Determinación de la concentración de calcio en el citoplasma de las células vivas*

La metodología utilizada fue la descrita por Gryniewicz y col., (1985). Las células CAD, COS y eritrocitos (hematocrito de 0.1%), fueron cultivadas o tratadas como se ha descrito anteriormente. Luego se lavaron con buffer A (5 mM HEPES, pH 7,4, 135 mM NaCl, KCl 5,4 mM, 1,8 mM  $MgCl_2$ , 10 mM D-glucosa) dos veces y se resuspendieron en el mismo buffer a una densidad de  $1 \times 10^9$  cells/ml<sup>1</sup> adicionado con 10  $\mu\text{M}$  Fura-2 AM. La suspensión fue incubada durante 30 min a 37 °C con agitación suave. Luego las células fueron lavadas dos veces con buffer A (sin Fura-2 AM) para la eliminación del Fura excedente y resuspendido en una densidad de  $1 \times 10^9$  cells/ml<sup>1</sup>. Para las mediciones de fluorescencia, cada suspensión se cargó en una cubeta (densidad final  $5 \times 10^7$  cells/ml<sup>1</sup>), en buffer A adicionado con 140  $\mu\text{M}$   $CaCl_2$ , 100  $\mu\text{M}$  EGTA y 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin, la actividad es medida en Fluoromax -3-Jobin Yvon Horiva Espectrofluorímetro, conteniendo un baño termostatzado a 30 °C.

La excitación fue en 340/380 nm y la emisión fue medida a 510 nm. La fluorescencia de Fura-2 en respuesta de la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) se ha calibrado del radio de proporción de 340/380 nm después de restar los valores de fluorescencia de fondo de la fluorescencia de las células en 340/380 nm, según lo descrito por Gryniewicz y col., (1985).

#### **4.9 INMUNOFLUORESCENCIA**

Células CAD fueron cultivadas en cubreobjetos y fijadas con metanol a -20 °C. Las muestras fueron rehidratadas incubadas con el 2% de BSA (albúmina sérica bovina) en NaCl/Pi durante 60 min y marcadas para inmunofluorescencia indirecta utilizando mAb 6-11B-1 (anti-tubulina acetilada, dilución 1: 600) NaCl/Pi con 1 % de BSA. Fluoresceína-conjugado de IgG anti-ratón (dilución 1: 400) se utilizó como anticuerpo secundario. Los cubreobjetos fueron montados en Fluor Save y observados por epifluorescencia con microscopio confocal Zeiss LSM.

#### **4.10 PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS UNIDOS A SEFAROSA**

Los anticuerpos 6-11B-1, 5F10 y fosfatidilinositol 3-kinase p110 fueron unidos covalentemente a sefarosa 4B activada con bromuro de cianógeno haciendo algunas modificaciones al procedimiento utilizado por Hubert y col., (1986). Las perlas de sefarosa fueron lavadas con 100 volúmenes de 0,001 M HCl a 21°C. Las perlas activadas se mezclaron con 2,5 mg de proteína de los anticuerpos; 6-11B-1 (u otro anticuerpo) en 1 ml de buffer de acoplamiento (0,5 M de NaCl; 0,2 M de NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,2). La mezcla se agita en una plataforma 4 hs a 21 °C, luego fue colocada en una pequeña columna de cromatografía. Los anticuerpos no unidos son eliminados por el lavado con 5 ml de buffer de acoplamiento. Los anticuerpos unidos a las perlas de sefarosa fueron resuspendidos en 1 ml de buffer de acoplamiento adicionado con 0,2 M de glicina para bloquear las perlas que no se han unido al anticuerpo, luego se incubo por 2 horas a 21 °C. La glicina no unida, fue separada por lavados con 10 ml de buffer de acoplamiento. El anticuerpo unido a la sefarosa resultante fue lavado con 1,5 ml de 0.01 mM Tris-HCl, pH 8, conteniendo 0,14 M NaCl y 0,025 % de NaN<sub>3</sub> y conservado a 4 °C para su utilización (con un máximo de 2 días).

#### **4.11 PROCEDIMIENTO DE IMMUNOPRECIPITACION**

PMVs fueron solubilizados con TBS conteniendo 150 mM NaCl y 50 mM Tris/HCl pH 7,4 adicionado con 0,5 % de Tritón X-100 y centrifugados para eliminar el material insoluble. Alícuotas (0,3 ml) fueron tomadas y mezcladas con 0,15 ml de anti-

tubulina acetilada o anti- PMCA unido a las perlas de sefarosa e incubadas durante 4 horas a 20 °C. Las muestras fueron centrifugadas y el material precipitado fue lavado 5 veces con TBS adicionado 0,1% de Tritón X-100. Fracciones de 50 µl de las perlas fueron resuspendidas en 50 µl de buffer de Laemmli (1970), calentadas a 50°C por 45 minutos y centrifugadas. Alícuotas de 20 µl de la fracción soluble fueron sujetas a SDS/PAGE. Un control fue corrido paralelamente usando el anticuerpo monoclonal anti fosfatidilinositol 3- Kinasa unido a sefarosa en lugar de anti-tubulina acetilada o anti-PMCA.

#### **4.12 OBTENCION Y DETERMINACION DEL COMPLEJO TUBULINA ACETILADA/PMCA.**

El complejo tubulina acetilada/PMCA fue aislado con Tritón X-114 como describe Nuñez-Fernandez y col., (1997) con algunas modificaciones. Los PMVs fueron lavados una vez con TBS pH 7,4 e inmediatamente solubilizadas por 30 minutos a 0 °C en 1 ml de TBS adicionado con 1 % de Tritón X-100, luego la preparación fue centrifugada a 100.000 xg por 15 min Triton X-114 se añadió a la fracción sobrenadante (1 % concentración final). La mezcla de reacción conteniendo PMCA (10 µg de prot.) reconstituida en lípidos, fue adicionada con tubulina, en la concentración que se indica en el experimento se incubo 20 minutos y luego para la obtención de tubulina hidrofóbica se adiciono, Triton X-114 al 1% de concentración final. Para la separación de las fases, las preparaciones fueron calentadas durante 5 minutos a 37 °C y centrifugadas a 600 xg por 5 minutos. La fase inferior rica en detergente conteniendo el complejo tubulina acetilada fue lavada con TBS pH 7,4 Alícuotas fueron tomadas para su análisis por electroforesis e inmunoblot.

#### **4.13 ELECTROFORESIS E INMUNOBLOT**

##### **4.13.1 Electroforesis**

La separación de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS de acuerdo a lo descrito por Laemmli (1970), El procedimiento se basa en la separación de proteínas en función de su peso molecular.

En los experimentos que se requiere identificar a PMCA utilizamos gel de poliacrilamida al 8% y al 10 % cuando queremos determinar tubulina. Previo a la siembra del gel, las muestras fueron calentadas a 50 °C por 45 min en presencia de 5 % de SDS y 5 % de 2 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol.

#### **4.13.2 Tinción de geles**

Tras la electroforesis, el gel se sumergió en una solución de azul Coomassie R-250 al 0,1 % (P/V), metanol al 40 % y ácido acético al 10 % durante 3 hs y posteriormente en una solución de decoloración que contiene 40% de metanol, 10% de ácido acético en agua, hasta la decoloración y visualización de las bandas de proteína. El proceso se realizó a temperatura ambiente y agitación.

#### **4.13.3 Western blot**

El ensayo de western blot nos permite la detección e identificación de las proteínas separadas por electroforesis mediante anticuerpos específicos.

Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (sigma®), La eficiencia de la transferencia en la membrana se comprobó mediante la tinción de proteínas de Ponceau S (Ponceau S al 0,1% (p/v), ácido acético al 5%) durante 5 min, observando las proteínas en color rojo. Posteriormente, se eliminó la tinción con varios lavados en TBS.

La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas, se incubó con leche descremada/TBS-T (TBS adicionado con 0,1 % de Tritón X-100) pH 7,4 durante 30 min a temperatura ambiente y en agitación para bloquear los sitios de unión inespecíficos para los anticuerpos. Tras realizar un lavado con TBS-T para eliminar los restos de la solución de bloqueo, la membrana fue incubada 2 hs a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal de ratón DM1A (dilución 1/1000) para determinar  $\alpha$ -tubulina; 6-11B-1 (dilución 1/1000) para determinar tubulina acetilada (Piperno y col., 1985), o anticuerpo monoclonal de ratón 5F10(dilución 1/1000) para determinar PMCA (Caride y col., 1996 ); anticuerpo monoclonal de ratón JA9 (dilución 1/1000) para determinar la isoforma 4 de PMCA (Sepúlveda y col., 2004). Luego de tres lavados con

TBS-T durante 10 min la membrana de nitrocelulosa fue incubada con el anticuerpo secundario: IgG-peroxidasa anti ratón para revelar los anticuerpos DM1A, 6-11B-1, JA9 y 5F10 durante 1 hora. Luego de 3 lavados con TBS de 1 min, el revelado de las membranas de nitrocelulosa fue realizado por medio de la reacción de la peroxidasa en presencia de 4-cloro-1-naftol y peróxido de hidrógeno (12,5 mg de 4-metoxi-1-naftol en 1 ml de metanol frío, se añadieron a 20 ml de TBS frío adicionado con 4 ml de metanol y 20 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%) o utilizando el kit ECL Western Blotting Detection Kit (Amersham), siguiendo las indicaciones del fabricante. La intensidad de las bandas de tubulina fueron cuantificadas por digitalización con el software *SCIÓN IMAGING*.

#### 4.14 OBTENCION DE TUBULINA

La tubulina fue obtenida a partir de cerebros de rata adulta con alto y bajo contenido de tubulina acetilada, por el método descrito por Casale y col., (2003). Los cerebros fueron lavados con buffer MEM (100 mM Mes, pH 6,7, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, y 1 mM EGTA). Se colocaron en homogeneizador (1 gr. de tejido/0,8 ml de buffer MEM) y se homogeneizó (15 veces) a 4°C. El homogenato se centrifugó a 100.000 xg durante 40 min a 4 °C. Al sobrenadante se le adicionó 40 % de glicerol y se lo incubó 20 min a 37 °C. Luego de esta incubación la muestra conteniendo formación de microtúbulos, se centrifugó a 70.000 xg durante 30 min y se resuspendió el precipitado en buffer MEM a 4 °C (conteniendo tubulina y las MAPs), a partir de esta preparación se purificó la tubulina por pasaje en columna intercambio iónico conteniendo fosfocelulosa.

Alternativamente, para obtener una preparación de tubulina con alto contenido de isotipo acetilado, al homogenato de cerebro se le adicionó 5 mM CaCl<sub>2</sub> en reemplazo de MgCl<sub>2</sub>, se centrifugó y al sobrenadante se le agregó 10 mM EGTA y 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Así se obtuvo una muestra de tubulina con aproximadamente 4 veces más de tubulina acetilada.

#### 4.15 OBTENCIÓN Y MEDICION DE ACTIVIDAD DE PLC

Fosfolipasa C hemolítica fue obtenida del sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa* crecida aeróbicamente, con agitación en un medio salino mínimo con el agregado 20



mM de succinato y 20 mM colina. Luego del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* obtuvimos el sobrenadante del cultivo por centrifugación y a partir de este realizamos la pre-purificación. Fosfolipasa C fue pre-purificada por cromatografía en fase reversa en tierra de diatomeas (celite-545 Mallinckrodt Baker, NJ, USA) como fue descrito por Liffourrena y col., (2007). Fracciones que contienen actividad PLC fueron identificadas utilizando sustrato artificial *p*-NPPC (*p*-nitrofenilfosforilcolina), 10 mM como sustrato en presencia de 100 mM Tris-HCl, pH 7,4 y 36 % (v/v) de glicerol. Una unidad de PLC es definida como la cantidad de enzima que libera 1 nanomol de *p*-nitrofenol de *p*-NPPC por minuto a 37 °C.

#### **4.16 DETERMINACION DE PROTEINAS**

La concentración de proteínas fue realizada utilizando el método de Bradford (1976), usando albúmina sérica bovina como testigo.

#### **4.17 ANALISIS ESTADISTICO**

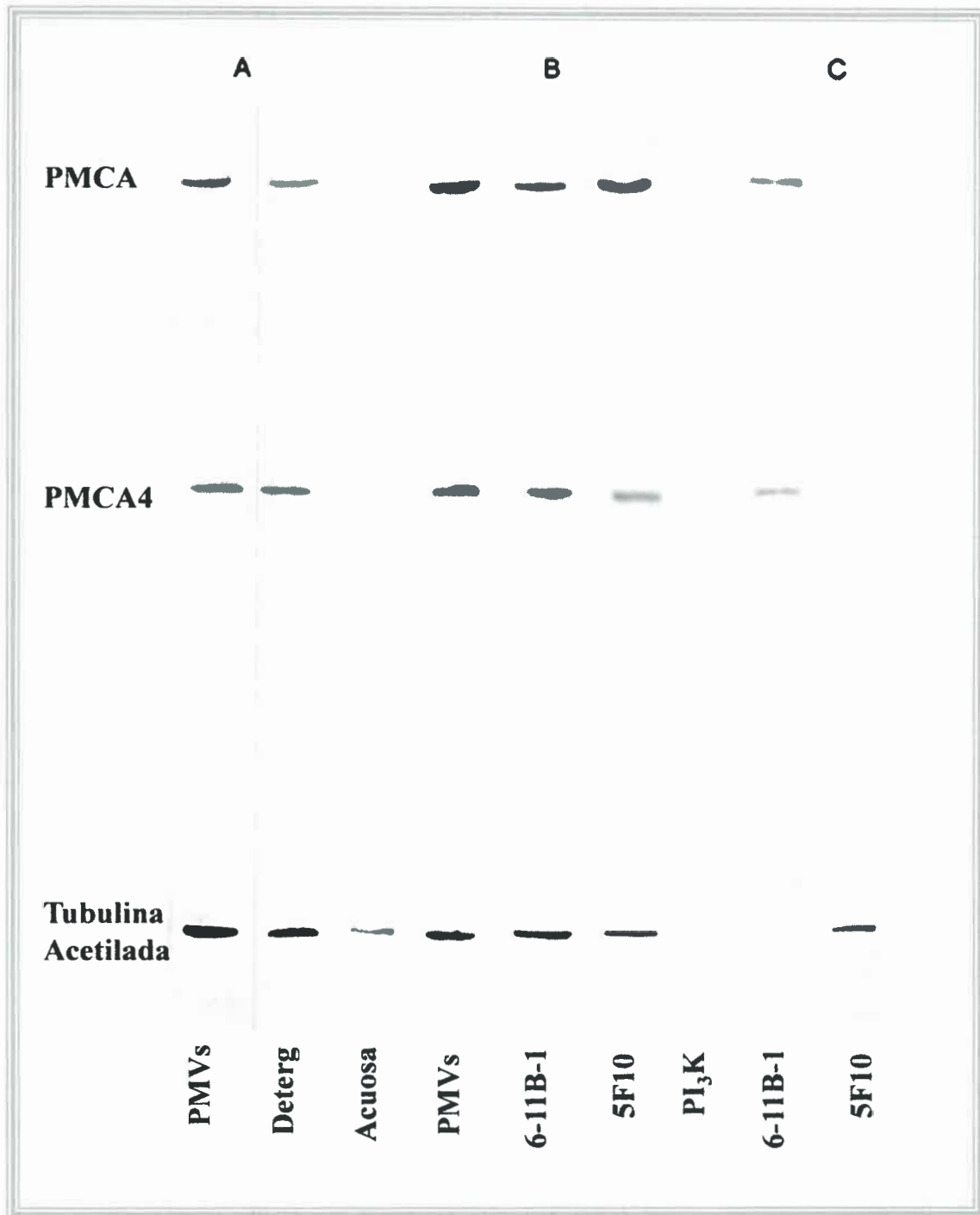
Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  S.D. Los test ANOVA y Student. Las diferencias en los resultados se consideró estadísticamente significativa para  $P \leq 0,05$ .

*Resultados*

### 5.1 Presencia del complejo tubulina acetilada/PMCA en membrana plasmática de vesículas de cerebro de rata

Debido a que se conoce que la isoforma acetilada de la tubulina es capaz de interaccionar con  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa (NKA) y tanto NKA como PMCA son miembros de la misma familia de ATPasas, se propuso determinar si la tubulina acetilada es capaz de asociarse también con PMCA. Para ello se analizó por western blot la presencia de PMCA y tubulina acetilada en una preparación de membrana plasmática de vesículas (PMVs) usando los anticuerpos 5F10, el cual reconoce todas las isoformas de PMCA, JA9, específico para la isoforma 4 de PMCA y 6-11B1, específico para tubulina acetilada. Como se observa en la figura 15A, tanto la tubulina acetilada como PMCA estuvieron presentes en PMVs (Fig. 15A "PMVs"). Luego de la partición con Triton X-114, toda la PMCA fue encontrada en la fase detergente dada su localización en membrana plasmática (Fig. 15 A "Deterg"), mientras que tubulina acetilada fue encontrada principalmente en la fase detergente y una pequeña fracción en la fase acuosa (Fig. 15 A). Estos resultados demuestran que ambas proteínas se encuentran en la misma fracción por lo tanto podría establecerse una interacción entre ambas.

Para investigar la posible asociación de tubulina acetilada con PMCA, se realizaron experimentos de inmunoprecipitación usando los anticuerpos correspondientes unidos a perlas de sefarosa. Como control de la especificidad de la inmunoprecipitación, se utilizó el anticuerpo contra fosfatidilinositol 3 quinasa unido a las perlas de sefarosa debido a que esta proteína no está involucrada en la asociación estudiada. La figura 15 B (línea 1) muestra que tanto PMCA como tubulina acetilada están presentes en las membranas solubilizadas antes de la inmunoprecipitación. Cuando las membranas solubilizadas fueron inmunoprecipitadas con el anticuerpo 6-11B1 Ig (anti-tubulina acetilada) unido a sefarosa, PMCA, PMCA4 y tubulina acetilada fueron detectadas en el precipitado (Fig. 15 B, línea 2). Estas proteínas también fueron detectadas en el precipitado cuando la inmunoprecipitación se realizó con el anticuerpo 5F10. (Fig. 15 B, línea 3). Sin embargo, ninguna de estas proteínas fue precipitada cuando se utilizó el anticuerpo anti- fosfatidilinositol 3 quinasa unido a las perlas de sefarosa (Fig. 15, línea 4).



**Figura 15: Determinación del complejo tubulina acetilada/PMCA en PMVs de cerebro de rata.** (A) Se analizaron PMVs por Western Blot, utilizando los anticuerpos 5F10 (contra todas las isoformas de PMCA), JA9 (anti-PMCA4) y 6-11B-1 (anti-tubulina acetilada). Otra muestra de la misma preparación de membrana fue particionada en Triton X-114 para determinar tubulina acetilada hidrofóbica y tubulina hidrofílica, como se describe en procedimientos experimentales. Alícuotas de la fase detergente (Deterg) y fase hidrofílica (acuosa) fueron sometidos a Western Blot y revelados con el anticuerpo 5F10 (superior), JA9-Ig (medio) y 6-11B-1 Ig (inferior). (B) PMVs fueron solubilizadas con 0,5 % Triton X-100 (línea 1) y luego inmunoprecipitadas con perlas de sefarosa unidas a 6-11B-1 Ig (línea 2), 5F10 Ig (línea 3) o anti-fosfatidilinositol 3 kinasa (línea 4). El material inmunoprecipitado fue analizado luego con los anticuerpos indicados en la figura. (C) Fracciones del sobrenadante del experimento de inmunoprecipitación descrito en (B) En todos los casos, los volúmenes de muestra sembrados fueron calculados para ser representativos de la misma cantidad de PMVs.

Las fracciones del sobrenadante de la inmunoprecipitación, fueron también analizadas. Como muestra la figura 15 C (línea 2), cuando se usó el anticuerpo 6-11B-1 como precipitante, no se encontró tubulina en el sobrenadante de la inmunoprecipitación, indicando que toda la tubulina acetilada fue inmunoprecipitada. Por otro lado, si bien el anticuerpo 6-11B-1 pudo precipitar a PMCA, parte de esta proteína quedó en estado soluble. Por el contrario, cuando las perlas de sefarosa fueron unidas al anticuerpo 5F10 (Fig. 15 C, línea 3), no se detectó PMCA en el sobrenadante, mientras que parte de la tubulina acetilada si fue detectada. La cuantificación de las bandas de tres experimentos independientes, muestra que aproximadamente el 65 % de PMCA y el 50 % de tubulina acetilada presentes en los PMVs forman parte del complejo tubulina acetilada/PMCA. Estos resultados indican que tubulina acetilada y PMCA forman parte del mismo complejo inserto en los PMVs y que al menos PMCA4 es una de las isoformas presentes en el complejo.

## **5.2 Efecto de etanol y calmodulina sobre el complejo tubulina acetilada/PMCA**

En otras P-ATPasas diferentes de PMCA, como la NKA y H<sup>+</sup>-ATPasa, es conocido que al ser activadas, los efectores disocian el correspondiente complejo tubulina acetilada/ATPasa (Casale y col., 2003, Campetelli y col., 2005). Por lo tanto se investigó si el etanol y/o calmodulina, dos importantes activadores de PMCA en sinaptosomas de cerebro de rata (Jarret y col., 1997; Gopinath y col., 1979, Benaim y col., 1994), inducen la activación de Ca<sup>2+</sup>-ATPasa a través del mecanismo observado para H<sup>+</sup> y NKA, es decir a partir de la disociación del complejo tubulina/PMCA. Con este propósito, se trataron PMVs con diferentes concentraciones de etanol y calmodulina y luego se determinó la cantidad de tubulina acetilada hidrofóbica, usando partición en Triton X-114 y western blot. Con estos efectores también se determinó la actividad de PMCA por medición de captación de <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>.

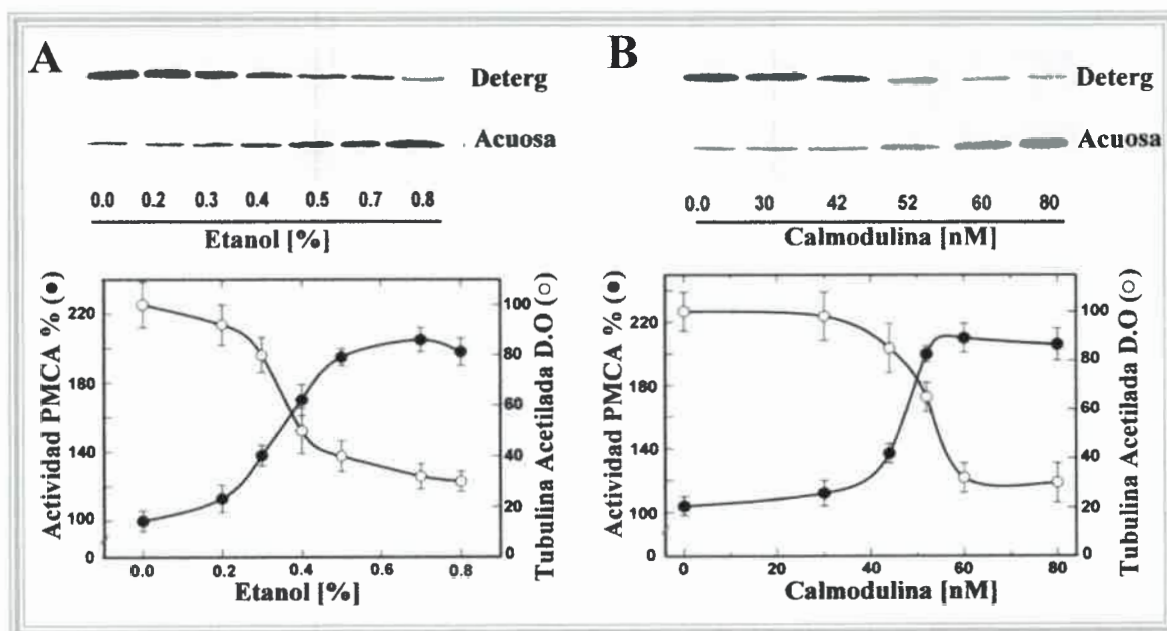
La figura 16 muestra que el tratamiento de PMVs con etanol o calmodulina produce una disminución de la cantidad de tubulina en la fase detergente.

Los inmunoblots de la figura 16 (panel superior) muestran que a medida que aumenta la concentración del efector utilizado disminuye la intensidad de las bandas de tubulina acetilada en la fase detergente, mientras que aumenta la intensidad de las

bandas en la fase acuosa, lo cual indica que la tubulina se disocia de la membrana y se vuelve hidrofílica.

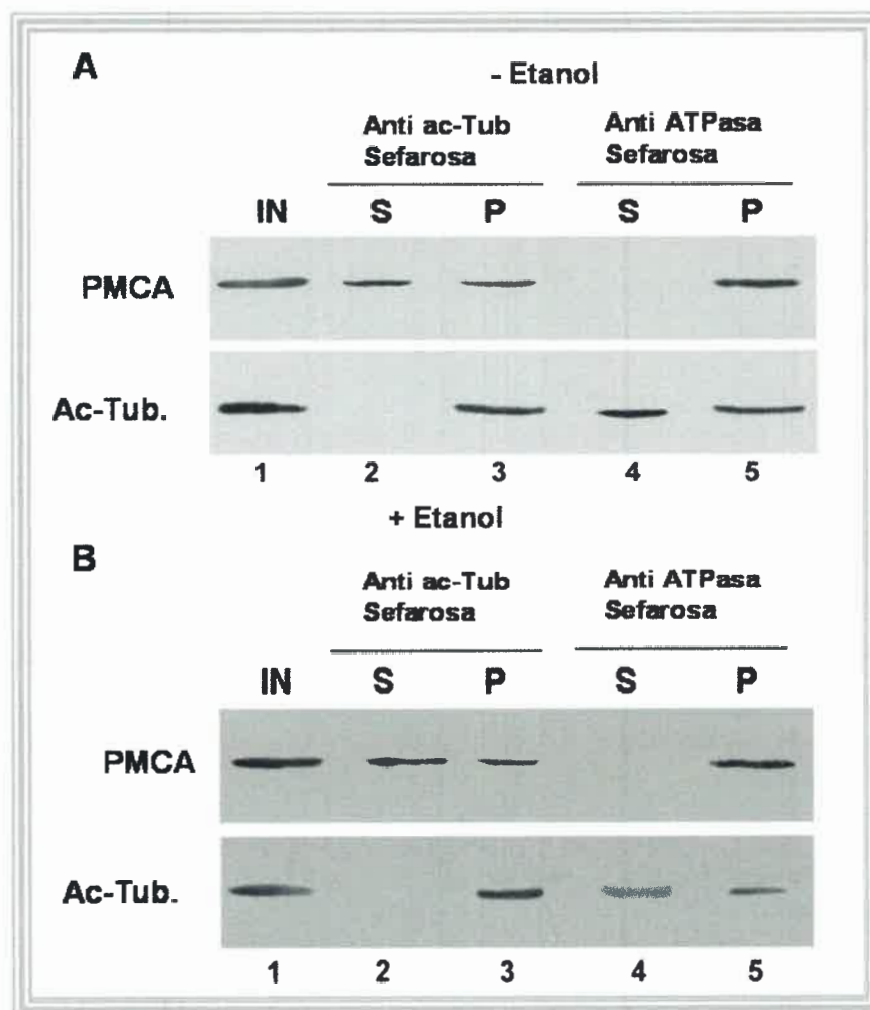
Con 0,6 % de etanol o 60 nM de calmodulina alrededor del 30 % de la tubulina acetilada permanece en las membranas. La disminución observada en la tubulina hidrofóbica podría ser consecuencia de la disociación del complejo tubulina acetilada/PMCA.

Por otro lado, el tratamiento con 0,6 % de etanol o 60 nM de calmodulina produce un incremento de hasta ~190 % del valor control en la actividad PMCA. La actividad de PMCA aumenta a medida que el complejo tubulina acetilada/PMCA es disociado, sugiriendo que etanol o calmodulina estimulan la actividad de la enzima a través de la disociación del complejo.



**Figura 16: Efecto de etanol y calmodulina sobre los niveles de tubulina hidrofóbica y la actividad PMCA.** PMVs (0,25 mg proteína/ml) fueron incubadas en el buffer de transporte 1 durante 20 min a 37 °C en presencia de diferentes concentraciones de etanol (A) o calmodulina (B). La cantidad de tubulina acetilada hidrofóbica, se determinó por partición en Tritón X-114 y posteriormente analizada por Western Blot reveladas con anticuerpo 6-11B-1-(tubulina acetilada). Las bandas de tubulina acetilada correspondientes a la fase detergente fueron escaneadas. La actividad PMCA fue determinada mediante la captación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (véase procedimientos experimentales). Los valores de absorbancia y actividades de PMCA se muestran en la parte inferior de los paneles. Los valores son la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes.

La disociación física del complejo tubulina acetilada/PMCA causada por etanol o calmodulina también fue ensayada por experimentos de inmunoprecitación. Los PMVs fueron tratados con 0,6 % de etanol, lavados por sedimentación y resuspensión, solubilizados con detergente e inmunoprecipitado con anti-tubulina acetilada unida a las perlas de sefarosa o anti-PMCA unida a las perlas de sefarosa (Fig 17).



**Figura 17: Efecto del etanol sobre los niveles del complejo tubulina acetilada/PMCA en PMVs.** PMVs fueron incubados en ausencia (A) o presencia (B) del 0,6% de etanol durante 20 minutos a 37 °C, y lavados por centrifugación. El pellet de las vesículas fue disuelto en Triton X-100 e inmunoprecipitado con anti-tubulina acetilada (anti-ac-tub sefarosa) o anti-PMCA (anti-ATPase sefarosa) como se describe en procedimientos experimentales. El material de entrada (IN), el sobrenadante (S) y el pellet (P), fueron analizados por SDS/PAGE seguido por inmunoblot revelado con anticuerpo contra tubulina acetilada o PMCA. Las bandas mostradas son representativas de tres experimentos independientes.

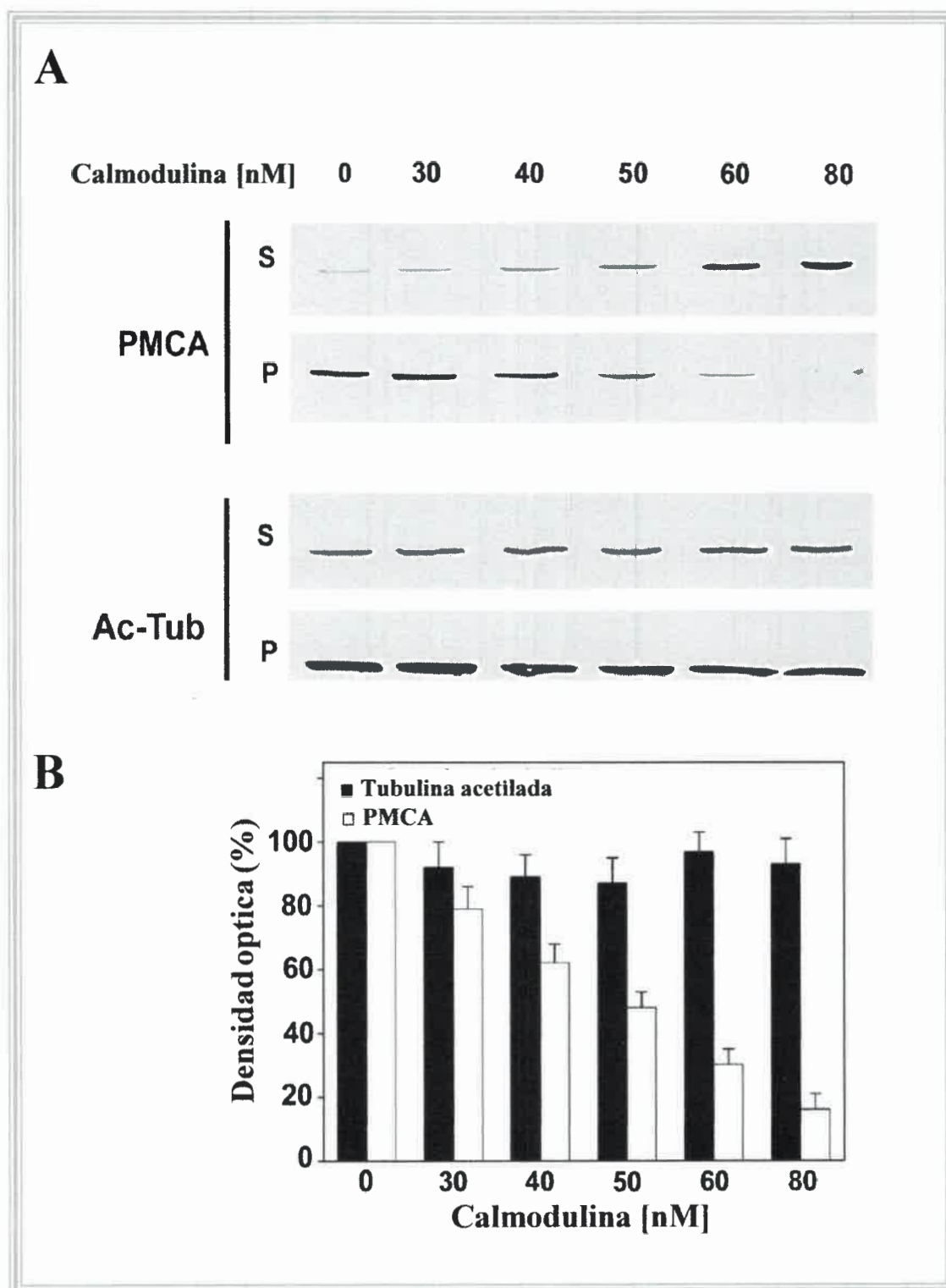
El inmunoprecipitado y la fracción soluble fueron analizadas por western blot y revelado con anticuerpos anti-PMCA o anti-tubulina acetilada. Comparando la intensidad de las bandas de PMCA en el material de entrada (Fig. 17 A, línea 1) con la cantidad de PMCA inmunoprecipitada con el anticuerpo anti-tubulina acetilada unida a sefarosa (Fig. 17 A, línea 3) se puede observar que el  $66 \pm 15$  % de PMCA en la membrana está asociada con tubulina acetilada.

La presencia de una banda de tubulina acetilada en la fracción soluble luego de la inmunoprecipitación con anti-PMCA unida a sefarosa (Fig. 17 A, línea 4) demuestra que parte de la tubulina acetilada de membrana no se encuentra asociada a PMCA, mientras que toda la PMCA presente en las membranas se encuentra en el precipitado (Fig. 17 A, línea 5).

El tratamiento con etanol provocó una disminución en el contenido de PMCA cuando se precipito con anti-tubulina acetilada, este resultado se observa claramente cuando se compara la intensidad de las bandas de PMCA de las membranas tratadas con etanol (Fig. 17 B, línea 3) con aquellas no tratadas (Fig. 17 A, línea 3). Esto sugiere que el tratamiento con el alcohol induce disociación del complejo tubulina acetilada/PMCA. La misma conclusión puede obtenerse de la comparación de la cantidad de tubulina acetilada precipitada con anti-PMCA entre membranas tratadas con etanol (Fig. 17 B, línea 5) y no tratadas (Fig. 17 A, línea 5). La cuantificación de las densidades de estas bandas muestra que la disociación del complejo causada por etanol es del  $60 \pm 8$  %.

El análisis de inmunoprecipitación entre tubulina acetilada y PMCA de membranas tratadas con calmodulina, el segundo efector de PMCA estudiado muestra que, cuando las membranas fueron pre-tratadas con concentraciones crecientes de calmodulina, solubilizadas con detergente e inmunoprecipitadas con anti-tubulina acetilada unida a sefarosa, la cantidad de PMCA encontrada en el precipitado disminuyó progresivamente (Fig. 18), el 50 % de disociación del complejo tubulina acetilada/PMCA se observó con concentraciones de calmodulina comprendidas entre 40 y 50 nM (Fig. 18, panel inferior). Este resultado es consistente con el porcentaje de activación de PMCA determinada a 50 nM (Fig. 16 B) reforzando la idea de que calmodulina induce activación de la actividad enzimática de PMCA por disociación del complejo.





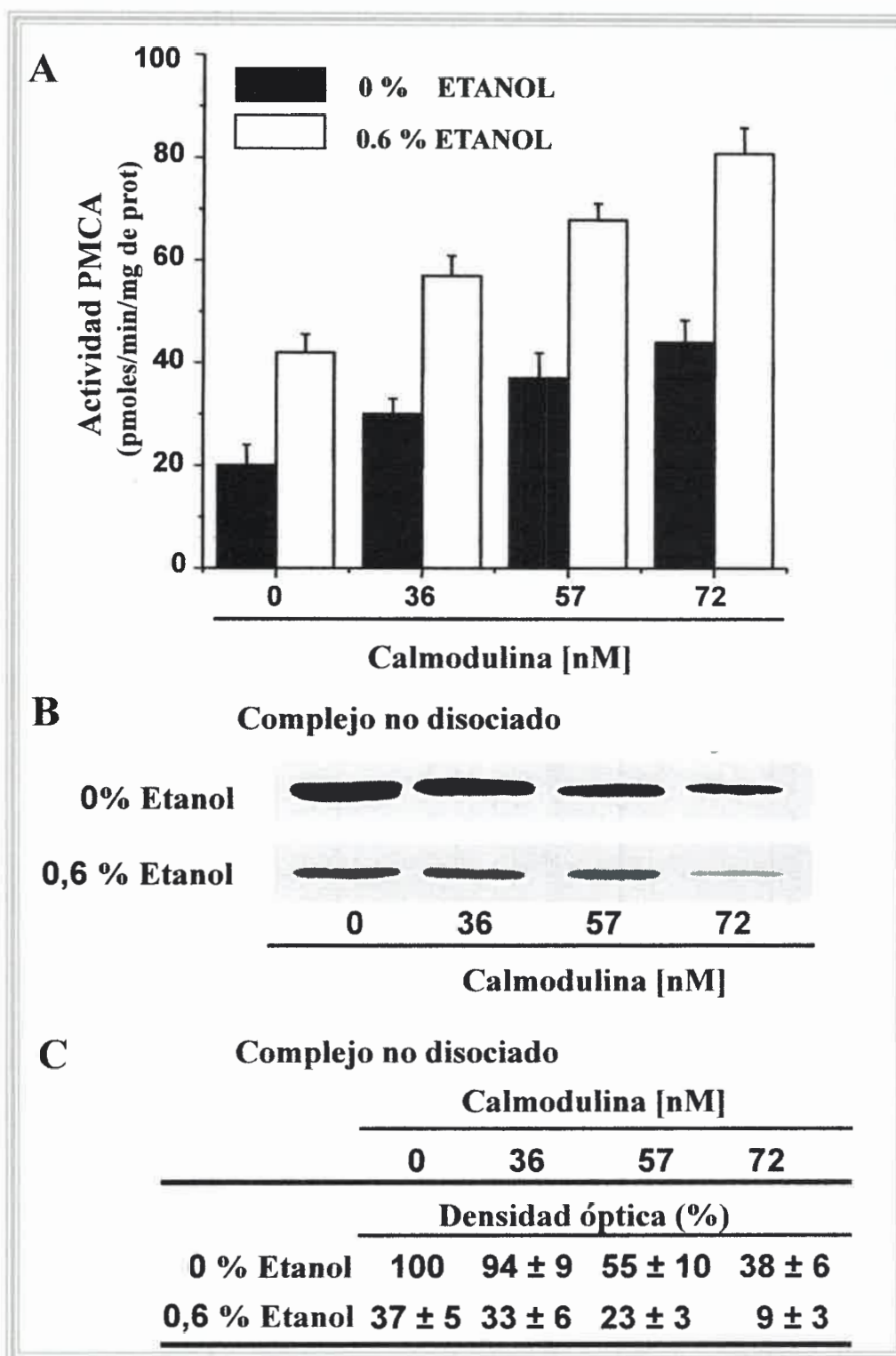
**Figura 18: Disociación del complejo tubulina acetilada/PMCA por calmodulina.** PMVs se incubaron en presencia de las concentraciones indicadas de calmodulina durante 20 min a 37 °C y posteriormente se solubilizaron por la adición de Triton X-100 (ver procedimientos experimentales). Alícuotas fueron inmunoprecipitadas con anti-tubulina acetilada unida a perlas de sefarosa. (A) Immunoblots de fracciones precipitado (P) y soluble (S) se revelaron con anticuerpo 5F10 (panel superior) o 6-11B-1 (panel inferior). (B) Las bandas de la fracción de precipitado mostradas en (A) fueron cuantificadas y los correspondientes valores de absorbancia de PMCA y tubulina acetilada fueron graficados. Los datos corresponden a la media ± S.D. de tres experimentos independientes.

### 5.3 Efecto de calmodulina sobre la actividad de PMCA y el complejo tubulina acetilada/PMCA luego del tratamiento con etanol

Es conocido que etanol y calmodulina tienen un efecto aditivo (Sepúlveda y col., 2004; Benaim y col., 1994; Cervino y col., 1998). Desde un punto de vista mecanístico, es de interés determinar si la disminución de complejo tubulina acetilada/PMCA determinado por separado para cada efector es también aditivo.

Para ello, PMVs fueron tratadas con 0 y 0,6 % de etanol y luego incubadas con concentraciones crecientes de calmodulina. Posteriormente los PMVs fueron utilizados para la determinación de la actividad de PMCA y la cantidad de tubulina acetilada remanente en la membrana (utilizada como medición del complejo tubulina acetilada/PMCA). El efecto estimulante de calmodulina y etanol sobre la actividad de PMCA fue aditivo (Fig. 19 A). Las bandas de tubulina acetilada fueron cuantificadas para cada condición experimental, los valores de densidad óptica de estas bandas son mostrados en la figura 19 B y C. Cuando los PMVs fueron tratados con ambos efectores, la cantidad de complejo fue significativamente menor que cuando los efectores fueron probados por separado. El tratamiento con efectores por separado (0,6 % de etanol o 72 nM de calmodulina) resulta en un 37 % de complejo no disociado (Fig. 19 C) y un 90 % de estimulación de la actividad enzimática de PMCA (Fig. 19 A). Luego de la adición de etanol y calmodulina a los PMVs, la actividad de PMCA fue estimulada a un grado mayor del esperado, basado en la disminución de complejo tubulina acetilada/PMCA.

El tratamiento con 0,6 % de etanol, seguido con 72 nM de calmodulina resulta una estimulación de la actividad enzimática del 300 % con respecto a los PMVs no tratados (Fig. 19 A). Por otro lado, el mismo tratamiento produce una reducción en los niveles de tubulina acetilada en la membrana del 90 %, reflejando la disociación del complejo (Fig. 19 C). La estimulación en la actividad PMCA no puede ser explicada solamente por la disociación del complejo. Como se mencionó anteriormente, aproximadamente el 33 % del total de la PMCA presente en los PMVs no forma parte del complejo (Fig. 15), por tanto la estimulación del 300 % observada sería consecuencia de la disociación del complejo y de un mecanismo adicional dependiente de etanol y calmodulina.



**Figura 19: Efecto aditivo de etanol y calmodulina.** PMVs (70  $\mu$ g proteína en 275 $\mu$ l de volumen final) fueron incubados en presencia y en ausencia de 0,6 % de etanol por 5 min a 37 °C, posteriormente se adicionó calmodulina a las concentraciones indicadas durante 10 min. Posteriormente PMVs fueron lavados y se tomaron alícuotas para medir la actividad de PMCA (A) y para cuantificar tubulina acetilada por western blot (B) las medidas de densidad de las bandas  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes son mostradas en (C). El valor de absorbancia de tubulina acetilada correspondiente a las PMVs tratadas con 0 % de etanol y 0 % de calmodulina fue tomado como el 100 %.

#### 5.4 Efecto de tubulina acetilada exógena sobre la actividad de PMCA en PMVs

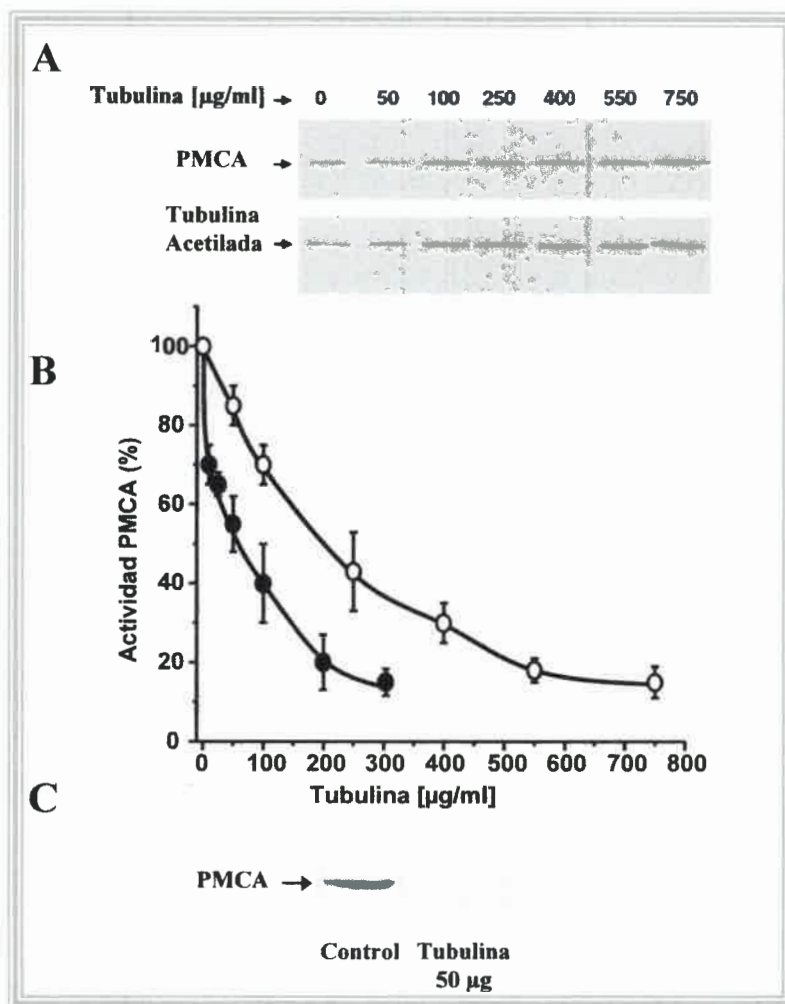
Debido a que la disociación del complejo tubulina acetilada/PMCA resulta en una estimulación de la actividad de PMCA (Fig.16 A, B), la actividad de PMCA podría inhibirse por la adición de tubulina acetilada exógena. Para comprobar esta posibilidad, PMVs se incubaron con 0,6 % de etanol para disociar el complejo, los PMVs fueron lavados para eliminar la tubulina libre y posteriormente fueron incubados en presencia de dos preparaciones de tubulina purificada de cerebro de rata, una que contiene 4 veces más de la isoforma acetilada con respecto a la otra.

Como se muestra en la figura 20 B la actividad de PMCA disminuyó a medida que aumentaron las concentraciones de tubulina exógena. La proporción de tubulina acetilada se correlaciona directamente con el grado de inhibición; como puede observarse en la figura 20 B con 50 µg/ml de tubulina con alta proporción de acetilada, se logra el 50 % de inhibición de la actividad PMCA, mientras que con la preparación que contiene baja proporción de tubulina acetilada es necesario 200 µg/ml para alcanzar el mismo porcentaje de inhibición (comparar los círculos abiertos y cerrados) lo que sugiere que la isoforma acetilada de tubulina es la que interacciona con la enzima y causa la inhibición de la actividad enzimática.

Después de eliminar el exceso de tubulina exógena, se cuantificaron los niveles del complejo tubulina acetilada/PMCA bajo cada condición, para esto los PMVs se solubilizaron con detergente y se inmunoprecipitaron con el anticuerpo 6-11B-1 unido a perlas de sefarosa. Alícuotas del precipitado y fracciones solubles fueron analizadas por western blot utilizando los anticuerpos 5F10 y 6-11B1. Los resultados muestran que, en ausencia de tubulina exógena, la mayor parte de PMCA no está asociada a tubulina acetilada, dado que PMCA es recuperada en la fracción soluble de la inmunoprecipitación (Fig. 20 A). Este resultado es concordante con el hecho de que en presencia de etanol se disocia el complejo tubulina acetilada/PMCA en los PMVs.

La Fig. 20 también muestra que cuando los PMVs son incubados en presencia de concentraciones crecientes de tubulina exógena la cantidad de PMCA en el precipitado aumenta, con la disminución correspondiente en la fracción soluble. Estos resultados indican que la asociación de tubulina acetilada con PMCA produce la inhibición de la enzima. El análisis por western blot de tubulina purificada (conteniendo baja proporción

de tubulina acetilada) utilizada en los experimentos se encuentra libre de PMCA (Fig. 20 C).



**Figura 20: Efecto de tubulina acetilada sobre la actividad de PMCA y complejo tubulina acetilada/PMCA.** PMVs (0,25 mg proteína) pre-tratados con 0,6 % de etanol y lavados para eliminar la tubulina disociada del complejo fueron incubados por 30 min a 37 °C en un volumen final de 1 ml de buffer de transporte I, en presencia de diferentes cantidades de dos preparaciones de tubulina con bajo o alto porcentaje de la iso especie acetilada. Luego de la incubación los PMVs fueron centrifugados a 100.000 xg por 20 min para eliminar el exceso de tubulina exógena y el pellet fue resuspendido en el mismo volumen final con NaCl/Tris conteniendo 0,5 % Triton X-100 e inmunoprecipitado con anti-tubulina acetilada unida a perlas de sefarosa. Las fracciones de precipitado (P) y sobrenadante (S) fueron analizadas por western blot utilizando los anticuerpos 5F10 y 6-11B1 (A). Muestras incubadas conteniendo bajo (○) y alta (●) proporción de tubulina acetilada fueron procesadas para determinar la actividad de PMCA (B). La actividad de PMCA en ausencia de tubulina exógena fue  $40.6 \pm 2$  pmol  $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de proteína. Los valores corresponden a la media estándar  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes. (C) PMCA en membranas de cerebro (control) y 50 µg de tubulina purificada con bajo contenido de la iso especie acetilada fueron analizadas por western blot revelado con 5F10.

### 5.5 Efecto de drogas que interaccionan con tubulina sobre la actividad de PMCA y la formación del complejo tubulina acetilada/PMCA

Los microtúbulos (MTs) son polímeros constituidos en un 85 % por tubulina, el resto está representado por las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) (Solomon, 1980). En general los MTs que componen el citoesqueleto son efímeros, se encuentran en equilibrio dinámico con una gran reserva citosólica de tubulina soluble: algunos de ellos se forman y desaparecen en minutos, mientras que otros persisten varias horas, estas variaciones en el crecimiento implican cambios rápidos de polimerización y depolimerización y es lo que se denomina *inestabilidad dinámica de los microtúbulos*. Esto permite una reorganización y distribución de los mismos durante distintos requerimientos celulares.

Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que agentes tales como nocodazol y taxol afectan la actividad NKA. El nocodazol es capaz de activar a la NKA *in vivo*, mientras que el taxol no permite que el glutamato pueda activar a la enzima *in vivo* (Casale y col., 2005). Estos antecedentes sugieren que, tal como sucede para NKA, la estabilidad microtubular podría afectar la actividad enzimática de PMCA.

Por esto, se determinó el efecto de taxol (estabilizante de MTs) y nocodazol (desestabilizante de MTs) sobre la actividad de PMCA y la formación del complejo tubulina acetilada/PMCA en PMVs. Los PMVs fueron incubados en presencia o ausencia de taxol o nocodazol, seguido por la determinación del transporte de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  en presencia y ausencia de ATP, como medida de la actividad de PMCA y la cantidad de tubulina acetilada en la fase detergente luego de la partición con Triton X-114 como una medida de la cantidad de complejo tubulina acetilada/PMCA. Los PMVs tratados con taxol mostraron una activación de PMCA y una disminución en la formación de complejo, más aun si posteriormente del tratamiento con taxol los PMVs son tratados con calmodulina no se observa efecto de activación (Tabla 2). Cuando los PMVs fueron tratados con nocodazol el complejo fue parcialmente dissociado y la actividad de PMCA inhibida, esta inhibición creemos que resulta de un efecto intrínseco del nocodazol independientemente de su capacidad para dissociar el complejo. Esto fue probado por la determinación del efecto de nocodazol sobre la actividad de PMCA en PMVs pre-tratados con etanol y calmodulina. Estos efectores incrementaron la actividad PMCA en

un 90 % disociando el complejo tubulina/PMCA en un 70 % mientras que si luego del tratamiento con estos efectores se adiciona nocodazol la actividad disminuye notablemente a un 20-27 % (Tabla 3). Estos resultados muestran que el nocodazol es inhibidor de la actividad de PMCA independientemente de la presencia o ausencia de tubulina.

<i>Tratamiento</i>	<i>Complejo Tubulina/PMCA</i>	<i>Actividad PMCA</i>
<b>Control</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Nocodazol</b>	<b>33 ± 13</b>	<b>17 ± 11</b>
<b>Taxol</b>	<b>34 ± 06</b>	<b>189 ± 20</b>

**Tabla 2: Efecto de taxol y nocodazol sobre la actividad de PMCA y la formación el complejo tubulina acetilada/PMCA.** PMVs (120 µg de prot.) fueron incubados en 0,5 ml de buffer de transporte en ausencia (control) o presencia de 50 µM de nocodazol o 5 µM de taxol durante 30 min a 37 °C y posteriormente lavados para eliminar la tubulina disociada por los efectores. Alícuotas de 0,2 ml fueron procesadas para la cuantificación del complejo tubulina/PMCA por partición en Triton X-114, y para determinar la actividad de PMCA como se describe en Procedimientos experimentales. Los datos son la media ± S.D. de tres experimentos independientes.

<i>Tratamiento de PMVs</i>	<i>Actividad PMCA</i>
<b>Control</b>	<b>100</b>
<b>+ Calmodulina</b>	<b>190 ± 13</b>
<b>+ Etanol</b>	<b>185 ± 22</b>
<b>+ Calmodulina + Nocodazol</b>	<b>27 ± 09</b>
<b>+ Etanol + Nocodazol</b>	<b>20 ± 12</b>

**Tabla 3: Efecto de nocodazol sobre la actividad PMCA.** PMVs (120 µg de prot.) fueron incubados en 0,5 ml de buffer de transporte en ausencia (control) o presencia de 72 nM de calmodulina o 0,6 % de etanol durante 30 min a 37 °C. Luego de la incubación con calmodulina o etanol, algunas muestras fueron incubadas durante 30 min con 50 µM de nocodazol. Alícuotas de 0,2 ml de cada tratamiento fueron procesadas para determinar la actividad de PMCA como se describe en Procedimientos experimentales. Los datos mostrados son la media ± S.D. de tres experimentos independientes.

## **5.6 Efecto del tratamiento con etanol sobre la actividad de PMCA en células CAD, COS y eritrocitos**

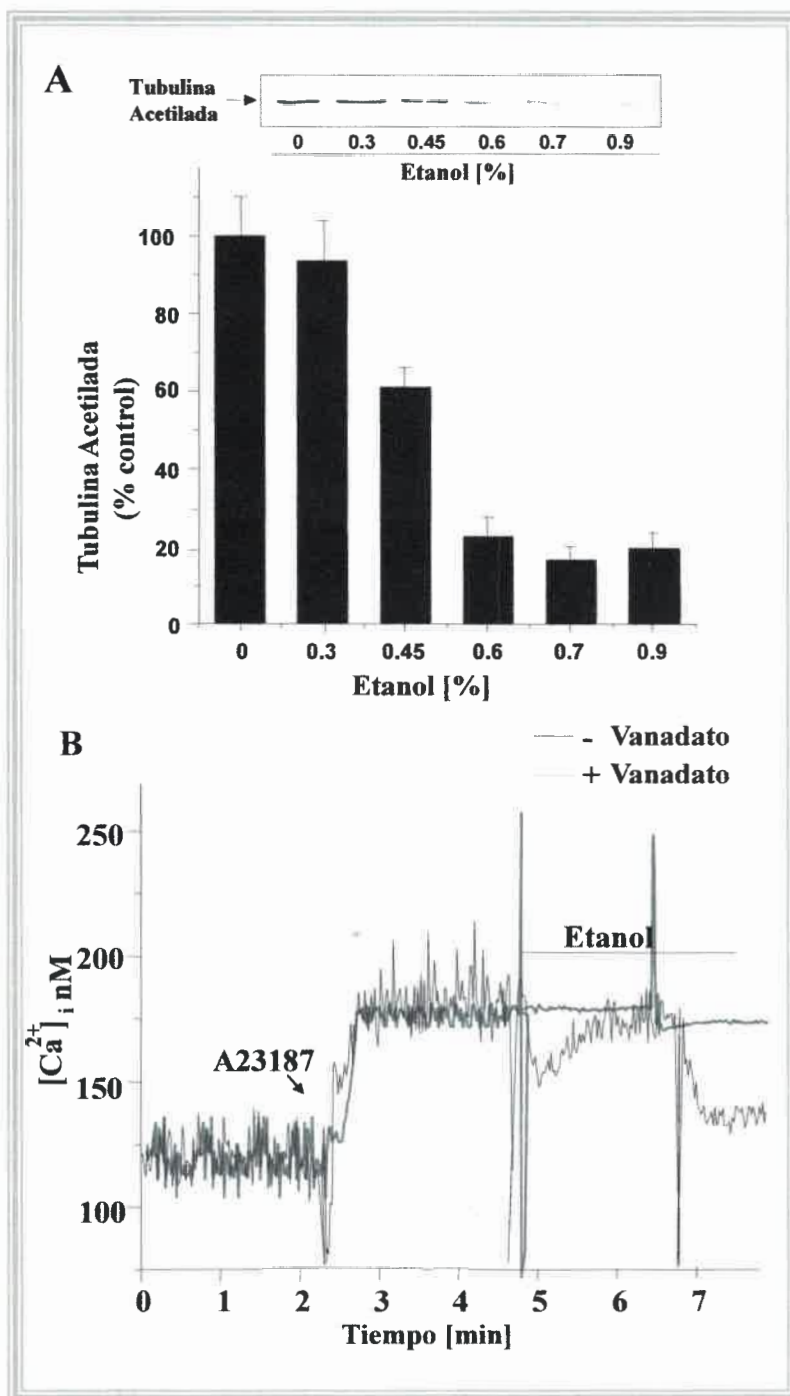
Para estudiar la regulación de la actividad de PMCA basada en la asociación y disociación del complejo tubulina/PMCA desde un punto de vista más fisiológico, se utilizó Fura 2-AM para estimar la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y su variación intracelular en células vivas luego del tratamiento con etanol. En estas mismas condiciones se determinó el contenido de tubulina acetilada que está asociada o que forma parte del complejo tubulina acetilada/PMCA a través de inmunoprecipitación con anticuerpo anti-PMCA unido a perlas de sefarosa. Este estudio se realizó en células COS, CAD y eritrocitos humanos.

### **5.6.1 Células COS**

Con el objetivo de conocer si el efecto de etanol sobre los niveles de la tubulina de membrana y la formación del complejo tubulina acetilada/PMCA es específico de PMVs o es un efecto generalizado en otras células, se determinó el efecto de este alcohol en células no neuronales, para ello se utilizaron células COS en cultivo, las cuales provienen de fibroblastos de riñón de mono.

En primer lugar se determinó el efecto de etanol ( $C_f$  0,6%) sobre la actividad PMCA en células en cultivo, el comportamiento intracelular de calcio fue monitoreado con Fura 2AM, para la determinación de la variación de la concentración de calcio debida a la actividad de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa las mediciones fueron realizadas en presencia y ausencia de vanadato de sodio (inhibidor de P-ATPasas). Utilizamos células COS en cultivo con una confluencia de 70 %, se adicionó A23187 (un ionoforo para calcio) luego de un aumento significativo en la concentración de calcio, se adicionó etanol al 0,6 %. En ausencia de vanadato el agregado de etanol produjo una disminución en el contenido de calcio intracelular. Por otro lado, se determinó el contenido de tubulina acetilada por partición con Tritón X- 114 de las membranas de células COS sometidas al mismo tratamiento mencionado anteriormente.





**Figura 21: Efecto del etanol sobre la tubulina acetilada de membrana y la actividad PMCA en células COS. (A)** Las células fueron incubadas durante 10 minutos en buffer A a 37 °C en presencia de etanol a las concentraciones indicadas. Luego de esta incubación, la tubulina acetilada hidrofóbica fue obtenida de la fase rica en detergente y revelada por inmunoblot con el anticuerpo 6-11B1 como se describe en procedimientos experimentales. Las bandas de tubulina (panel superior) fueron cuantificadas y los valores se muestran en el panel inferior. Los datos están expresados como porcentaje de un control incubado en ausencia de etanol. Los datos son una media ± S.D. de tres experimentos independientes. **(B)** El calcio intracelular fue monitoreado por la utilización de Fura 2-AM en función del tiempo. A23187 ionoforo para calcio ( $C_f$  3  $\mu$ M) y etanol ( $C_f$  0,6 %) fueron adicionados al tiempo indicado por las flechas. El experimento fue realizado en ausencia (línea negra) o presencia (línea gris) de 2 mM de vanadato de sodio adicionado a tiempo cero.

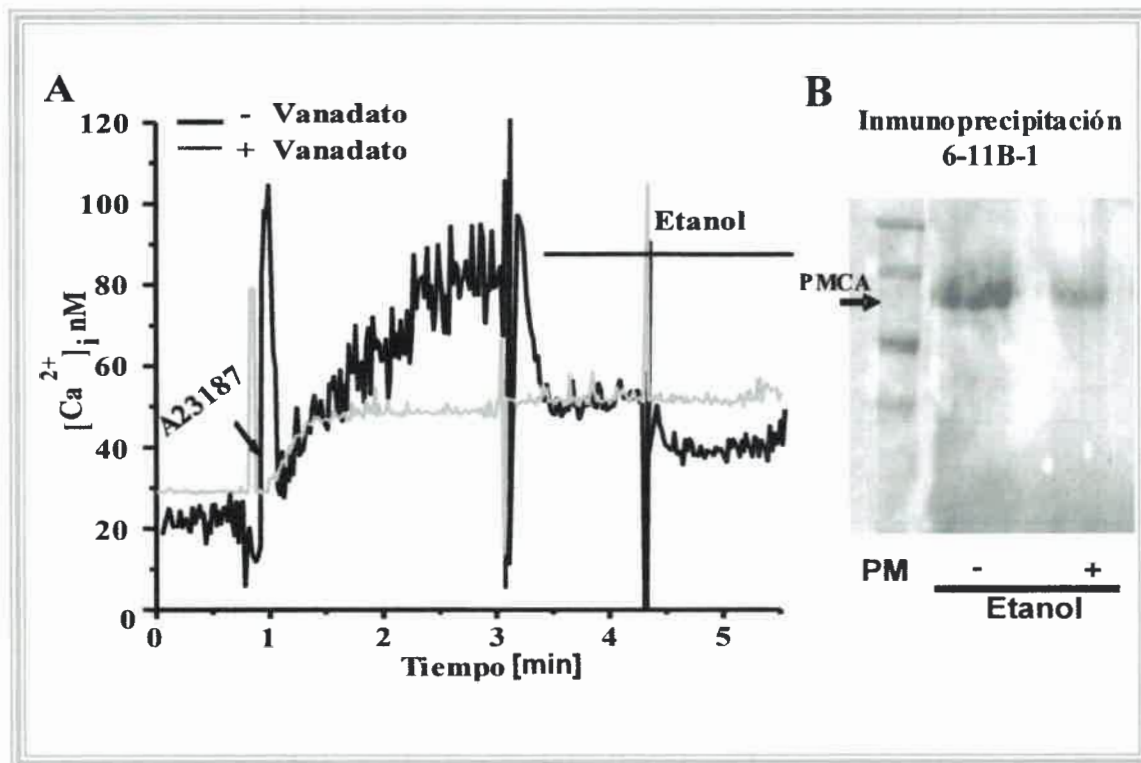
La figura 21 muestra que en presencia de 0,45 % de etanol en el medio de incubación el contenido de tubulina acetilada disminuyó un 40 % y la máxima disminución se obtuvo a 0,7 % de etanol (80 %), valores similares a los determinados para PMVs. En conjunto, estos resultados muestran que en forma similar a lo observado en PMVs, el etanol provocaría activación de PMCA por disociación del complejo.

### **5.6.2 Eritrocitos**

Es conocido que PMCA tiene 4 isoformas que se expresan de manera diferencial dependiendo del tejido, en preparaciones de PMVs de cerebro de rata hemos identificado la presencia de la isoforma 4 de PMCA, pero se ha descrito que otras isoformas también se expresan en tejido nervioso (Sepúlveda y col., 2005). Con el objetivo de determinar si este efecto es observado en células que expresan mayoritariamente la isoforma 4 de PMCA utilizamos eritrocitos humanos, los cuales expresan la proteína hPMCA4b. Las determinaciones de la actividad PMCA se realizaron utilizando Fura 2AM, para determinar el comportamiento intracelular del ion calcio en respuesta a la adición de etanol y su relación con la actividad de PMCA, las mediciones se realizaron en presencia y ausencia de vanadato de sodio (2 mM).

La figura 22 A muestra que ante el tratamiento con etanol al 0,6 % de eritrocitos humanos recientemente extraídos (heparinizados) con un hematocrito de 0,1 %, luego del aumento de calcio producido por el ionóforo A23187, produce una disminución en la concentración del ion calcio en células que fueron incubadas en ausencia de vanadato, indicando activación de PMCA (Fig. 22 A).

Las membranas de eritrocitos tratadas con etanol también fueron utilizadas para la determinación de la formación del complejo tubulina acetilada/PMCA por inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo 6-11B-1. Como se observa en la figura 22 B, PMCA es inmunoprecipitada por el anticuerpo anti-tubulina acetilada unido a perlas de sefrosa indicando la presencia del complejo tubulina acetilada/PMCA en la membrana. Cuando las membranas de eritrocitos fueron tratadas con etanol el contenido de PMCA en el inmunoprecipitado fue significativamente menor indicando la disociación del complejo tubulina/PMCA.



**Figura 22: Efecto del etanol sobre la actividad de PMCA y la formación del complejo tubulina acetilada/PMCA en eritrocitos humanos.** (A) La concentración de calcio intracelular fue monitoreada utilizando Fura 2-AM en función del tiempo. A23187 ( $C_f$  3  $\mu$ M) y etanol ( $C_f$  0.6 %) fueron adicionados al tiempo indicado por las fechas. Las mediciones se realizaron en ausencia (línea negra) o presencia (línea gris) de 2 mM de vanadato de sodio adicionado a tiempo cero. (B) Membranas de eritrocitos, fueron incubadas por 20 min con buffer de transporte conteniendo (+) o no (-) 0.6 % de etanol. Luego se eliminó el buffer y las membranas fueron solubilizadas con NaCl/Tris-Tritón e inmunoprecipitadas con anticuerpo 6-11B-1 unido a perlas de sefrosa y analizadas por western blot, revelado con el anticuerpo 5F10.

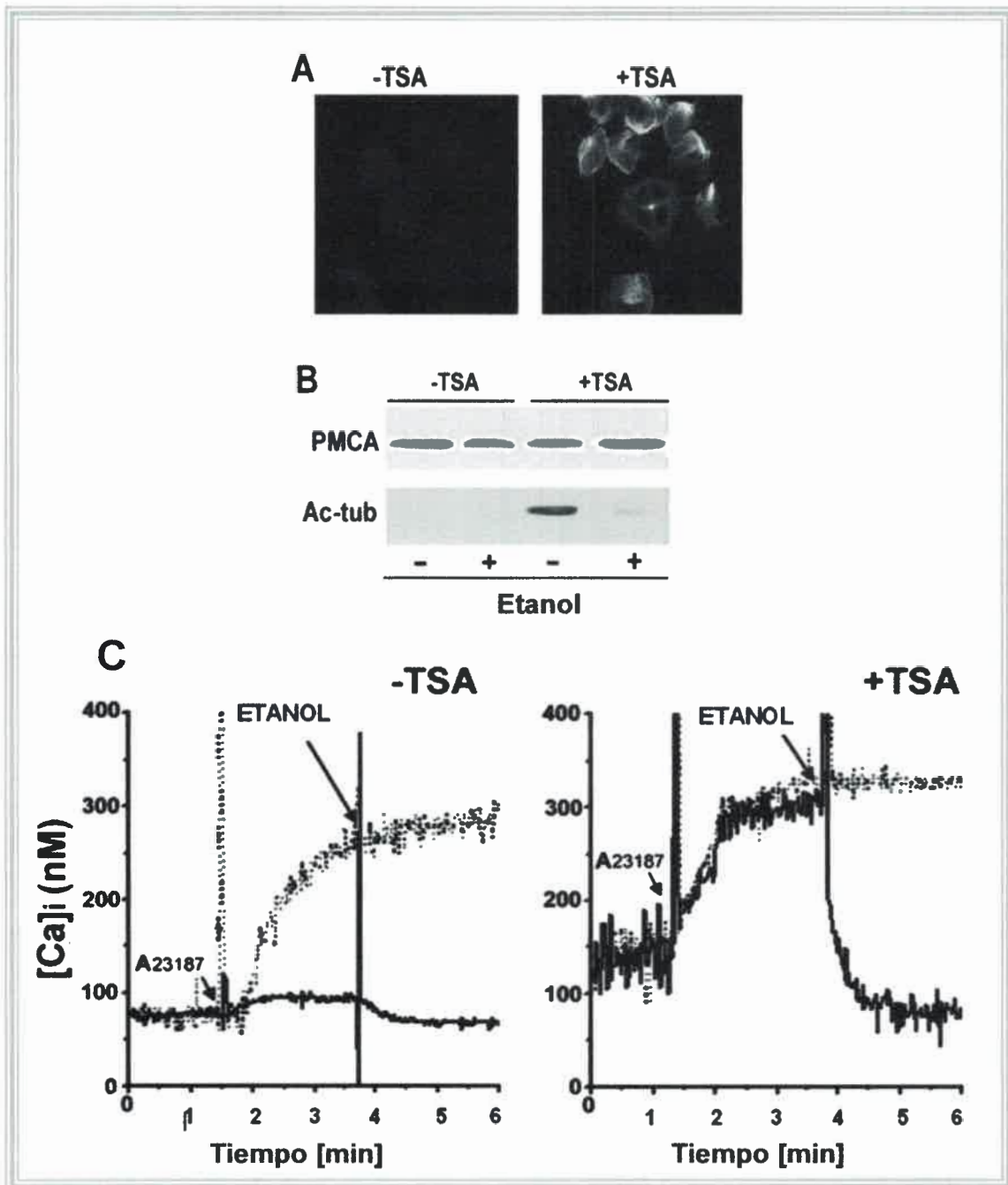
### 5.6.3 Células CAD

Para la determinación del efecto de etanol sobre la formación del complejo tubulina acetilada/PMCA y la consiguiente actividad PMCA se utilizó una segunda línea celular diferente de las COS; se utilizaron células CAD que provienen de tumor de cerebro de ratas (Suri y col., 1993). En condiciones basales estas células no contienen la isoforma acetilada de tubulina, sin embargo luego del tratamiento de estas células con Tricostatina A (TSA), un inhibidor inespecífico de histonas deacetilasas, se produce un incremento significativo en el contenido de tubulina acetilada en las células, este aumento de tubulina acetilada conduce a un incremento de la asociación de tubulina a la membrana (Santander y col., 2006). En consecuencia, el tratamiento con TSA podría llevar a la formación del complejo tubulina acetilada/PMCA y consiguiente inhibición

de la actividad enzimática de PMCA. Para demostrar esta hipótesis se determinó la actividad PMCA en células CAD tratadas o no tratadas con TSA.

Como se observa en la figura 23, los niveles de tubulina acetilada en células CAD es indetectable (Fig. 23 A y B, -TSA), sin embargo luego del tratamiento de las células con TSA el contenido de tubulina en las células y de microtúbulos acetilados aumentan significativamente (Fig. 23 A y B, +TSA). El análisis por inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo 5F10 unido a perlas de sefarosa en células no tratadas con TSA, donde no hay tubulina acetilada, muestra que solo PMCA es precipitada (Fig. 23 B). Sin embargo, en células tratadas con TSA, tanto PMCA como tubulina acetilada son precipitadas, indicando la presencia del complejo tubulina acetilada/PMCA en la membrana. Bajo estas condiciones, cuando las células fueron tratadas con etanol la tubulina acetilada no fue encontrada en el precipitado indicando la disociación del complejo (Fig. 23 B). Finalmente se analizó la concentración intracelular de calcio y su variación luego de la adición de etanol en células CAD tratadas y no tratadas con TSA utilizando Fura 2-AM. La concentración de calcio intracelular fue significativamente menor en células que no contenían tubulina acetilada (-TSA), esta diferencia podría deberse a que en presencia de tubulina acetilada la bomba de calcio es menos activa. Posteriormente se adiciono A23187 (ionoforo para el calcio) a células tratadas y no tratadas con TSA, la adición del ionóforo causó un incremento de calcio intracelular, excepto en las células no tratadas con TSA en ausencia de vanadato, éste fue un resultado inesperado, el cual podría explicarse que una gran actividad de PMCA contrarresta la actividad del ionoforo, ya que en presencia de vanadato se observa el aumento de calcio. Luego del incremento de calcio intracelular se adicionó etanol 0,6 %, en estas condiciones la concentración de calcio disminuyó en ausencia de vanadato, en contraste la adición de etanol en presencia de vanadato no causó ningún efecto sobre la concentración de calcio, lo mismo ocurrió en células no tratadas con TSA (-TSA).

Los resultados sugieren que la disminución de calcio es debida a la actividad de PMCA. La complejidad de la célula y el hecho de no contar con un inhibidor específico para PMCA, podría darle a estos resultados otra explicación. Sin embargo estos resultados coinciden con los resultados anteriores en cuanto a que el etanol disocia el complejo tubulina acetilada/PMCA y consecuentemente se activa PMCA.



**Figura 23: Efecto del etanol sobre la actividad de PMCA y la formación del complejo tubulina acetilada/PMCA en células CAD. (A)** Células CAD crecidas sobre un portaobjetos hasta un 70 % de confluencia se trataron durante 6 hs con 5  $\mu$ M TSA (+TSA) o sin (-TSA), los microtúbulos fueron visualizados por inmunofluorescencia utilizando mAb 6-11B-1. **(B)** Células CAD crecidas en placas de 10 cm tratadas o no con TSA como se describe en A, fueron incubadas en presencia (+) o ausencia (-) de 0.6 % de etanol durante 20 min. Luego las membranas de células fueron solubilizadas con NaCl/Tris-Triton e inmunoprecipitadas con anticuerpo anti-PMCA unido a perlas de sefarosa. La inmunoprecipitación fue revelada con anticuerpo anti-PMCA anti-tubulina acetilada. **(C)** Las variaciones en la concentración del ion calcio intracelular fue monitoreado por la utilización de Fura 2-AM en función del tiempo en presencia (+) o ausencia (-) de TSA. A23187 ionoforo para calcio (Cf 3  $\mu$ M) y etanol (Cf 0,6 %) fueron adicionados al tiempo indicado por las flechas. Las mediciones fueron realizadas en ausencia (línea continua) o presencia (línea discontinua) de 2 mM de vanadato de sodio adicionado al tiempo cero.

En conjunto los resultados mostrados muestran que la concentración de calcio intracelular en células neuronales (CAD) y no neuronales (COS y eritrocitos) en ausencia de vanadato produce una marcada disminución cuando es adicionado etanol al 0,6 %, en concordancia con los experimentos presentados anteriormente que muestran que en preparaciones de PMVs donde está presente la isoforma 4 de PMCA hay una disociación del complejo tubulina acetilada/PMCA y activación de PMCA. Este efecto también es observado en eritrocitos donde la isoforma de PMCA 4 es mayoritaria.

### **5.7 Influencia de los lípidos sobre la regulación producida por tubulina sobre la actividad de PMCA**

La actividad PMCA es influenciada por la composición de lípidos que la rodea (Tang y col., 2006; Pang y col., 2005), de hecho los fosfolípidos ácidos y los ácidos grasos poliinsaturados son capaces de activar la bomba por unirse a ella en dos regiones distintas (Enyedi y col., 1987; Zvarich y col., 1990). Sobre la base de estos antecedentes se propuso que la tubulina formaría un complejo con PMCA y que la regulación de la actividad enzimática dependería tanto de la interacción de ambas proteínas como de la composición lipídica donde está inmerso el complejo. Para confirmar esta hipótesis, se determinó el efecto de la tubulina sobre la actividad de PMCA en diferentes reconstituciones de lípidos, la actividad PMCA se ensayó en preparaciones purificadas de la proteína, en presencia de tubulina purificada reconstituida en lípidos neutros como fosfatidilcolina (PC), que no posee un efecto activador sobre PMCA, lípidos ácidos, que estimulan la actividad de PMCA y también en presencia de diacilglicerol (DAG), el cual se ha descrito como activador de la bomba de calcio por interacción directa (Perez-Gordones y col., 2009).

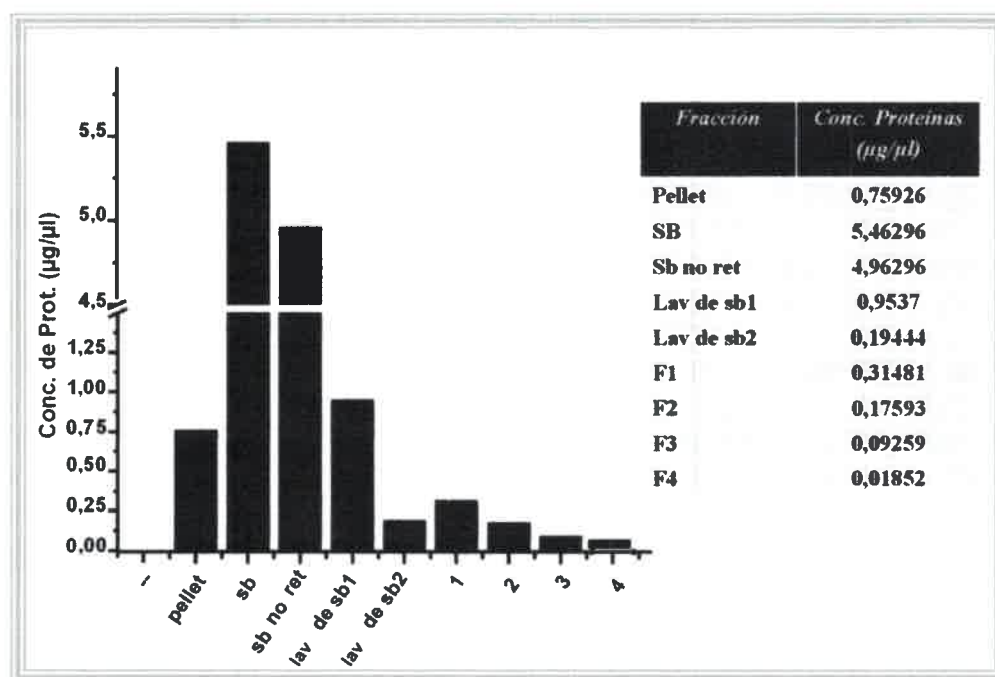
### **5.8 Purificación de PMCA**

Para la purificación de PMCA se extrajeron membranas de eritrocitos de cerdo (las cuales contienen mayor expresión de la isoforma 4) y de cerebro de rata (donde hay expresión de todas las isoformas). En ambos casos, se realizó una lisis hipoosmótica para romper las células y posterior separación de las membranas por centrifugación. La

obtención de PMCA de eritrocitos de cerdo se realizó según el método descrito por Cura y col. (2008). Una vez obtenidas las membranas de cerebro de rata y de cerdo se utilizaron para la determinación de la presencia e integridad de PMCA por inmunoblot.

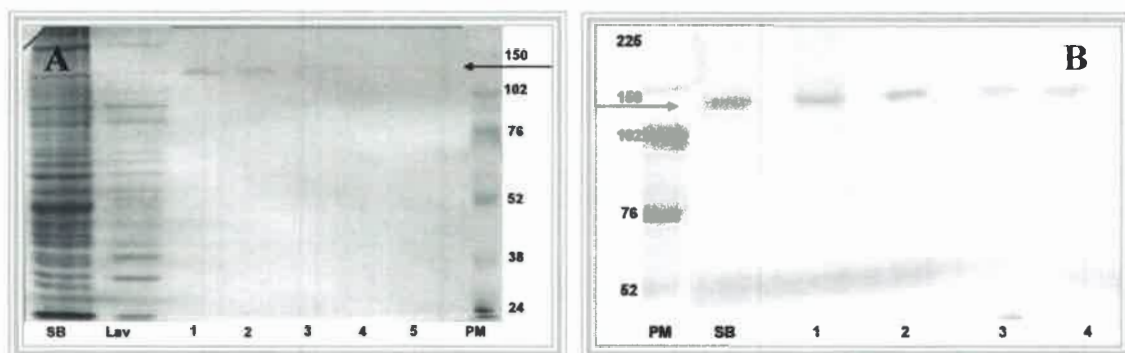
El resultado de este análisis reveló que la mayor parte de la enzima presente en las membranas de eritrocito de cerdo se encontraba hidrolizada, probablemente debido a una falla en la manipulación de la muestra durante la extracción. Por este motivo se decidió utilizar membranas de cerebro de rata obtenidas según el método descrito por Michaelis y col., (1983). Las membranas de cerebro de rata fueron utilizadas para la posterior purificación de PMCA.

Las membranas de cerebro fueron solubilizadas con detergente (C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>) para obtener la mayor cantidad de PMCA en el sobrenadante, la enzima fue luego purificada por una columna de afinidad con calmodulina, el proceso de purificación se realizó en presencia de 0,1% de L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (Cura y col., 2008). Las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas y a cada fracción se le determino el contenido de proteínas por el método de Bradford.



**Figura 24:** Cuantificación de proteínas durante la purificación de PMCA a partir de membranas de cerebro de rata. Durante los diferentes pasos de la purificación de PMCA se colectaron muestras para la determinación de proteínas por el método de Bradford. Pellet luego de solubilizar, sobrenadante de la solubilización (SB), sobrenadante no retenido por la columna de afinidad (SB no ret), Lavado de columna luego del sobrenadante (lav de sb1-sb2), Fracciones de la elución con EGTA (1-4).

La figura 24 muestra el resultado de la concentración de proteínas de una purificación típica, como puede observarse la mayor parte de las proteínas se solubilizan con el método empleado (ver SB y comparar con pellet), mientras que gran cantidad no fueron retenida por la columna de afinidad (ver SB no retenido y lavado de columna previamente a la elución). En las fracciones de elución con EGTA (1-4) se obtuvieron valores significativamente menores, esto correspondería a la enzima retenida por la columna (PMCA pura).



**Figura 25: Análisis de la purificación de PMCA a partir de PMVs. (A)** Alicuotas de los diferentes pasos de la purificación fueron analizadas por SDS-PAGE, posteriormente teñidas por Coomassie blue. Iguales volúmenes de muestras fueron sembrados: Sobrenadante luego de la solubilización (SB), Lavado de columna (Lav), Fracciones de la elución (F1-F5), Marcadores de peso molecular (PM). **(B)** Inmunoblot de diferentes fracciones tomadas durante la purificación fue revelado con 5F10, como se describe en procedimientos experimentales. Sobrenadante luego de la solubilización (SB), Fracciones de la elución (F1-F4). Marcadores de peso molecular (PM).

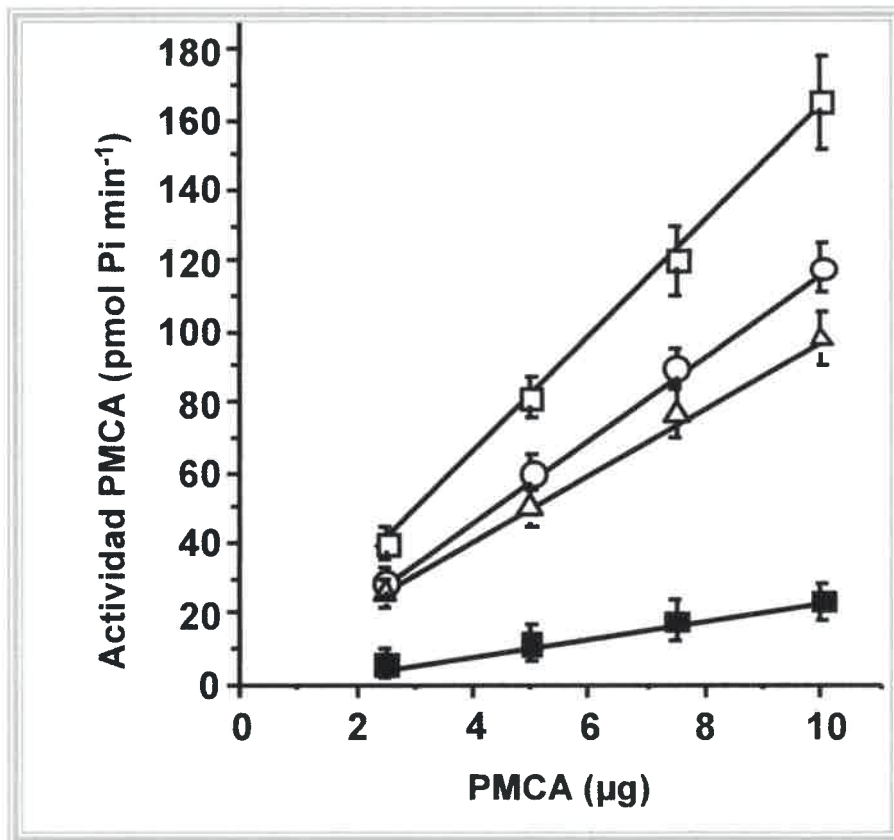
La figura 25 A muestra una electroforesis en SDS-PAGE correspondiente a las fracciones tomadas durante la purificación. Por tinción con coomasie blue puede observarse un gran número de proteínas en las fracciones antes de realizar la elución con EGTA de la columna de afinidad (ver SB y Lav), coincidente con la concentración de proteínas obtenido por Bradford. En las fracciones obtenidas con el buffer de elución (1-5) puede observarse que solo una banda está presente con el peso molecular característico de PMCA, 140 kD (indicado con una flecha). Para confirmar que la banda observada correspondía a PMCA se realizó un inmunoblot y se reveló con el anticuerpo 5F10 específico para todas las isoformas de PMCA. Como puede observarse en la figura 25 B la marcación indica que la banda de 140 kD corresponde a PMCA, también se observa una mayor intensidad en las calles donde la concentración de proteínas fue mayor (F1, F2). Finalmente podemos concluir que la columna de agarosa-calmodulina fue muy eficiente ya que muchas proteínas contaminantes fueron eluidas con el buffer



conteniendo calcio previo a la elución realizada con EGTA (buffer de elución para la obtención de PMCA).

### 5.9 Actividad de PMCA purificada en diferentes reconstituciones de lípidos

La PMCA purificada de PMVs fue reconstituida en diferentes preparaciones de lípidos: PC, fosfatidilcolina; DAG, diacilglicerol; BE, mezcla de lípidos ácidos y PA, ácido fosfatídico y luego se determinó su actividad por el método del sistema acoplado de enzimas piruvato quinasa-lactato deshidrogenasa (East y Lee, 1982) realizado como se describe en procedimientos experimentales.



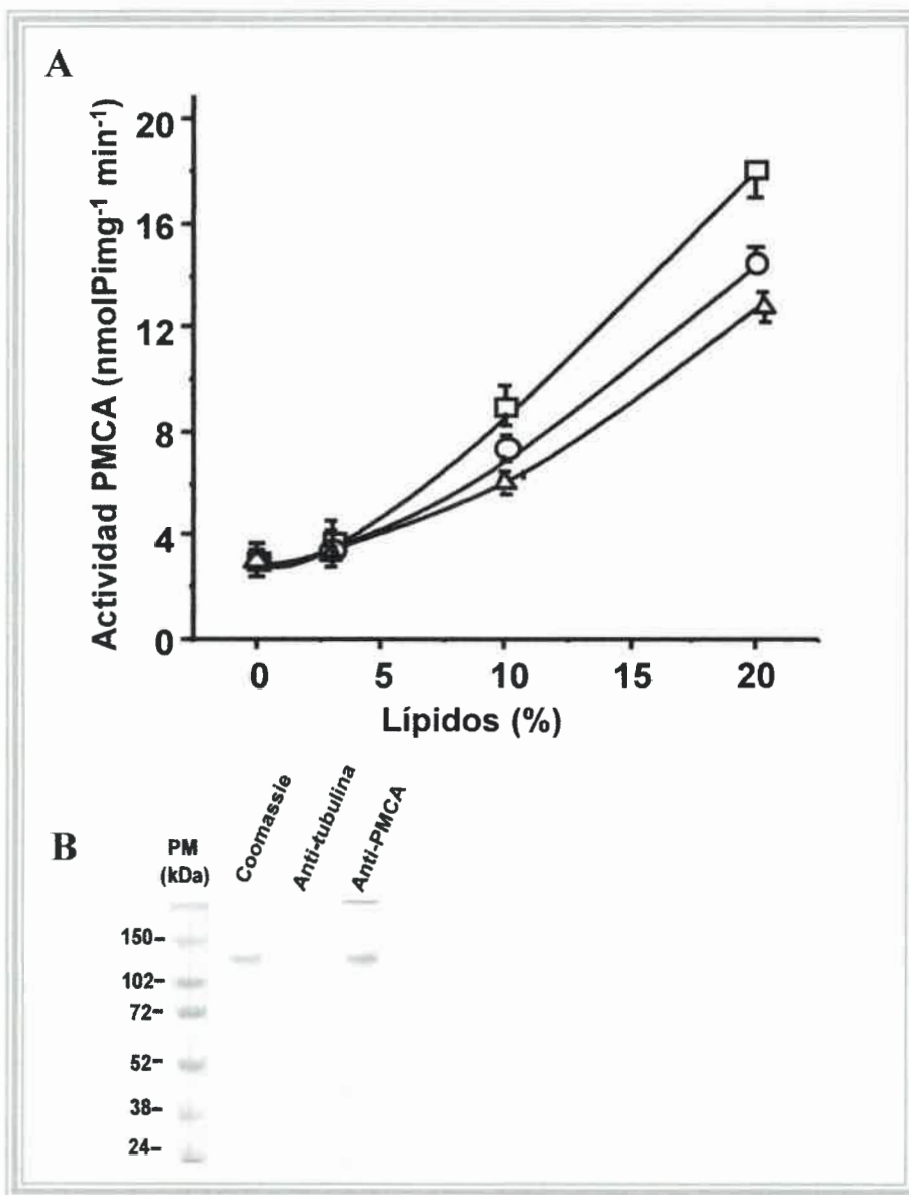
**Figura 26:** Efecto de los lípidos sobre la actividad de PMCA de cerebro de rata reconstituida en diferentes lípidos. PMCA purificada fue reconstituida en: (■) 100 % fosfatidil colina, o el 80% fosfatidil colina y 20% diacilglicerol (Δ), mezcla de lípidos ácidos (○) o ácido fosfatídico (□) como se describe en procedimientos experimentales. La actividad PMCA fue determinada a las concentraciones de proteínas indicadas utilizando el método de enzimas acopladas como se describe en procedimientos experimentales. Los datos mostrados corresponden a media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes.

La figura 26 muestra la actividad de PMCA en diferentes reconstituciones de lípidos, bajo todas las condiciones de reconstitución la actividad PMCA es dependiente de la cantidad de enzima utilizada. La mayor actividad fue observada en la reconstitución realizada con ácido fosfatídico (PA), con respecto a las demás reconstituciones con diferentes lípidos. Los valores obtenidos de actividad en PA fueron aproximadamente siete veces mayores a los obtenidos para la reconstitución realizada en fosfatidil colina (PC) (tomada como 100 %). La actividad de PMCA obtenida en las reconstituciones en DAG y BE tuvieron una actividad cuatro y cinco veces superior a la obtenida para PC (figura 26 y tabla 5). Como puede observarse la actividad de PMCA es afectada según el entorno lipídico en el cual se encuentre, obteniéndose una actividad PMCA creciente según el siguiente orden: PA>>BE>DAG>>PC.

Cuando la reconstitución fue realizada con un lípido ácido (PA) la actividad de PMCA se vio notablemente aumentada. Coincidente con este resultado, Tang y col. (2006) y Pang y col. (2005) han descrito que los fosfolípidos ácidos producen activación sobre la actividad de PMCA.

Posteriormente se realizó el análisis de la actividad PMCA purificada cuando la enzima fue reconstituida en PC con la adición de diferentes concentraciones de DAG, BE, PA. La actividad fue determinada con el método de enzimas acopladas como se describe en procedimientos experimentales. Los tres lípidos ensayados produjeron aumento de la actividad enzimática a todas las concentraciones ensayadas, tomando como control la actividad de PMCA reconstituida en 100 % de PC, sin embargo, en concordancia con los resultados anteriores, el mayor aumento fue observado para las reconstituciones realizadas con PA. Este efecto de activación por PA y otros lípidos ácidos también fueron observados por otros autores en cerebro y glóbulos rojos (Niggli y col., 1981; Choquette y col., 1984). Por otro lado, reportes de Perez-Gordones y col. (2009) describen una activación en glóbulos rojos de PMCA por DAG, un fosfolípido neutro, obteniendo incrementos de cuatro veces, coincidente con los resultados mostrados para PMCA purificada de cerebro de rata (Fig. 27 y tabla 5). La actividad de PMCA fue dependiente de las concentraciones de lípidos ácidos o DAG utilizadas en la reconstitución de la enzima con PC (Fig. 27 A). Estas mediciones muestran una correlación entre el aumento de la actividad de PMCA y la concentración de los lípidos utilizados en la reconstitución. Todas las mediciones que se realizaron con una

preparación de PMCA purificada a partir de cerebro de rata libre de tubulina (Fig. 27 B). Estos resultados demuestran que la PMCA de cerebro de rata reconstituida en PC es activada por lípidos ácidos y DAG a las concentraciones ensayadas (3%, 10% y 20%) en ausencia de tubulina.

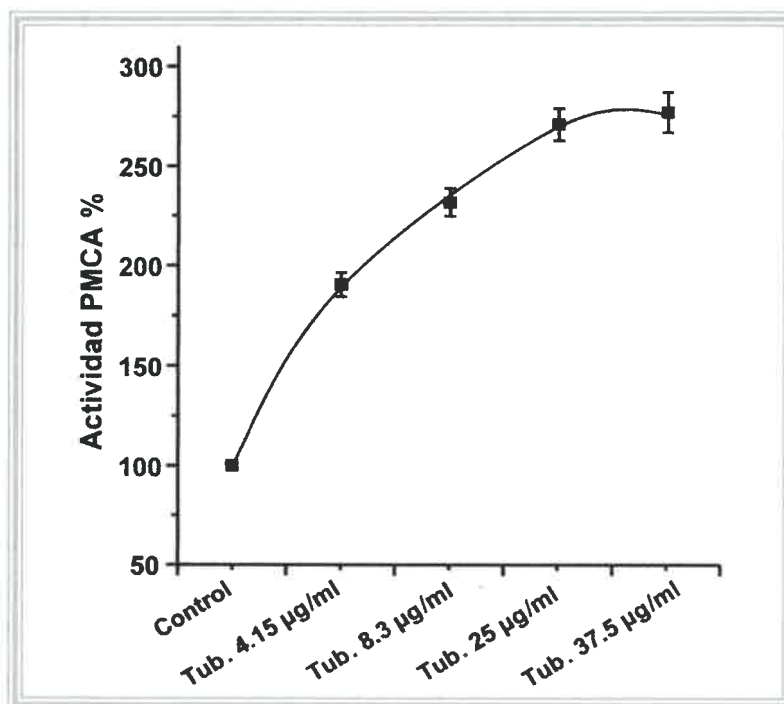


**Figura 27: Actividad de PMCA reconstituida en diferentes proporciones de distintos lípidos. (A)** La actividad PMCA fue medida con el método de enzimas acopladas según los descrito en procedimientos experimentales, las reconstituciones fueron realizadas a las concentraciones de DAG (Δ), BE (○) o PA (□) indicadas en el gráfico, para completar el 100% de los lípidos de la reconstitución se utilizó PC. Los datos graficados corresponden a la media ± S.D. de cuatro experimentos independientes. **(B)** Muestras de PMCA purificada (5 μg de proteína) de cerebro de rata se analizaron por SDS-PAGE teñido con Coomassie o western blot revelado con DM1A, específico para α-tubulina y 5F10, para PMCA.

## 5.10 Efecto del entorno lipídico sobre la interacción tubulina acetilada/PMCA y la actividad enzimática

### 5.10.1 PMCA isoforma 4 de humanos (hPMCA4xb)

Preparaciones de PMCA purificada (isoforma 4 de humanos, hPMCA4xb), gentilmente cedido por el grupo del Dr. Adamo, fueron reconstituidas en lípidos ácidos e incubadas en presencia de distintas concentraciones de tubulina purificada. Estas preparaciones se utilizaron para la determinación de la actividad PMCA. Como se muestra en la figura 28, en una preparación de PMCA purificada reconstituida en BE, la adición de tubulina purificada (37,5  $\mu\text{g/ml}$ ) produjo un incremento del 270 % en la actividad PMCA. Teniendo en cuenta que la reconstitución de PMCA en lípidos ácidos estimula la actividad de PMCA un 200 % (Tezanos Pinto y col., 2002), en presencia de tubulina la actividad PMCA es capaz de incrementarse a valores cercanos al 500 %.



**Figura 28:** Efecto de la tubulina sobre la actividad de PMCA (hPMCAx4b) reconstituida en lípidos ácidos. Preparaciones de PMCA purificada se incubaron con diferentes concentraciones de tubulina como se indica en el gráfico durante 20 min a 37 °C y luego se suplementaron con BE, la actividad PMCA fue calculada a partir de la liberación de [ $^{32}\text{P}$ ] de [ $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ ] ATP como se describe en procedimientos experimentales. El porcentaje de actividad PMCA en ausencia de tubulina es tomada como el 100 % (2,36 nmoles/ $\text{min}^{-1}/\text{mg}$  de proteína $^{-1}$ ). Las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP fueron de 1  $\mu\text{M}$  y 3 mM respectivamente.

Para determinar el efecto de la tubulina sobre la actividad PMCA reconstituida en lípidos neutros se utilizaron preparaciones de hPMCAx4b purificada, la enzima fue incubada con tubulina purificada y reconstituida en PC (lípidos neutros). La reconstitución en PC produce una activación 2 veces mayor que la producida por BE (ver tabla 4). Estos resultados sugieren que las concentraciones de tubulina ensayadas activan a PMCA en preparaciones de la enzima reconstituida en lípidos neutros o ácidos, sin embargo el efecto es más importante cuando las reconstituciones se realizan con lípidos neutros (25 µg/ml de tubulina). La tabla 4 muestra que la tubulina activa a la enzima reconstituida en PC en más de 5 veces, mientras que en lípidos ácidos la activación es de 2,7 veces con 25 µg/ml de tubulina.

<i>Condición</i>	<i>Actividad(nm Pi min<sup>-1</sup>mg prot<sup>-1</sup>)</i>	<i>% Actividad</i>
<i>PMCA (PC)</i>	<b>1.49</b>	<b>100 %</b>
<i>PMCA (PC) 25 µg/ml tubulina</i>	<b>7.6</b>	<b>502 %</b>
<i>PMCA (BE)</i>	<b>2.36</b>	<b>100 %</b>
<i>PMCA(BE) 25 µg/ml tubulina</i>	<b>6.35</b>	<b>270 %</b>

**Tabla 4: Efecto de la tubulina sobre la actividad de PMCA en preparaciones de PMCA purificada reconstituida en PC y BE.** Preparaciones de PMCA purificada (1 µg) se incubaron con 25 µg/ml de tubulina durante 20 min a 37 °C y luego suplementado con lípidos neutros (PC) o lípidos ácidos (BE), la actividad de PMCA fue calculada a partir de la liberación de [<sup>32</sup> P] de [γ-<sup>32</sup>P]ATP como se describe en procedimientos experimentales. La actividad en ausencia de tubulina es tomada como el 100 %. Las concentraciones de Ca<sup>2+</sup> y ATP fueron de 1 µM y 3 mM respectivamente

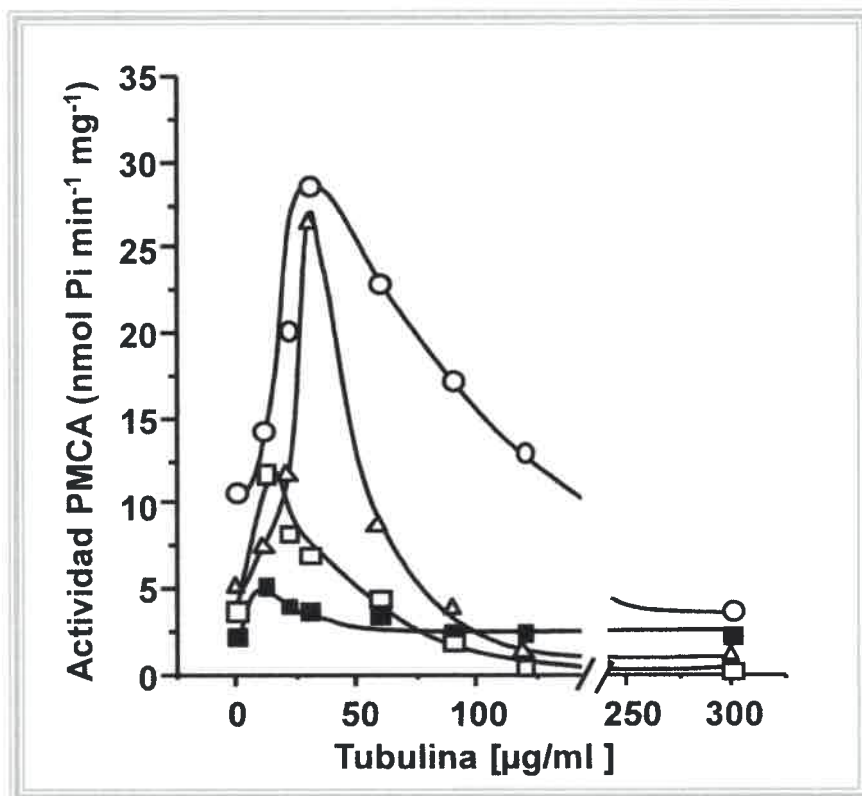
Por otro lado, los resultados demuestran que la interacción entre ambas proteínas es probablemente directa ya que se trabajó con dos proteínas con alto grado de purificación.

### 5.10.2 PMCA purificada a partir de PMVs

Preparaciones de PMCA (conteniendo todas las isoformas) purificada a partir de PMVs y reconstituida en diferentes preparaciones de lípidos: PC, DAG, BE y PA, fue analizado utilizando distintas proporciones de los lípidos mencionados; se utilizó para las reconstituciones 100 %, 97 %, 90 % y 80 % de PC y se adicionó DAG, BE o PA

para alcanzar el 100 % de la relación de lípidos utilizado en el ensayo, luego estas preparaciones fueron incubadas durante 20 minutos en presencia de diferentes concentraciones de tubulina purificada y posteriormente cada preparación conteniendo tubulina/PMCA se utilizó para la medición de la actividad PMCA, con el sistema acoplado de enzimas piruvato quinasa-lactato deshidrogenada (East y Lee, 1982).

Como se observa en la figura 29 y la tabla 5, la PMCA reconstituida en 100 % de PC muestra baja actividad (2 nmolPi/min/mg), sin embargo la actividad enzimática incrementa al doble a bajas concentraciones de tubulina (menor a 25  $\mu\text{g/ml}$ ) y vuelve a los valores iniciales cuando la concentración de tubulina es mayor a 50  $\mu\text{g/ml}$ .

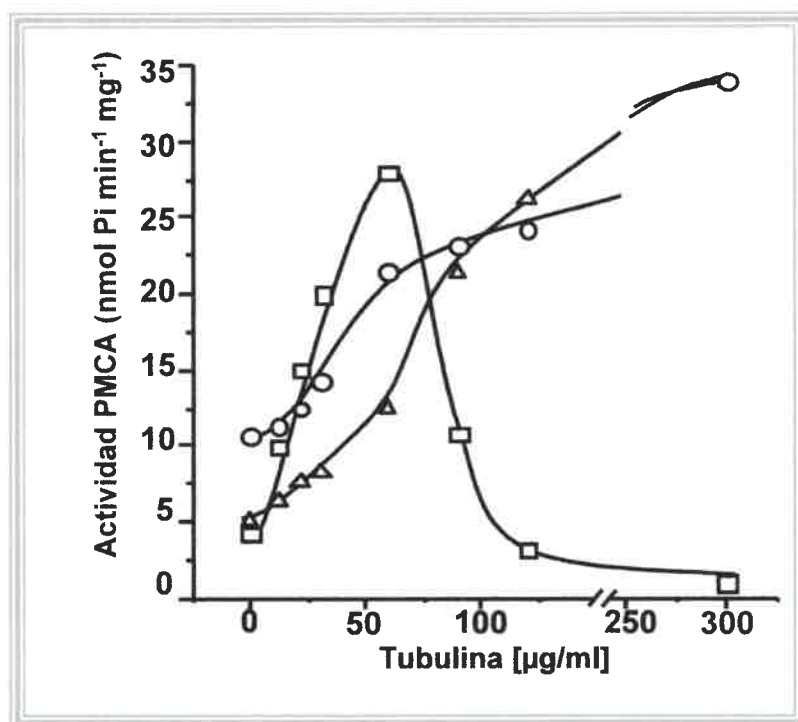


**Figura 29:** Efecto de tubulina sobre la actividad de PMCA de cerebro de rata reconstituida en PC; PC-DAG. PMCA fue purificada a partir de cerebro de rata y reconstituida en 100 % de PC (■) o PC (□) con 3 %, (△) 10 % o (○) 20 % de DAG. La actividad de PMCA fue determinada por la hidrólisis de ATP a las concentraciones de tubulina indicadas como se describe en procedimientos experimentales. Los datos son el promedio SD de cuatro experimentos independientes.

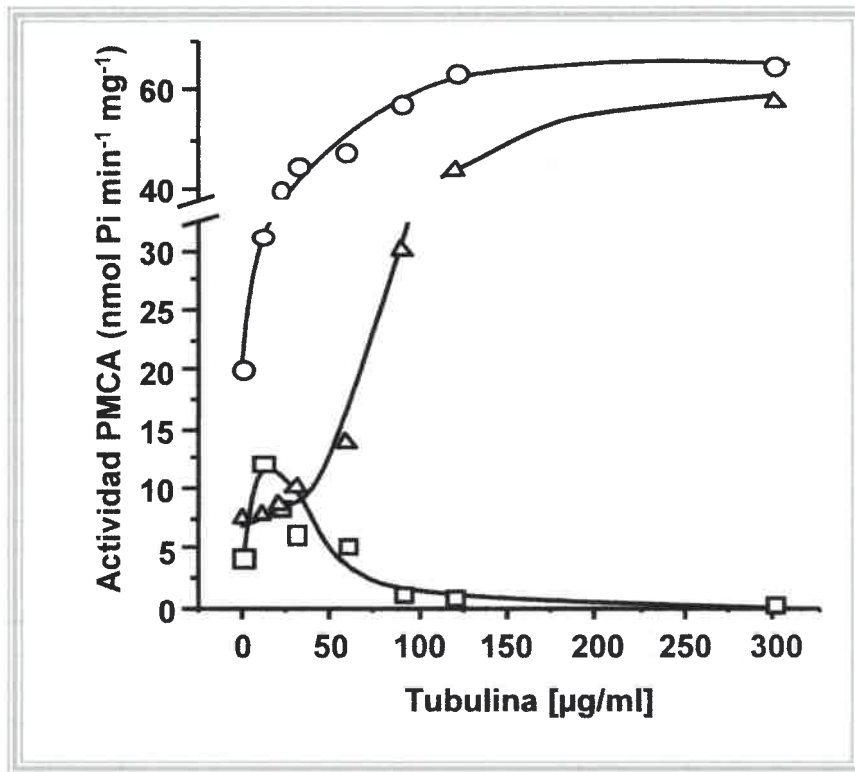
Cuando la reconstitución de PMCA se realizó en presencia de diferentes proporciones de DAG (20 %, 10% o 3%), se observó un comportamiento similar en la

actividad PMCA al observado con PC; es decir, a bajas concentraciones de tubulina hay un incremento en la actividad, mientras que cuando las concentraciones de tubulina son altas, mayores a 25-50  $\mu\text{g/ml}$  la actividad de PMCA disminuye alcanzando valores inferiores al control sin tubulina (Figura 29 y tabla 5).

La reconstitución de PMCA utilizando diferentes proporciones de lípidos ácidos, ya sea BE (lípidos ácidos) o PA y posterior adición de tubulina, tuvo un efecto totalmente diferente al observado para PC y DAG. A bajas concentraciones de tubulina (25 a 50  $\mu\text{g/ml}$ ) y bajo porcentaje de BE o PA en la reconstitución (hasta un 3 %), la actividad PMCA aumentó a medida que aumentó la concentración de tubulina, con concentraciones mayores de tubulina la actividad PMCA disminuyó (Fig. 30 y 31). Por otra parte, en las figuras 30 y 31 se observa que cuando se utilizó mayor proporción de BE o PA durante la reconstitución (10 % o 20 %), la actividad PMCA aumentó progresivamente con el aumento de tubulina a todas las concentraciones de tubulina ensayadas (0-300  $\mu\text{g/ml}$ ) Fig. 30 y 31.



**Figura 30:** Efecto de tubulina sobre la actividad de PMCA de cerebro de rata reconstituida en diferentes proporciones de BE. PMCA fue purificada a partir de cerebro de rata y reconstituida en PC ( $\square$ ) con 3 %, ( $\Delta$ ) 10 % o ( $\circ$ ) 20 % de BE. La actividad de PMCA fue determinada por la hidrólisis de ATP a las concentraciones de tubulina indicadas como se describe en procedimientos experimentales. Los datos son el promedio SD de cuatro experimentos independientes.



**Figura 31: Efecto de tubulina sobre la actividad de PMCA de cerebro de rata reconstituida en diferentes proporciones de PA.** PMCA fue purificada a partir de cerebro de rata y reconstituida en PC (□) con 3 %, (Δ) 10 % o (○) 20 % de PA. La actividad de PMCA fue determinada por la hidrólisis de ATP a las concentraciones de tubulina indicadas como se describe en procedimientos experimentales. Los datos son el promedio SD de tres experimentos independientes.

En resumen, bajas concentraciones de tubulina (hasta 50 µg/ml), producen activación de PMCA purificada independientemente del lípido utilizado para su reconstitución, en preparaciones de PMCA con 80% de PC y 20% de otro lípido (DAG, BE, PA) la mayor activación fue causada por PA seguida por DAG y luego por BE obteniendo valores 21, 12 y 10 veces mayores al control, respectivamente (tabla 5). Por otra parte, con altas concentraciones de tubulina (300 µg/ml) el efecto es dependiente del lípido utilizado para la reconstitución, de esta manera 20 % de PA y BE provocaron un aumento en la actividad de PMCA en un factor de 27 y 21 veces respectivamente, en tanto que para DAG el aumento en la concentración de tubulina por encima de 50 µg/ml, causa la inhibición de la actividad enzimática (Fig. 29), alcanzando niveles similares de actividad PMCA correspondiente al 100 % PC (Tabla 5).



	ACTIVIDAD PMCA							
	PC <sup>a</sup>		PC + DAG <sup>a</sup>		PC + BE <sup>a</sup>		PC + PA <sup>a</sup>	
	Ae <sup>b</sup>	% PC <sup>b</sup>	Ae <sup>b</sup>	% PC <sup>b</sup>	Ae <sup>b</sup>	% PC <sup>b</sup>	Ae <sup>b</sup>	% PC <sup>b</sup>
-Tub	2,3±0,5	100	9,7±0,7	430±65	11,8±0,7	525±49	16,5±1,3	732±105
+ Tub 50 µg/ml	5,1±0,2	227±41	28±3,0	1237±141	22±2,0	974±127	50±3,0	2226±361
+ Tub 300µg/ml	2,5±0,4	109±6,5	4,2±0,3	186±28	33±3,0	1461±192	62±5,0	2751±389

Tabla 5: Efecto de la cantidad de tubulina y lípidos sobre la actividad de PMCA

<sup>a</sup>PMCA: (7µg de proteínas) reconstituida en 100 % PC o 80 % PC y 20 % del fosfolípido indicado.

<sup>b</sup>Ae: Actividad PMCA en nmol Pi min<sup>-1</sup>mg de proteínas<sup>-1</sup>.

<sup>c</sup>PMCA: Actividad expresada como porcentaje de la muestra con 100% PC.

Como control se determinó la ausencia de PMCA en las preparaciones de tubulina purificada (Fig. 32). La tinción de coomassie muestra una banda de proteína prácticamente homogénea, con un peso molecular de 55 kDa, la cual es coincidente con la banda de tubulina revelada con el anticuerpo anti-tubulina por western blot. Por otro lado cuando el western blot se reveló con el anticuerpo 5F10, no se observaron bandas, por lo tanto podemos asegurar que la preparación de tubulina carece de PMCA.

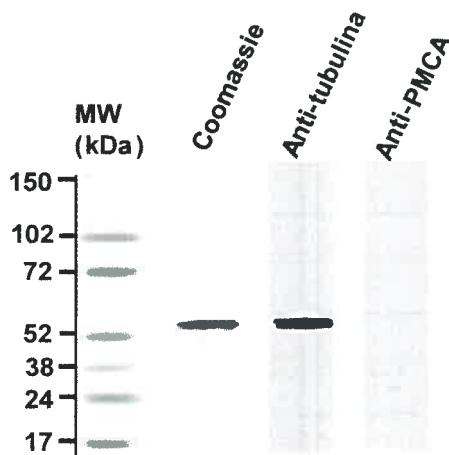


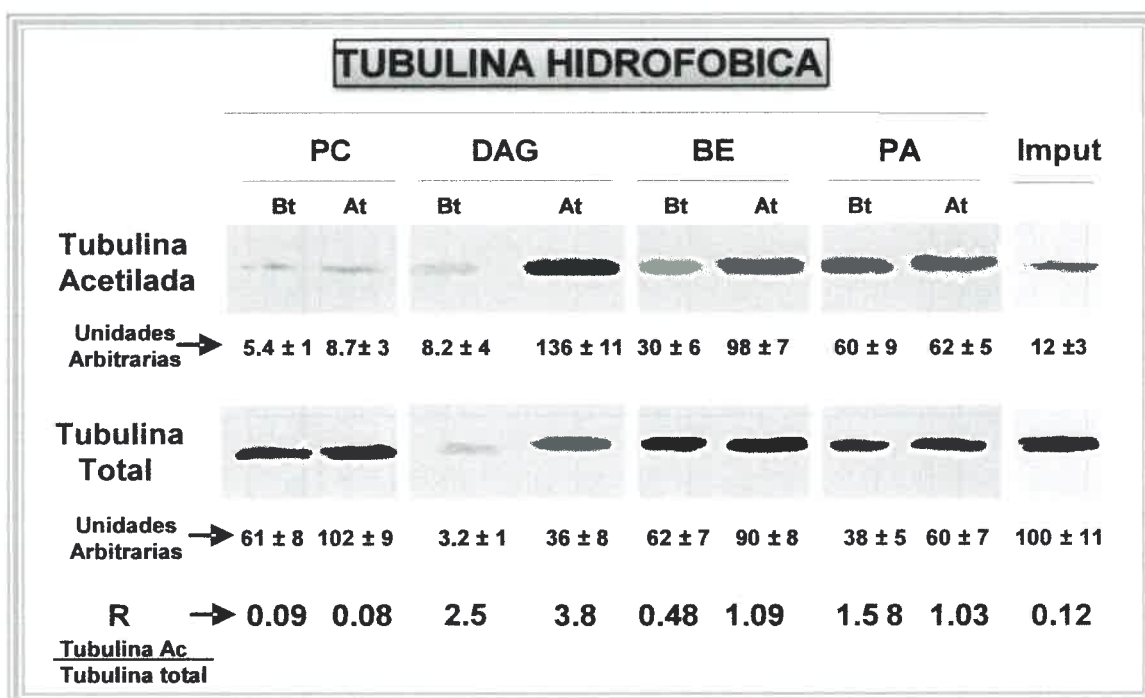
Figura 32: Análisis de tubulina utilizada en las mediciones de actividad de PMCA en diferentes reconstituciones de lípidos. Muestras de tubulina (10 µg) fueron analizadas por SDS-PAGE, posteriormente coloreadas por Coomassie blue o analizadas por western blot revelado con DM1A (anti-tubulina) y 5F10 (anti-PMCA). Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de cuatro experimentos independientes.

Resultados anteriores demuestran que en PMVs y células CAD, COS y eritrocitos, la tubulina inhibe la actividad de PMCA, este efecto se correlaciona con una mayor cantidad de tubulina acetilada en la membrana, además se demostró que PMCA y tubulina acetilada forman parte del mismo complejo. Para demostrar si el efecto que produce la tubulina sobre la actividad de PMCA inmersa en diferentes lípidos (Fig. 29-31) se debe a la interacción entre PMCA y tubulina acetilada, determinamos el

contenido de tubulina hidrofóbica que interacciona con PMCA por partición con Tritón X-114 (Núñez –Fernández y col., 1997). El aumento en el contenido de tubulina acetilada en la fracción hidrofóbica indica mayor formación del complejo tubulina acetilada/PMCA. La figura 33 muestra el contenido de tubulina hidrofóbica total y acetilada presente en las preparaciones de PMCA reconstituida en distintos fosfolípidos y adicionada con tubulina a las concentraciones que se indicaron en los experimentos, en esta figura se muestra el resultado del análisis de la fase detergente luego de la partición con Tritón X-114 por western blot revelado para tubulina total y tubulina acetilada. Las bandas observadas fueron cuantificadas con el programa Scion image, el valor obtenido se muestra debajo de cada figura.

Como se puede observar en la figura 33, a excepción del 100 % de PC, en las demás preparaciones, es decir 80 % de PC y 20 % de DAG, BE o PA la proporción de tubulina acetilada aumentó significativamente con respecto al valor obtenido en el material de entrada (input). (Fig. 33, comparar R en PC, DAG, BE y PA con el R obtenido en el input). Estos resultados sugieren fuertemente que el efecto de tubulina observado sobre la actividad de PMCA mostrado en las figuras 29, 30 y 31 se debe a un aumento en la formación del complejo tubulina acetilada/PMCA.

Podemos observar que en preparaciones que contienen DAG, BE y PA cuando son incubadas en presencia de tubulina encontramos cambios en la actividad enzimática de PMCA y aumento en la cantidad de complejo (Fig. 29-31,33 y tabla 5), mientras que el efecto de tubulina sobre la actividad enzimática fue menos significativo en preparaciones que solo contenían PC (Fig. 29 tabla 5), en este caso la cantidad de complejo tubulina acetilada/PMCA (estimada por tubulina hidrofóbica) no muestra un aumento significativo (Fig. 33).



**Figura 33: Determinación de tubulina hidrofóbica por la interacción con PMCA en preparaciones de PMCA pura reconstituida en diferentes lípidos.** PMCA purificada de cerebro de rata, reconstituida en 100 % de PC o en PC con 20 % de los lípidos indicados (DAG, BE, PA) e incubadas con baja concentración de tubulina (Bt) 25 µg/ml o alta concentración (At) 250 µg/ml, fue particionada con Tritón X-114. La tubulina hidrofóbica se obtuvo de la fase detergente y se analizó por western blot. Las muestras fueron reveladas con DM1A para tubulina total y 6-11B-1 para tubulina acetilada. La tubulina (5 µg de proteína) utilizada en los experimentos se muestra como Imput. Las bandas de tubulina obtenidas fueron cuantificadas y los valores se muestran como unidades arbitrarias. R es la relación tubulina acetilada y total en la fracción detergente. Los valores son media ± S.D. de tres experimentos independientes.

### 5.11 Efecto de la generación *in situ* de DAG en PMVs sobre la actividad de PMCA y transporte de Ca<sup>2+</sup>

Como se ha demostrado (Fig. 29-31, 33 y Tabla 5) un aumento de DAG u otros lípidos (BE y PA) dio lugar a la activación de PMCA. Dado que el incremento de la concentración de lípidos durante la reconstitución de PMCA llevó a la estimulación de la actividad de la enzima, se consideró de interés investigar el efecto de tubulina sobre la actividad PMCA cuando la concentración de lípidos cambia en un sistema de membranas intactas, es decir que PMCA se encuentre en un entorno más natural.

Con este objetivo, PMVs obtenidos de cerebro de rata fueron pre-incubados en presencia o ausencia de tubulina purificada exógena; posteriormente los sistemas se incubaron en presencia o ausencia de Fosfolipasa C (PLC) para aumentar *in situ* la

cantidad de DAG, dado que PLC hidroliza fosfolípidos, como PC, generando DAG y fosforil colina. (Ostroff y col., 1990).

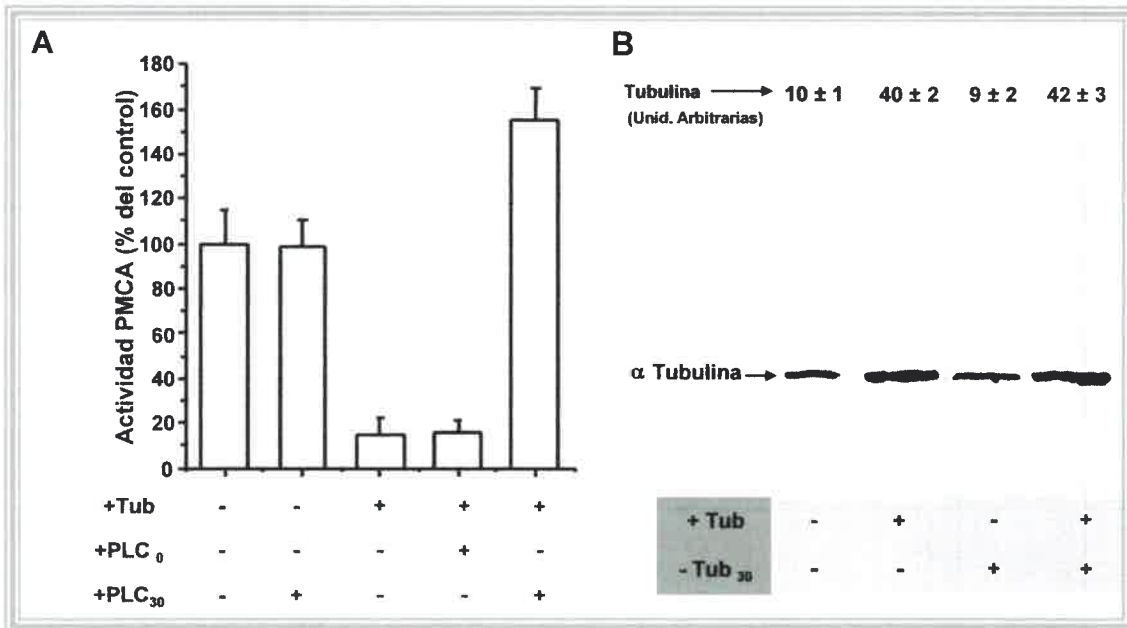
Tomando como punto de inhibición el correspondiente a 300 µg/ml de tubulina se realizaron experimentos donde las membranas fueron tratadas con PLC extraída del sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa*, pre-purificada y ensayada su actividad como se describe en procedimientos experimentales.

Los PMVs fueron tratados con PLC y se tomaron alícuotas al tiempo 0 y 30 min de incubación con PLC a 37 °C, las alícuotas se lavaron por centrifugación para eliminar a la fosfolipasa. Posteriormente se incubo a los PMVs con tubulina exógena (300 µg/ml), durante 20 min a 37 °C y se midió la actividad PMCA por el sistema de enzimas acopladas (como se describe en procedimientos experimentales) en presencia y ausencia de 2 mM de vanadato. Alícuotas de cada condición fueron tomadas para determinar la cantidad de tubulina en la membrana como una aproximación de la tubulina que forma complejo con la PMCA.

La medición de la actividad PMCA se inició inmediatamente después de la adición de PLC o después de la incubación a 37 °C durante 30 minutos en presencia de PLC. Los resultados obtenidos en esta experiencia y mostrados en la figura 34 revelan que el tratamiento de los PMVs con PLC y el posterior agregado de tubulina exógena produce un aumento en la actividad de PMCA que no es observada en las preparaciones que no contienen tubulina (Fig. 34), es decir que en ausencia de la tubulina, el incremento de DAG no modifica la actividad de PMCA. Cuando el sistema no se incubaba con el PLC, la presencia de tubulina exógena inhibe en más del 80 % de actividad PMCA (Fig. 34 A), Cuando el contenido de DAG se incrementó en PMVs por el tratamiento con PLC, la presencia de tubulina en PMVs fue claramente estimuladora de la actividad PMCA.

Alícuotas de PMVs tratadas con PLC durante 30 min en presencia de 300 µg/ml de tubulina, fueron sometidas a SDS-PAGE y posteriormente analizadas por western blot para la determinación de tubulina en membrana, como una medida de la formación de complejo tubulina/PMCA. Como muestra la figura 34 B no hay diferencia en la cantidad de tubulina en la membrana de muestras que fueron tratadas con PLC y tubulina de aquellas que solo fueron tratadas con tubulina, observamos 4 veces más de

tubulina en la membrana en las muestras tratadas con tubulina exógena y no se observan cambios en la cantidad cuando se adiciona PLC, lo que sugiere que el efecto de activación de PMCA por tubulina observado en presencia de PLC, no depende de la disociación del complejo tubulina/PMCA.



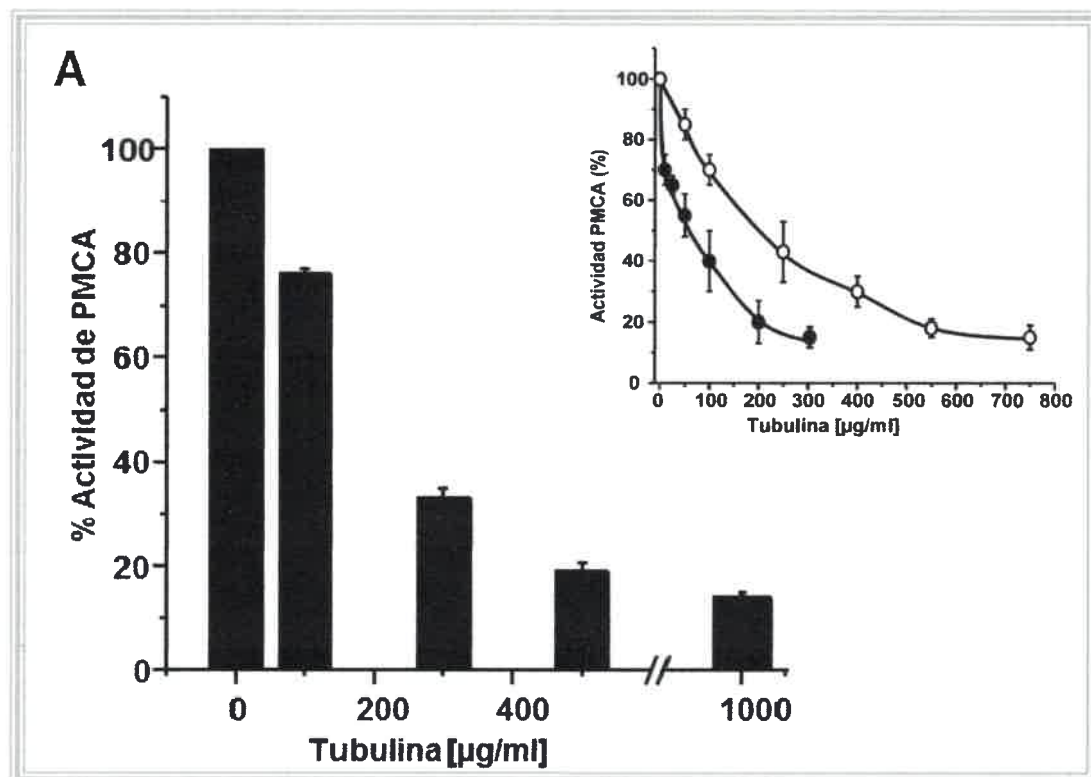
**Figura 34: Efecto de la generación de DAG por PLC sobre la actividad de PMCA.** PMVs (0,25 mg proteína) fueron incubados durante 30 min a 37 °C en un volumen final de 0,34 ml de buffer de reacción, en presencia (+) o ausencia (-) de tubulina exógena (300 µg/ml). Cuando se indica, se adicionaron 4 unidades de PLC. (A) Una alícuota de (100 µl) fue tomada para la medición de la actividad PMCA, inmediatamente después de adicionar PLC (PLC<sub>0</sub>), o después de la incubación durante 30 min (PLC<sub>30</sub>). La actividad de PMCA en ausencia de tubulina y PLC fue 0,25 ± 0,03 nmol Pi min<sup>-1</sup>mg de proteína<sup>-1</sup>. (B) Alícuotas de 100 µl fueron centrifugados a 100.000 xg durante 20 min a 37 °C para eliminar el exceso de tubulina y los pellets fueron resuspendidos en el mismo volumen y analizados por western blot utilizando DM1A (anti-tubulina). Las bandas de tubulina fueron escaneadas y los valores se muestran como unidades arbitrarias. Los valores son la media ± S.D. de tres experimentos independientes.

Para determinar si la generación de DAG por la acción de PLC en los PMVs afecta el transporte de calcio dependiente de PMCA, los PMVs fueron incubados en presencia o ausencia de tubulina purificada exógena y posteriormente se midió el transporte de calcio por PMCA, en presencia o ausencia de PLC (Fig. 36).

Para la medición de la actividad de PMCA se utilizó Fura 2-AM que revela cambios en la concentración del ion calcio internalizado en los PMVs. Previamente a la realización del ensayo en presencia de tubulina, se midió la actividad PMCA en

condiciones basales (actividad medida en concentraciones crecientes de calcio para estimular la actividad PMCA, experimentos incluidos en anexo) y posteriormente se realizó una curva de inhibición por tubulina bajo esas condiciones experimentales.

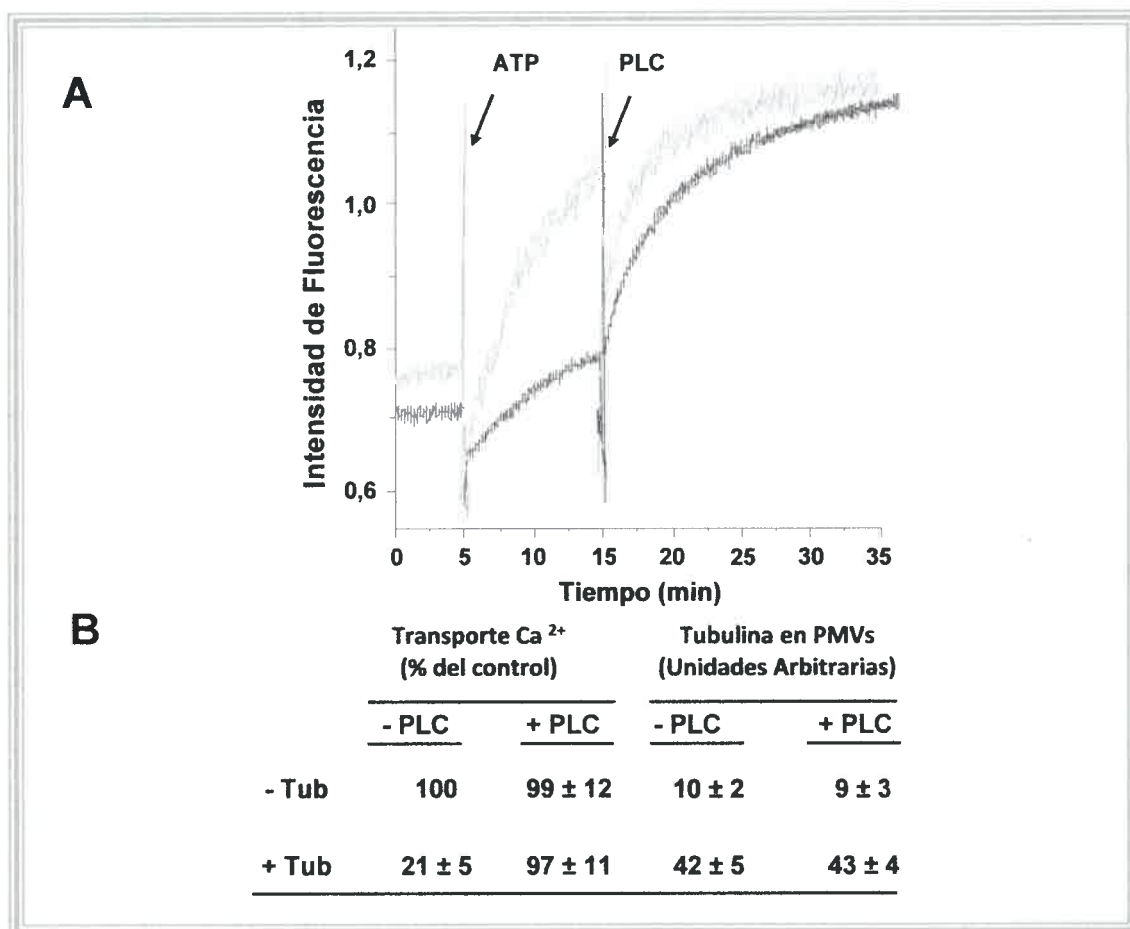
Como se observa en la figura 35 el efecto de inhibición de la actividad de PMCA por tubulina en PMVs, es medible en este nuevo sistema y coincidente con los valores relativos obtenidos de la medición de transporte con  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  (ver figura 20).



**Fig. 35: Efecto de tubulina acetilada sobre la actividad de PMCA en PMVs.** (A) PMVs (0,15 mg proteína) cargados con fura 2-AM, fueron incubados por 30 min a 37 °C en un volumen final de 0,2 ml de buffer de transporte II, en presencia de cantidades crecientes de tubulina. Luego de la incubación los PMVs fueron centrifugados por 20 min para eliminar el exceso de tubulina exógena y el pellet fue resuspendido en el mismo volumen y utilizados para las mediciones de la actividad PMCA como se describe en procedimientos experimentales. Los valores graficados corresponden a la diferencia entre presencia y ausencia de 2 mM de vanadato, la actividad en ausencia de tubulina es tomada como el 100 %. En el inserto se muestra la figura 20 que muestra el efecto de tubulina acetilada sobre la actividad de PMCA medida por captación de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  PMVs.

Con el objetivo de observar si la generación de DAG por la acción de PLC en los PMVs afecta el transporte de calcio dependiente de PMCA, se utilizó Fura 2AM. Los PMVs fueron incubados en presencia o ausencia de tubulina purificada exógena

(300  $\mu\text{g/ml}$ ) y posteriormente se midió el transporte de calcio por PMCA, en presencia o ausencia de PLC (Fig. 36).



**Figura 36: Efecto de tubulina purificada sobre la actividad de PMCA en PMVs tratados con PLC.** PMVs (1 mg proteína) cargados con fura 2-AM, fueron incubados durante 30 min en un volumen final de 1 ml en buffer de transporte II en presencia (línea negra en A, + Tub en B) o ausencia (línea gris en A, - Tub en B) de 300 $\mu\text{g/ml}$  de tubulina purificada. (A) La incorporación de calcio intravesicular en función del tiempo, fue estimada en los PMVs por la intensidad de fluorescencia utilizando Fura 2-AM como indicador. La concentración final de ATP y PLC fue de 1.5 mM y 16 IU respectivamente y adicionadas al tiempo indicado por las flechas. (B) El transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  fue estimado por la pendiente de la curva tomando los primero 5 min luego de adicionar ATP (-PLC) y luego de la adición de PLC (+PLC). Los valores son un porcentaje del control sin tubulina, ni PLC. Aliquotas (100  $\mu\text{l}$ ) de las muestras fueron lavadas por centrifugación y resuspendidas para ser analizadas por western blot y se revelaron con anti  $\alpha$ -tubulina (DM1A). Las bandas de tubulina fueron escaneadas y los valores se muestran con unidades arbitrarias. Los valores son la media  $\pm$  S.D. de tres experimentos independientes.

Previamente, los PMVs conteniendo fura se incubaron con buffer de transporte II en presencia o ausencia de una preparación de tubulina purificada exógena

(300µg/ml) durante 30 min a 37 °C posteriormente se adicionó PLC ( $\pm$  16 unidades) en un volumen final de reacción de 1 ml.

El cambio en la pendiente de la curva de intensidad de fluorescencia en función del tiempo de reacción indica un aumento en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ . Como se muestra en la figura 34 y 35, la tubulina inhibe el 80 % del transporte intravesicular de calcio y la cantidad de tubulina unida a la membrana es cuatro veces mayor. Luego del agregado de PLC a los PMVs incubados con tubulina, el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  aumento en un 97 % (Fig. 36). Para diferenciar la variación de calcio por PMCA fue tomada la diferencia en la pendiente de la curva de intensidad de fluorescencia en presencia y ausencia de 2 mM de vanadato. Los experimentos mostrados en las figuras 34 y 36 demuestran que en presencia de tubulina purificada exógena los PMVs tratados con PLC tienen mayor actividad PMCA (aumento en el transporte de calcio) que las preparaciones que no contienen a PLC.

La PLC fue obtenida del sobrenadante de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* y pre-purificada en una columna de celite como se describe en procedimientos experimentales (Liffourrena y col., 2007). Para descartar la posibilidad de que el sobrenadante que contiene PLC incluía algún componente capaz de hidrolizar a PMCA o a tubulina se realizó el siguiente control; se incubaron preparaciones de tubulina purificada en presencia o ausencia de PLC ( $\pm$  4 unidades) durante 30 min a 37 °C, una alícuota de la preparación se utilizó para determinar el contenido de tubulina por western blot, se sembró además una calle adicional (T. P.) con una cantidad de tubulina purificada mucho mayor (900 µg/ml) a fin de observar hidrólisis propia de la muestra.

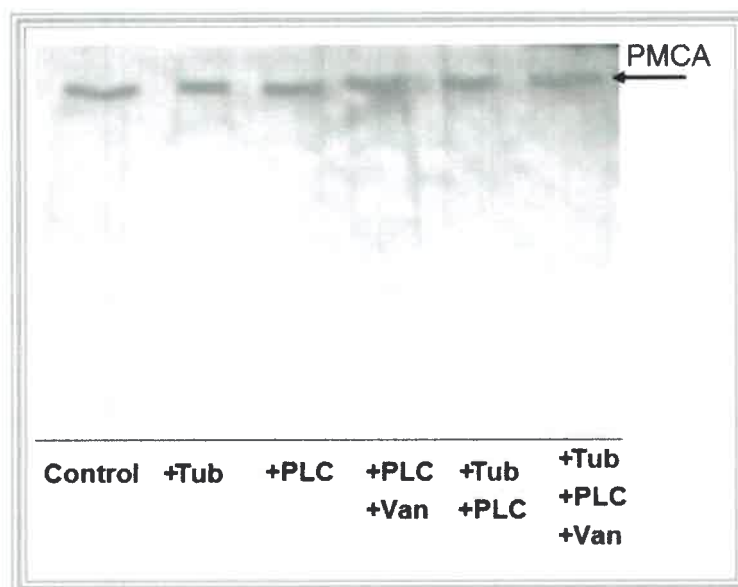
Los resultados mostrados en la figura 37 demuestran que la preparación y concentración de PLC utilizada en los experimentos no es capaz de producir ninguna alteración a la preparación de tubulina purificada.





**Figura 37:** Análisis por western blot de tubulina purificada tratada con PLC. Muestras de tubulina purificada (300µg/ml) incubadas durante 30 min a 37 °C en buffer de transporte II, en ausencia de PLC (Tub) o en presencia de PLC (Tub+PLC), un control de tubulina purificada (900µg/ml) sin tratamiento fue adicionado (T.P.). Las bandas fueron reveladas con el anticuerpo 6-11B-1 y corresponden a un experimento representativo de realizados en forma independiente.

Finalmente se realizó un control para determinar el estado de PMCA ante el tratamiento con PLC, este control es muy importante ya que la proteólisis de PMCA produce activación de su actividad enzimática (Benaim y col., 1986; Pászty y col., 2002). Como se observa en la figura 38, ninguno de los tratamientos a los que se sometió la enzima provocó hidrólisis de la PMCA.



**Figura 38:** Análisis de PMCA por western blot de PMVs tratados con PLC. PMVs (0,25 mg proteína) fueron incubados durante 30 min a 37 °C en un volumen final de 0,2 ml de buffer de transporte II, en presencia de 300µg/ml de tubulina, PLC y 1 mM vanadato cuando se indica. Alícuotas de las muestras fueron tomadas para su análisis por western blot y reveladas con anti-PMCA (5F10).

*Conclusiones  
y Discusión*

## 6.1 Efecto de la tubulina acetilada sobre la actividad PMCA: consideraciones generales

El calcio está involucrado en la regulación de muchas funciones celulares esenciales, actuando como segundo mensajero en diversas señales, su concentración dentro de las células necesita un control específico y eficiente (Carafoli, 2003), esto es llevado a cabo por proteínas especializadas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  con gran especificidad y afinidad en el espacio intracelular, una de las principales proteínas responsables del equilibrio es PMCA. Debido a la importancia de este ión en la célula y la relevancia fisiológica que representa la regulación de PMCA, integrante de la familia de las P-ATPasas decidimos investigar si la tubulina estaba implicada en la regulación enzimática de PMCA. En este trabajo de tesis se realizaron estudios que establecen que la tubulina acetilada forma un complejo con la PMCA y regula la actividad enzimática *in vitro* e *in vivo*. Tubulina descrita principalmente como proteína citoplasmática, en algunos casos adquiere un comportamiento hidrofóbico por su asociación con componentes de la membrana (Arce y col. 2008). Una condición esencial para que ocurra la interacción es que la tubulina debe estar acetilada (Santander y col., 2006). Esta regulación de la actividad PMCA por tubulina es la tercera encontrada para las ATPasas de la familia tipo P. Previamente se ha demostrado que la interacción de tubulina acetilada con NKA regula la actividad enzimática de esta bomba, como consecuencia de la interacción la actividad de NKA es inhibida, y el grado de inhibición se correlaciona con la cantidad de tubulina acetilada unida a la membrana. Este comportamiento de tubulina con NKA y su regulación, se ha observado en membrana plasmática de cerebro (Casale y col. 2001), *in vivo* en células neurales y no neurales (Casale y col. 2003; 2005) y recientemente Amaiden y col (2011) demostraron la presencia y distribución de diferentes fracciones de tubulina (membrana, estructura sedimentable y fracción soluble) en eritrocitos humanos, encontrándose que la tubulina acetilada forma un complejo con la NKA e inhibe la actividad de la enzima, en ese estudio también se demostró que en la membrana de eritrocitos de individuos hipertensos tubulina esta aumentada un 150 % y la actividad NKA parcialmente inhibida comparada con los controles normotensos, observándose que la tubulina que forma parte de la membrana y de la fracción sedimentable es la involucrada en la regulación de la actividad enzimática (Amaiden y col., 2011). En  $\text{H}^+$  ATPasa de *S. cerevisiae*, otro integrante de la familia de P-ATPasas, se ha demostrado que la

interacción de tubulina acetilada con  $H^+$  ATPasa produce la inhibición de esta enzima, mientras que, cuando la enzima es activada por glucosa el complejo formado por tubulina/ $H^+$  ATPasa se disocia, permitiendo la activación (Campetelli y col., 2005). En esta tesis hemos demostrado que el mismo isotipo de tubulina que regula la NKA y  $H^+$ -ATPasa es necesario para la interacción con la bomba calcio y que la isoforma PMCA4 participa en la formación de complejo (Fig. 15). Estos hallazgos nos lleva a pensar que es posible que la tubulina acetilada interaccione y regule la actividad de todas las P-ATPasas.

En este trabajo demostramos además que el efecto inhibitorio de tubulina sobre la PMCA es dependiente del entorno lipídico en donde estas inmersa la enzima. En presencia de lípidos ácidos la tubulina acetilada fue capaz de activar a la enzima mientras que en presencia de lípidos neutros o básicos el efecto es opuesto. Esto pone en evidencia que la regulación de la actividad PMCA por tubulina podría estar señalizada extracelularmente por efectores a nivel de membrana que activen la biosíntesis de lípidos que favorezcan la formación de un complejo tubulina acetilada/PMCA inactivo o activo. Esta activación con los diferentes lípidos en combinación con tubulina es potencialmente inhibitoria o activadora, ya que la combinación de lípidos neutros o básicos con tubulina inhibió a PMCA en un 97% y la combinación de lípidos ácidos con tubulina activo a la enzima hasta 27 veces.

## **6.2 La tubulina acetilada y PMCA forman parte de un mismo complejo**

Nosotros encontramos que existe una interacción física entre tubulina acetilada y PMCA y que esta interacción regula la actividad de la enzima. Diferentes evidencias apoyan la existencias de un complejo tubulina acetilada-PMCA en membranas: (a) PMCA y tubulina acetilada están presentes en las membranas, (b) cuando los PMVs son solubilizados en detergente y particionados en Tritón X-114, tanto PMCA como tubulina acetilada particionan en la fase detergente, mientras que tubulina acetilada es un componente hidrofílico que particionaría en la fase acuosa de no ser porque se asocia a un componente de membrana como lo es PMCA, (c) cuando las membranas fueron solubilizadas con Tritón X-100 y subsecuentemente inmunoprecipitada con 6-11B-1 unido a las perlas de sefarosa, en el precipitado encontramos ambas proteínas: PMCA y tubulina acetilada, (d) cuando las membranas fueron solubilizadas con Tritón X-100 y subsecuentemente inmunoprecipitada con 5F10 Ig. unido a perlas de sefarosa, tubulina

acetilada precipita junto con PMCA, (e) cuando las membranas son depletadas de tubulina acetilada (por tratamiento con etanol), solubilizadas con detergente e inmunoprecipitadas con 6-11B-1 unido a perlas de sefarosa la PMCA no precipita, sin embargo cuando las membranas han sido previamente incubadas con tubulina acetilada purificada exógena la PMCA precipita.

En estudios realizados por Zampar y col. (2009) demostraron que la tubulina acetilada interacciona de manera directa con el dominio citoplasmático número 5 (CD5) de NKA, proporcionando un sitio de anclaje para los microtúbulos a la membrana. Teniendo en cuenta que es posible purificar PMCA utilizando una columna de afinidad para calmodulina con alto grado de pureza, decidimos purificar a la enzima para determinar su interacción con la tubulina purificada. El hecho que PMCA esté presente en las membranas en una muy baja cantidad, aproximadamente 0.1% del total de las proteínas (Salvador y col., 1996), nos llevó a pensar que debíamos partir de una cantidad de membrana considerable para que el rendimiento de la purificación sea óptimo, motivo por el cual realizamos la extracción de membrana de eritrocitos de cerdo como describe Cura y col. (2008) y paralelamente la extracción de PMVs con la que se realizaron muchos de los experimentos desarrollados durante esta tesis. Como resultado de la extracción de membranas de cerdo, obtuvimos a PMCA hidrolizada, probablemente debido a errores de manipulación o en la refrigeración de las muestras; mientras que la obtención de membranas de cerebro de rata nos mostraban a PMCA en su peso molecular característico, motivo por el cual decidimos realizar la purificación a partir de esta membranas. La PMCA y tubulina ambas purificadas de cerebro de rata mostraron interacción cuando la enzima estaba reconstituida en lípidos ya que ambas proteínas particionaron en la fase hidrofóbica (Fig. 33). Esta interacción fue mayor en concordancia con el efecto de la tubulina sobre la actividad enzimática (Fig. 29-31 y tabla 5), la tubulina que particiono en la fase detergente (tubulina hidrofóbica) tuvo un efecto activador o inhibidor según la composición lipídica de la muestra (Fig. 29-31 y tabla 5), cuando no se observó efecto sobre la actividad enzimática tampoco se formó tubulina hidrofóbica (Fig. 29).

En esta tesis hemos realizado experimentos de inmunoprecipitación que demuestran que PMCA forma un complejo con tubulina acetilada (Fig. 15) en PMVs, luego realizamos experimentos en los cuales las dos proteínas se encuentran con alto grado de pureza y particionan en la fase detergente, por lo cual podemos concluir que la PMCA

forma parte de un mismo complejo con la tubulina. No tenemos la certeza de que existe una interacción directa entre estas proteínas, pero nuestros experimentos sugieren dos posibilidades. Una posibilidad es que ambas proteínas interactúen directamente a través de algún sitio citoplasmático de PMCA, como un dominio de interacción, como se demostró para la interacción entre tubulina y NKA (Zampar y col., 2009) y otra posibilidad es que además de las dos proteínas implicadas en el complejo existan lípidos de la membrana que participen en la formación del complejo y afecten a la regulación enzimática de PMCA por tubulina.

### **6.3 La tubulina acetilada regula la actividad PMCA in vitro e in vivo.**

PMCA se encuentra altamente regulada dado la importancia que tiene el calcio en la célula y la regulación de esta enzima ha sido motivo de muchas investigaciones; el primer regulador descrito ha sido la calmodulina que interactúa en el dominio C-terminal de PMCA, desplazándolo y eliminando la autoinhibición (Carafoli, 1994). Además de calmodulina se han descrito numerosos reguladores de la actividad PMCA: el medio ambiente lipídico donde está inmersa PMCA (Di Leva y Col., 2008), fosfolípidos ácidos (Enyedi y col., 1987; Zvarich y col., 1990), DAG (Pérez-Gordonez y col. (2009), etanol y otros alcoholes de cadena corta, que estimulan la actividad de PMCA, de manera específica para cada isoforma de PMCA (Benaim y col., 1994; Cervino y col., 1998); las proteínas quinasas A y C que pueden fosforilar los residuos de serina y treonina ubicados en el dominio de regulación y de esa manera aumentar la velocidad máxima de la enzima (James y col., 1989<sup>b</sup>; Zylinska y col., 1998). También la proteólisis parcial de PMCA produce una activación en la enzima, porque se elimina su dominio de autoinhibición (Zurini y col., 1984). Nuestros resultados demuestran que tubulina acetilada un componente de citoesqueleto es capaz de interactuar con PMCA y que la interacción regula la actividad enzimática. Cuando incubamos PMVs en presencia de etanol y/o calmodulina vemos un marcado incremento en la actividad enzimática y cuando estudiamos el comportamiento del complejo formado por tubulina y PMCA observamos una disminución en la formación de complejo, es decir que el complejo tubulina acetilada/PMCA es disociado, ya que tubulina no particiona en la fase detergente, sino en la fase acuosa, cuando previamente se incubó con etanol ó calmodulina (Fig. 16 A, B). La disociación del complejo tubulina/PMCA fue

confirmada además por los experimentos de inmunoprecipitación (Fig. 17 y 18). La disociación del complejo (disminución de tubulina acetilada en la fase detergente) por etanol ó calmodulina resulta en una estimulación de PMCA (Fig. 16 A, B), por el contrario la interacción de tubulina con PMCA (en preparaciones de PMVs incubadas con tubulina exógena 500 µg/ml) inhibe la actividad de PMCA y aumenta el comportamiento hidrofóbico de tubulina debido a su asociación con un componente hidrofóbico (PMCA o un complejo que contiene a PMCA) (Fig. 20).

En general los MTs que componen el citoesqueleto sufren cambios rápidos de polimerización/depimerización este evento es denominado inestabilidad dinámica de los microtúbulos, que ocurre permitiendo una reorganización y distribución de los mismos durante distintos requerimientos celulares. En trabajos previos hemos encontrado que agentes tales como nocodazol (depimerizante de microtúbulos) y taxol (estabilizante de microtúbulos) afecta la actividad NKA (Casale y col., 2005). Nuestros resultados muestran que la estabilidad de los microtúbulos afecta a la actividad de PMCA. Ante el agregado de taxol la actividad de PMCA se ve incrementada, y la formación de complejo tubulina acetilada/PMCA disminuido, mientras que si adicionamos nocodazol la enzima se ve inactivada (tabla 2) y la formación del complejo tubulina acetilada/PMCA notablemente disminuido, esta inhibición de la actividad creemos que resulta de un efecto intrínseco del nocodazol independientemente de su capacidad para disociar el complejo, ya que en PMVs pre-tratados con etanol y calmodulina la actividad aumento (90%) y la formación de complejo se redujo a un 30% mientras que si luego del tratamiento con estos efectores se adiciona nocodazol la actividad disminuye notablemente a un 20-27% (Tabla 3). Por lo cual concluimos que la disminución en la actividad de PMCA que observamos con la adición de nocodazol es independiente del efecto que causa la formación del complejo. Estos resultados ponen de manifiesto que la estabilidad microtubular podría afectar la actividad enzimática de PMCA, como también afecta a la actividad de NKA, en la cual el nocodazol fue capaz de activar a NKA *in vivo* por disociación del complejo, mientras que taxol no permite que el glutamato pueda activar a la enzima *in vivo* (Casale y col., 2005). Probablemente esta diferencia en cuanto a cómo afectan estas drogas sobre la actividad enzimática de las P-ATPasas dependa de la estructura de cada enzima causando un efecto diferente cuando interacciona con tubulina o microtúbulos.

Los resultados mostrados en experimentos realizados *in vivo* confirman los encontrados *in vitro* con PMVs, ante la disociación del complejo tubulina acetilada/PMCA en PMVs la actividad se ve estimulada y cuando hay mayor formación del complejo la actividad de PMCA disminuye. En efecto en células COS, CAD y eritrocitos la concentración de calcio intracelular disminuyó ante el agregado de etanol acompañado por una disminución en la formación del complejo tubulina acetilada/PMCA (Fig. 21, 22 y 23) o de la tubulina en la membrana. En eritrocitos la isoforma mayoritaria expresada de PMCA es la 4, isoforma que también está presente en PMVs (Fig. 15) y en los experimentos realizados con preparaciones de PMCA purificada (Fig. 28 y tabla 4), esto sugiere que por lo menos la isoforma 4 está involucrada en la formación del complejo.

Experimentos realizados en células CAD nos demostraron que un aumento de tubulina acetilada conduce a un incremento de la asociación de tubulina a la membrana, en consecuencia hay mayor formación del complejo tubulina acetilada/PMCA y la inhibición de la actividad enzimática de PMCA, por el contrario cuando las células fueron tratadas con etanol, tubulina acetilada no fue encontrada en el precipitado indicando la disociación del complejo y activación de PMCA. Nosotros estudiamos este efecto en células que carecen de tubulina acetilada (Células CAD) (Santander y col., 2006), las cuales demostraron que no son capaces de formar complejo tubulina/PMCA (Fig. 23B). Cuando en la membrana celular está presente tubulina acetilada (por adición de TSA) el complejo tubulina acetilada/PMCA está presente (Fig. 23B). En células que poseen tubulina acetilada incubadas en presencia de vanadato de sodio, el agregado de ionoforo para calcio A23187 fue capaz de incrementar el calcio intracelular y el posterior agregado de etanol no resultó en un cambio en la concentración de calcio intracelular, indicando que la disminución en los niveles de calcio observado en ausencia de vanadato corresponde a la actividad de PMCA (Fig. 23C, + TSA) en células que no contienen tubulina acetilada el agregado de etanol en ausencia de vanadato de sodio tampoco produjo un cambio significativo en los niveles de calcio, lo que nos lleva a pensar que el efecto de etanol sobre la actividad de PMCA involucra fuertemente a la disociación del complejo tubulina acetilada/PMCA (Fig. 23C, -TSA).



#### **6.4 El entorno lipídico del complejo tubulina acetilada/PMCA afecta la regulación enzimática.**

Teniendo en cuenta que la actividad de PMCA se ve influenciada por el entorno lipídico donde se encuentra inmersa (Tang y col., 2006) podríamos pensar que así como influye sobre la actividad de PMCA puede influir también en el efecto que causa la tubulina sobre la bomba de calcio. Como fue descrito por Di Leva y col. (2008) PMCA es influenciada por los lípidos que la rodean, una vez obtenida PMCA a partir de PMVs fue reconstituida en diferentes lípidos a fin de conocer como es su influencia sobre la actividad. Las figuras 28-31, 33-36 y tablas 4-5 demuestran que la regulación de PMCA por tubulina está influenciada por el entorno lipídico de tal manera que el efecto inhibitorio de la tubulina descrito en los resultados previos (Fig.16 y 20) se puede cambiar, incluso a un efecto activador cuando están presentes diferentes lípidos. Esta conclusión está basada en las siguientes observaciones: (I) PMCA de PMVs purificada y reconstituida en PC o PC con DAG, BE o PA fue activada por la adición de tubulina en concentraciones por debajo de 50  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 29, 30,31 y Tabla 5), (II) Cuando PMCA de PMVs fue reconstituida en PC con los lípidos ácidos (BE y PA) y adicionada con altas concentraciones de tubulina purificada, la actividad fue estimulada, mientras la actividad de PMCA se encuentra inhibida cuando las mismas concentraciones de tubulina son adicionadas a preparaciones de PMCA reconstituida en PC o PC y DAG (Fig. 29, 30,31 y Tabla 5), (III) La actividad de PMCA resulta inhibida por el aumento de la concentración de tubulina (Monesterolo y col., 2008) cuando la enzima está inmersa en los PMVs, que en su composición lipídica contiene predominantemente colesterol que es un lípido neutro (Smith, 1973), (IV) PMCA purificada a partir de eritrocitos humanos y reconstituida en PC fue activada por la adición de tubulina hasta 5 veces (Fig. 28), (V) la generación de DAG por la acción de fosfolipasa C in vitro en PMVs elimino la inhibición producida por tubulina, obteniendo mayor actividad y mayor transporte de calcio dependiente de PMCA, en presencia de tubulina luego del tratamiento con PLC, mientras que la cantidad de tubulina unida a los PMVs se mantiene bajo estas condiciones (Fig. 34), (VI) La tubulina interacciona con otras P-ATPasas, inhibiendo su actividad enzimática (Arce y col., 2008), de acuerdo con nuestra hipótesis la tubulina es capaz de activar a la enzima en presencia de lípidos ácidos, tubulina activa a  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa de membrana plasmática en células gástricas epiteliales (Campetelli AN y Casale CH datos no publicados), debido a que

aproximadamente el 35% del contenido lipídico de las membranas es cardiolipina, un fosfolípido ácido (Slomiany y col., 1978), resultados similares encontramos cuando PMCA se reconstituye en PC con PA (Fig. 31 y Tabla 5).

Calmodulina, etanol y lípidos ácidos han sido descritos como activadores de PMCA (Benaim y col., 1974; Jarret y col., 1977), nuestros resultados muestran que la mayor activación se encuentra cuando utilizamos PA en la reconstitución de PMCA, logrando una activación de la enzima de 7 veces (Fig. 27 y Tabla 5). En esta tesis demostramos que la tubulina, junto con los lípidos regulan la actividad PMCA y son efectores muy potentes, tanto en la activación, como en la inhibición de la enzima. La tubulina en combinación lípidos ácidos alcanza la mayor activación de PMCA, por el contrario, la adición de tubulina en altas concentraciones en combinación con lípidos neutros resultan en la inhibición de la actividad enzimática (observar figura 20 y 29).

Cuando la enzima se reconstituyó en PC con PA la actividad de PMCA aumento 7 veces (en ausencia de tubulina), mientras que cuando adicionamos tubulina a esta preparación la actividad de PMCA aumenta 27 veces, mostrando un efecto en conjunto de tubulina y PA sobre la activación de la enzima. Cuando la reconstitución se realizó con PC y DAG la activación de PMCA fue de 4 veces, mientras que la adición de los dos efectores, DAG + tubulina, eliminó más del 50% de la activación producida por DAG.

En PMVs se ha descrito que contienen baja proporción de lípidos ácidos, fundamentalmente contienen colesterol y esfingolípidos (Smith, 1973), cuando adicionamos tubulina a los PMVs vemos un 80 % de inhibición de la actividad PMCA y la inhibición pudo ser revertida por la generación de DAG (Fig. 34 y 36).

La acción conjunta entre la tubulina y los lípidos sobre la actividad de PMCA podría tener un papel clave fisiológica en la célula. Nuestros resultados demuestran que el efecto de tubulina sobre la actividad de PMCA depende de la composición de los lípidos de membrana. En este sentido, podemos imaginar dos estados de lípidos, una es que la estructura de la membrana varía dependiendo del tipo de células (Smith 1973; Slomiany y col., 1978) y otra es que la misma membrana puede cambiar su composición momentáneamente dependiendo de las necesidades de la célula, utilizando diversas señales celulares que pueden desencadenar cambios en los lípidos que rodean a

determinada proteína (Dejda y col., 2006; Brandeburgo y col., 2008). En el primer caso, el efecto que producirá tubulina sobre la actividad PMCA que se registrará por la composición lipídica de la membrana, es decir en aquellas membranas que contengan alto contenido de lípidos ácidos la tubulina activará a PMCA, mientras que si los lípidos predominantes son neutros tubulina a altas concentraciones producirá inhibición de la actividad de PMCA. El segundo caso, está más relacionado con la señalización celular, como por ejemplo, la activación de fosfolipasas conduce a la generación de lípidos neutros y ácidos. Si se estimula la actividad de PLC, se genera DAG, mientras que si se estimula PLD se genera PA, en el caso de la generación de lípidos neutros la tubulina puede inhibir o activar a PMCA dependiendo de la cantidad de tubulina presente en la membrana y en el caso de los lípidos ácidos, la actividad de PMCA resultará en una estimulación independiente de la concentración de tubulina en la membrana y dependiente de la cantidad del lípido ácido presente.

Ha sido descrito que la proteína G subunidad  $\alpha$  interacciona de manera directa con tubulina, tubulina también interacciona con PLC $_{\beta 1}$ , y PIP $_2$ , una vez formado este complejo los microtúbulos son más dinámicos y también se observa una disminución de la actividad de PLC debido a la falta de disponibilidad de su sustrato natural PIP $_2$  (Popova y col., 1997). Las señales celulares tales como la estimulación de PLC pueden conducir a la síntesis *in vivo* de diacilglicerol. Este tipo de señales tienen relación con los estudios del efecto de la tubulina sobre la actividad PMCA en presencia de PLC. Por este motivo, es de interés estudiar qué señales celulares, involucradas en cambios lipídicos, causan efecto *in vivo* sobre la actividad PMCA cuando la enzima está formando un complejo con tubulina acetilada. Estos hallazgos abren la puerta a nuevos estudios que relacionan las señales celulares dependientes de la proteína G, tubulina y PMCA.

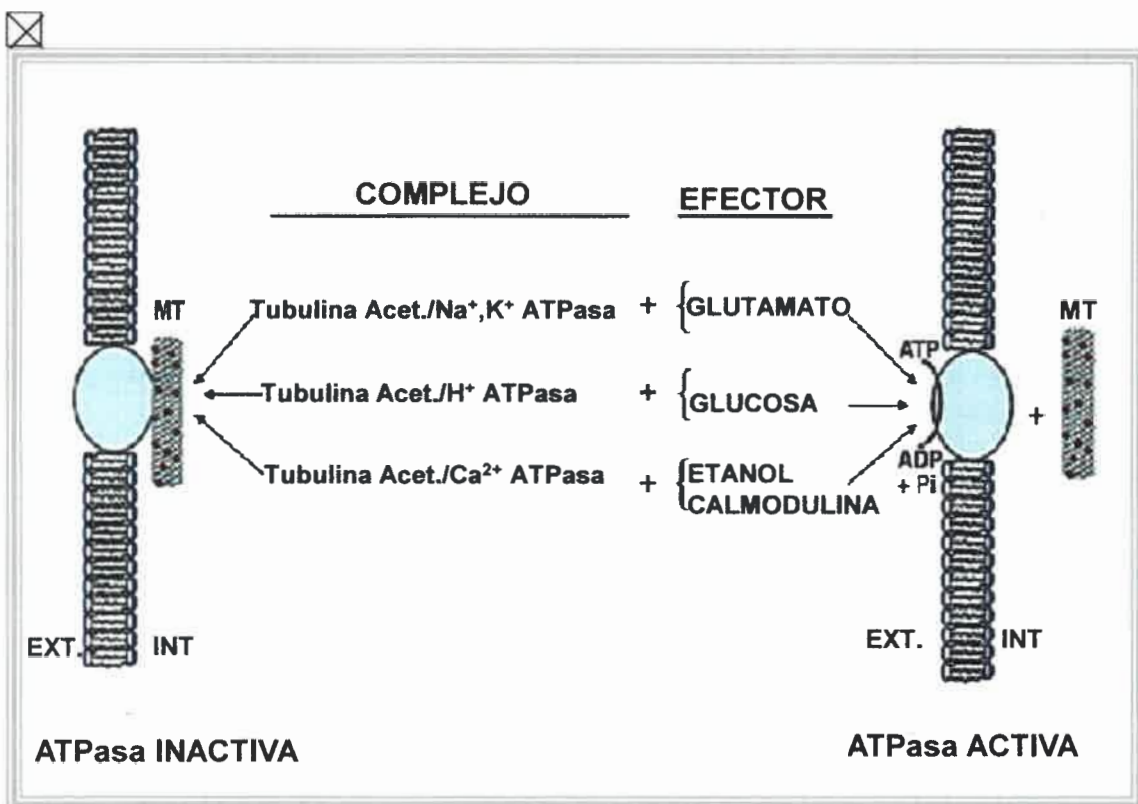
### **6.5 Estado actual del conocimiento sobre las interacciones tubulina/P-ATPasa y perspectivas**

La interacción reversible de la tubulina acetilada con las bombas de sodio, protón y calcio regula sus respectivas actividades catalíticas. Esta es la primera función demostrada para la acetilación de la tubulina. Queda por determinar si la tubulina acetilada interactúa y regula todas las ATPasas, o sólo lo hace sobre ATPasas del tipo P. Es interesante que tres diferentes ATPasas pueden formar un complejo con la misma

molécula, tubulina acetilada. HDAC6, enzima que deacetila a la tubulina (Hubbert y col., 2002) puede desempeñar un papel crucial de acetilación de tubulina y evitar así su asociación con ATPasas. Los factores externos l-glutamato, glucosa y etanol indujeron la disociación de, respectivamente, los complejos  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$  -,  $\text{H}^+$  - y  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa/tubulina (Fig. 16-18). Puede haber mecanismos adicionales o complementarios que conducen a la disociación de los complejos ATPasa/tubulina y la modulación de las actividades ATPasas. La disociación de los complejos inducida por compuestos endógenos parece depender de la organización espacial de las moléculas involucradas. Por ejemplo, la disociación de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa de la tubulina acetilada inducida por L-glutamato requiere flujo de iones  $\text{Na}^+$  en la célula (Casale y col., 2005),  $\text{H}^+$ -ATPasa de *S. cerevisiae* se disocia de tubulina acetilada por acción de LPX1, inducida por glucosa, LPX1 hidroliza a la tubulina de membrana (Campetelli y col., 2005, 2010); y la disociación del complejo tubulina acetilada/PMCA es provocada por la estimulación que produce calmodulina y etanol. Debido a que tubulina acetilada se encuentra en los complejos formados con  $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ,  $\text{H}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas, la disociación de estos complejos inducida, respectivamente, por L-glutamato, glucosa y etanol/calmodulina, demuestra que utiliza vías específicas para cada ATPasa y no un mecanismo común dirigido a tubulina acetilada.

En los últimos tres años hemos avanzado sobre el estudio de la regulación de la actividad ATPasa por la asociación/disociación de tubulina acetilada a la enzima, aunque aún se encuentra en fase de estudio de investigación básica. Molecularmente sabemos que la tubulina acetilada interacciona de manera directa con el dominio citoplasmático número 5 (CD5) de  $\text{Na}^+, \text{K}^+$  ATPasa (NKA), proporcionando un sitio de anclaje para los microtúbulos a la membrana (Zampar y col., 2009). Tal anclaje podría ser un punto de interacción entre las señales internas y externas de la célula. La interacción de ambas proteínas se obtiene principalmente con microtúbulos parcialmente dinámicos, ya que se ha observado que los microtúbulos completamente estabilizados no son adecuados para establecer la interacción con  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasa, ni para la disociación del complejo por el tratamiento con glutamato (Casale y col., 2005). La modulación de la asociación/disociación de la tubulina con ATPasa controla el flujo de información desde el interior al exterior de la célula, por ejemplo, una señal originada en el núcleo o en el citoplasma para ser transmitida puede requerir de la ATPasa activa, y esta puede ser bloqueada o estimulada a nivel de membrana por su

asociación con tubulina acetilada. De la misma manera la información proveniente del medioambiente externo (por incorporación de iones, factores tróficos, aminoácidos, neurotransmisores, etc.) pueden disociar el complejo, activando a las ATPasas y transmitiendo señales al citoplasma. Las actividades ATPasas son cruciales en la recepción/transmisión de señales a nivel de la membrana. Activadores endógenos de estas bombas, por ejemplo, aducina en el caso de la bomba de sodio (Ferrandi y col., 1999) y calmodulina en el caso de la PMCA (Jarrett y col., 1977) son factores importantes en la regulación de la señalización.



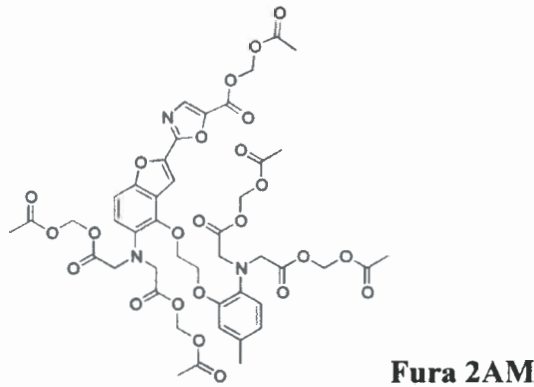
**Figura 39: Representación esquemática del efecto de la disociación de diferentes compuestos en microtúbulos anclados a las bombas de sodio, protón y calcio. NKA de células neurales y no neurales, H<sup>+</sup>-ATPasa de levadura y PMCA de la membrana de las vesículas de cerebro no mostraron actividad enzimática cuando se asocian a los microtúbulos acetilados. Los microtúbulos son liberados de membranas, debido al tratamiento con el efector indicado lo que resulta en aumento de las actividades enzimáticas (Arce y col., 2008).**

*Anexo*

### 7.1 Medición de actividad de $\text{Ca}^{2+}$ ATPasa con fura 2AM

La evaluación del rol de calcio como segundo mensajero dentro de la célula ha llevado al desarrollo de métodos que permitan observar los cambios citosólicos en la concentración de este ion.

Fura-2AM (2-acetoxymethyl éster Fura), es un quelante fluorescente para calcio, que atraviesa las membranas celulares y una vez dentro de la célula los grupos acetoximetil se eliminan por las esterasas celulares. La eliminación de los ésteres acetoxymethyl regenera "Fura-2", el fura tiene la particularidad de formar un complejo con el calcio, cuando este se encuentra unido a fura se excita a una longitud de onda (380 nm), distinta a la que se excita cuando se encuentra sin calcio (340 nm), tanto el fura libre como el unido a calcio emite a 510 nm, esto permite estimar concentraciones de calcio basado en la relación de fluorescencia 340/380 en sistemas biológicos.

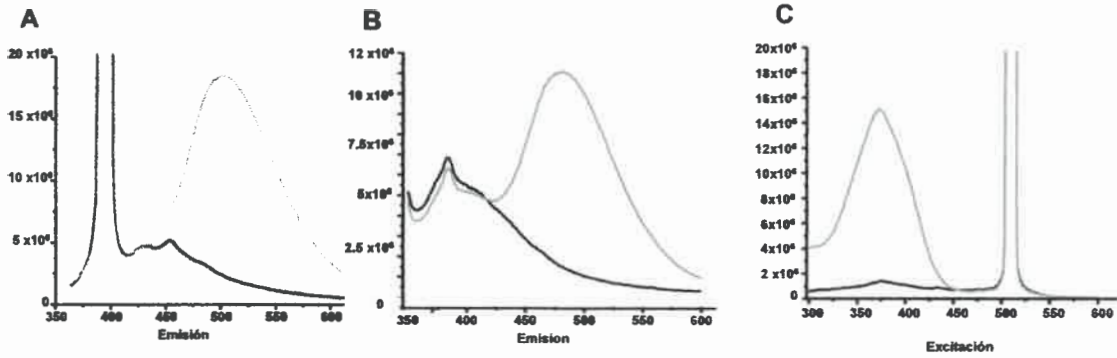


**Figura 40:** Estructura química de Fura 2AM.

#### Metodología aplicada a la utilización de Fura-2AM

Los PMVs obtenidos como se ha descrito anteriormente fueron resuspendidos en HEPES 10 mM e incubados con 10  $\mu\text{M}$  Fura-2AM, durante 30 min a 30 °C con agitación suave. Luego fueron lavados por centrifugación y resuspensión en HEPES 10 mM para la eliminación de Fura-2AM excedente. Para la realización de las mediciones 0,15 mg de PMVs fueron resuspendidos en buffer de transporte II conteniendo: 50 mM de Tris-ClH, pH 7,4, 100 mM ClK, 75  $\mu\text{M}$  EGTA, 5 mM  $\text{NaN}_3$ , 400 nM thapsigargin, 2,5 mM  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y 0,1 mM  $\text{CaCl}_2$  para tener una concentración libre de  $\text{Ca}^{2+}$  de 4  $\mu\text{M}$ .

Antes de comenzar con los experimentos de actividad  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa se realizaron controles de incorporación de fura, tanto en células como en PMVs. Estos controles comprenden la utilización de células o vesículas cargadas y no cargadas con fura para establecer la diferencia en la intensidad de fluorescencia (Fig 41).

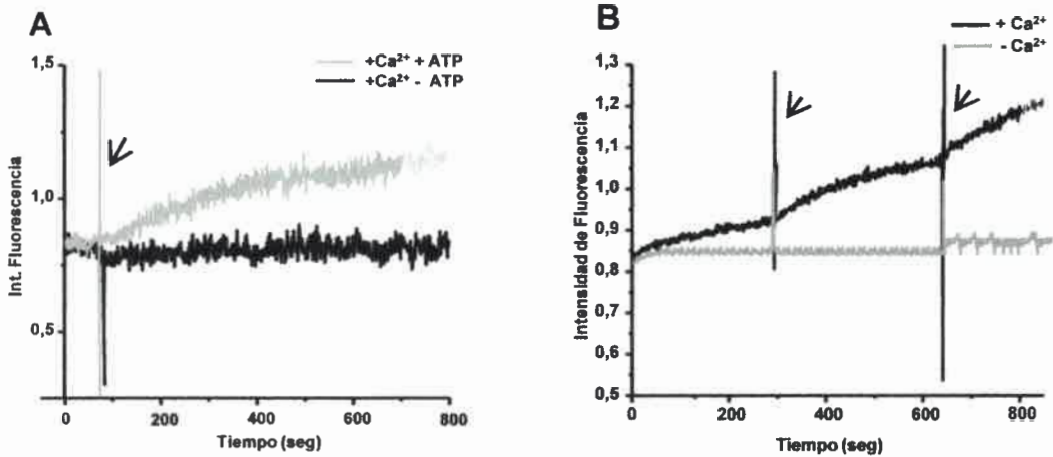


**Figura 41: Espectro de excitación y emisión para Fura.** Intensidad de fluorescencia de PMVs con fura (línea gris) PMVs sin fura (línea negra) (A) Intensidad de fluorescencia de emisión cuando se excita a 380 nm (B) Intensidad de fluorescencia de emisión cuando se excita a 340 nm (C) Intensidad de fluorescencia de excitación midiendo la emisión a 510 nm.

Como puede observarse en la figura 41 la intensidad de fluorescencia de emisión y excitación cambia notablemente cuando los PMVs incorporan fura. En células vivas se observó el mismo comportamiento para la incorporación de fura.

Para medir la actividad de PMCA, PMVs fueron expuestos a diferentes condiciones a fin de observar cambios en la intensidad de fluorescencia, como producto de la incorporación de calcio. Los PMVs luego de incorporar fura fueron adicionados con calcio, en presencia y ausencia de ATP o adicionados con ATP en presencia y ausencia de calcio, a fin de visualizar si ocurre incorporación de calcio a las vesículas (PMVs) por acción de PMCA (en las células PMCA es la encargada de expulsar calcio al exterior celular con gasto de ATP, en este caso al tener vesículas el calcio será incorporado desde el exterior celular hacia el interior porque solo la PMCA que se encuentra invertida tiene acceso al ATP adicionado al medio de reacción).





**Figura 42: Intensidad de fluorescencia de fura en PMVs. (A)** PMVs en presencia de calcio y ATP (línea gris) en ausencia de ATP (línea negra) **(B)** PMVs en presencia de ATP y calcio (línea negra) en ausencia de calcio (línea gris).

La figura 42 muestra que los PMVs incorporan calcio de manera dependiente de ATP, esta incorporación de calcio es debida a la actividad de PMCA, otro control fue realizado en presencia de vanadato de sodio, resultando nula la incorporación de calcio a los PMVs (grafico no mostrado).

Para poder estimar el transporte de calcio basado en los cambios en la intensidad de fluorescencia utilizamos la fórmula matemática desarrollada por Grynkiewicz y col., la cual permite calcular la concentración de calcio intracelular basado en la intensidad de fluorescencia obtenida con el indicador fura:

$$[Ca^{2+}] = K_d (R - R_{min} / R_{max} - R) \times (S_f / S_b)$$

Donde  $K_d$  constante de disociación de fura 2AM, en el buffer utilizado la misma tiene un valor de 224  $\mu M$ ;  $R$  es el cociente de las lecturas a las longitudes de onda utilizadas (340/380 nm);  $R_{max}$  y  $R_{min}$  se calcularon midiendo el cociente de fluorescencia a 340 nm y 380 nm, de una solución saturada de  $Ca^{2+}$  y fura, y de una solución sin  $Ca^{2+}$  y con EGTA respectivamente.  $S_f/S_b$  es el cociente de fluorescencia a 380 nm de una solución sin calcio dividida por el de una solución saturada.

Con la utilización de este sistema se han realizado algunos de los experimentos presentados en esta tesis (21-23, 35 y 36).

Buffer A: 5 mM HEPES, pH 7.4, 135 mM NaCl, KCl 5.4 mM, 1.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM D-glucosa.

Buffer de lisis E: 5 mM de fosfato, 1 mM EDTA, pH 7.4.

Buffer de acoplamiento: 0.5 M de NaCl; 0.2 M de NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.2.

Buffer de elución: 20 mM de HEPES/KOH, pH 7.4; 20% glicerol; 130 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM dithiothreitol (DTT); 1 mM fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF); 1 mM EGTA; 0,05% de C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>.

Buffer de equilibrio: 20 mM de HEPES/KOH, pH 7.4; 20% glicerol; 130 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM DTT; 1 mM PMSF; 100 μM CaCl<sub>2</sub>; 0.05% C<sub>12</sub>E<sub>10</sub>.

Buffer de purificación: 20 mM de HEPES/KOH, pH 7.4; 20% glicerol; 130 mM KCl; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM dithiothreitol (DTT); 1 mM fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF); 0.5mM CaCl<sub>2</sub>.

Buffer de reacción: 50 mM de HEPES/KOH, pH 7.4; 100 mM ClK; 5 mM NaN<sub>3</sub>, 2 mM Cl<sub>2</sub>Mg; 0.22 mM NADH; 0.42 mM fosfoenolpiruvato; 10 I.U piruvato kinasa y 28 I.U lactato deshidrogenasa y el calcio necesario para alcanzar una concentración de Ca<sup>2+</sup> libre igual 2.4 μM en un vol. final de 0.34 ml (establecido por CaCl<sub>2</sub>/EGTA), calculada utilizando el programa *WEBMAXC STANDARD*.

Buffer de transporte I: 50mM de Tris-HCl, pH 7.3; 100 mM ClK, 20 mM PO<sub>4</sub>Na<sub>3</sub>, 95 μM EGTA, 5 mM NaN<sub>3</sub>, 400 nM thapsigargin, 2.5 mM Cl<sub>2</sub>Mg y <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> (1 x 10<sup>5</sup>dpm/nmol) para tener una concentración libre de Ca<sup>2+</sup> de 10 μM.

Buffer de transporte II: 50 mM de Tris-ClH, pH 7.4, 100 mM ClK, 75 μM EGTA, 5 mM NaN<sub>3</sub>, 400 nM thapsigargin, 2.5 mM Cl<sub>2</sub>Mg y 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> para tener una concentración libre de Ca<sup>2+</sup> de 4 μM.

Buffer E: 1mM de EGTA, 10 mM Tris-Cl pH 7.8 a 4 °C.

Buffer HBS: 135 mM NaCl, 5 mM ClK, 1 mM Cl<sub>2</sub>Mg, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM d-glucosa, 25 mM HEPES, pH 7.4.

Buffer I: 10 mM de HEPES/KOH, 0.32 M sacarosa, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM β-Mercaptoetanol, pH 7.4 a 4°C.

Buffer MEM: 100 mM Mes, pH 6.7, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, y 1 mM EGTA

PBS-glucosa: 10 mM fosfato, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.5 mM EDTA, 5 mM D-glucosa, pH 7.4.

Solución de decoloración: 40% de metanol, 10% de ácido acético en agua.

Solución de lisis: 10 mM de HEPES/KOH, 1mM EDTA, 2 mM β-mercaptoetanol pH 7.4.

TBS: 150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl pH 7.4.



*Referencias*

- Adamo H, Grimaldi M.** Functional consequences of relocating the C-terminal calmodulin-binding autoinhibitory domains of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump near the N-terminus. *Biochem. J.* 331: 763-766, 1998.
- Albert B, Bray D, Lewis J, Raff D, Roberts K, Watson J.** *Biología molecular de la célula.* Barcelona: Omega. ISBN 54-282-1351, 2004.
- Alonso A, Nuñez-Fernandez M, Beltramo D, Casale C, Barra H.**  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase was found to be the membrane component responsible for the hydrophobic behaviour of the brain membrane tubulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253: 824-827, [Erratum: 257, 642] 1998.
- Amaiden M, Santander V, Monesterolo N, Campetelli A, Rivelli J, Previtali G, Arce A, Casale C.** Tubulin pools in human erythrocytes: altered distribution in hypertensive patients affects  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity. *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 1755-1768, 2011.
- Arce C, Casale C, Barra H.** Submembraneous microtubule cytoskeleton: regulation of ATPases by interaction with acetylated tubulin, *FEBS J.* 275: 4664-4674, 2008.
- Arce C, Rodriguez J, Barra H, Caputo R.** Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. *Eur J Biochem;* 59: 145-149, 1975.
- Audebert S, Desbruyeres E, Gruszczynski C, Koulakoff A, Gros F, Denoulet P, Edde B.** Reversible polyglutamylation of alpha- and beta-tubulin and microtubule dynamics in mouse brain neurons. *Mol Biol Cell;* 4: 615-626, 1993.
- Baas P, Black M.** Individual microtubules in the axon consist of domains that differ in both composition and stability. *J. Cell Biol.* 111: 495-509, 1990.
- Barra H, Arce C, Rodriguez J, Caputto R.** Some common properties of the protein that incorporates tyrosine as a single unit and the microtubule proteins. *Biochem Biophys Res Commun;* 60: 1384-1390, 1974.
- Barra H, Rodriguez J, Arce C, Caputto R.** A soluble preparation from rat brain that incorporates into its own proteins [ $^{14}\text{C}$ ] arginine by a ribonuclease-sensitive system and [ $^{14}\text{C}$ ] -tyrosine by a ribonuclease-insensitive system. *J Neurochem;* 20: 97-108, 1973.
- Beltramo D, Nuñez M, Alonso A, Barra H.** The relationship of hydrophobic tubulin with membranes in neural tissue. *Mol.Cel.Biochem.* 141:57- 63, 1994.

- Benaim G, Cervino V, Lopez-Estraño C, Weitzman C.** Ethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1195: 141-148, 1994.
- Benaim G, Clark A, Carafoli E.** ATPase activity and  $Ca^{2+}$  transport by reconstituted tryptic fragments of the  $Ca^{2+}$  pump of the erythrocyte plasma membrane. *Cell Calcium*. 3: 175-186, 1986.
- Bradford M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976.
- Brandenburg L, Konrad M, Wruck C, Koch T, Pufe T.** Involvement of formyl-peptide-receptor-like-1 and phospholipase D in the internalization and signal transduction of amyloid beta 1-42 in glial cells, *Neuroscience* 156: 266-276, 2008
- Bressac C, Bre M, Darmanaden-Delorme J, Laurent M, Levilliers N, Fleury A.** A massive new posttranslational modification occurs on axonemal tubulin at the final step of spermatogenesis in *Drosophila*. *Eur J Cell Biol* 67: 346-355, 1995.
- Brini M, Carafoli E.** Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev.* 89: 1341-1378, 2009.
- Bublitz M, Poulsen H, Morth J, Nissen P.** In and out of the cation pumps: P-Type ATPase structure revisited *Current Opinion in Structural Biology* 20: 431-439, 2010.
- Campetelli A, Previtali G, Arce C, Barra H, Casale C.** Activation of plasma membrane  $H^{+}$ -ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by glucose is mediated by dissociation of  $H^{+}$ -ATPase/acetylated tubulin complex. *FEBS J.* 272: 5742-5742, 2005.
- Campetelli A, Ortiz E, Monesterolo N, Amaiden M, Previtali G, Valdez-Taubas J, Casale C.** Lpx1p serin protease participates in the glucose-induced *s. cerevisiae*  $H^{+}$  -ATPase activation. *Biocell* 34: 84. ISSN: 0327- 9545, Supplement 2010.
- Carafoli E, Zurini M.** The  $Ca^{2+}$ -pumping ATPase of plasma membranes. Purification, reconstitution and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 683: 279-301, 1982.
- Carafoli E.** "Calcium pump of the plasma membrane". *Physiological Reviews* 71: 129-153, 1991.
- Carafoli E.** The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 326-332, 2003.

- Carafoli, E.** Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *Faseb J.* 8: 993-1002, 1994.
- Caride A, Filoteo A, Enyedi A, Verma A, Penniston J.** Detection of isoform 4 of the plasma membrane calcium pump in human tissues by using isoform-specific monoclonal antibodies. *Biochem J.* 316: 353-359, 1996.
- Casale C, Alonso A, Barra H.** Brain plasma membrana  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase is inhibited by acetylated tubulin. *Mol. Cell Biochem.* 216: 85-95, 2001
- Casale C, Previtali G, Barra H.** Involvement of acetylated tubulin in the regulation of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activity in cultured astrocytes. *FEBS Lett.* 534: 115-118, 2003.
- Casale C, Previtali G, Serafino J, Arce C, Barra H.** Regulation of acetylated tubulin/ $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase interaction by L-glutamate in non-neural cells: involvement of microtubules. *Biochimica et Biophysica Acta* 1721: 185- 192, 2005.
- Cervino V, Benaim G, Carafoli E, Guerini D.** The effect of ethanol on the plasma membrane calcium pump is isoform-specific. *J Biol Chem.* 273: 29811-298115, 1998.
- Chae Y, Lee S, Lee H, Heo K, Kim J, Kim J, Suh P, Ryu S.** Inhibition of muscarinic receptor-linked phospholipase D activation by association with tubulin. *J Biol Chem.* 280: 3723-3730, 2005.
- Choquette D, Hakim G, Filoteo A, Plishker G, Bostwick J, Penniston J.** Regulation of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases by lipids of the phosphatidylinositol cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 908-915, 1984.
- Civelek V, Hamilton J, Tornheim K, Kelly K, Corkey B.** Intracellular pH in adipocytes: effects of free fatty acid diffusion across the plasma membrane, lipolytic agonists, and insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 10139-10144, 1996.
- Colina C, Cervino V, Benaim G.** Ceramide and sphingosine have an antagonistic effect on the plasma-membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from human erythrocytes. *Biochem J.* 362: 247-251, 2002.
- Cura C, Corradi G, Rinaldi D, Adamo H.** High sensibility to reactivation by acidic lipids of the recombinant human plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase isoform 4xb purified from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 2757-2764, 2008.
- Dean W.** Role of platelet plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in health and disease. *World J Biol Chem.* 1: 265-270, 2010.

- Dejda A, Jozwiak-Bebenista M, Nowak J.** PACAP, VIP, and PHI: effects on AC, PLC, and PLD driven signaling systems in the primary glial cell cultures. *Ann N Y Acad Sci.* 1070: 220-225, 2006.
- Di Leva F, Domi T, Fedrizzi L, Lim D, Carafoli E.** The plasma membrane  $Ca^{2+}$  ATPase of animal cells: Structure, function and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 476: 65-74, 2008.
- Dimitrov A, Quesnoit M, Moutel S, Cantaloube I, Poüs C, Perez F.** Detection of GTP-tubulin conformation in vivo reveals a role for GTP remnants in microtubule rescues. *Science.* 322: 1353-1356, 2008.
- East J, Lee A.** Lipid selectivity of the calcium and magnesium ion dependent adenosine triphosphatase, studied with fluorescence quenching by a brominated phospholipid. *Biochemistry* 21: 4144-4151, 1982.
- Ebashi S, Kodama A, Ebashi F.** Troponin I: preparation and physiological function. *J Biochem.* 64: 465-477, 1968.
- Edde B, Rossier J, Le Caer J, Desbruyeres E, Gros F, Denoulet P.** Posttranslational glutamylation of alpha-tubulin. *Science* 247: 83-85, 1990.
- Eipper B:** Rat brain microtubule protein: purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 2283-2287, 1972.
- Enyedi A, Flura M, Sarkadi B, Gardos G, Carafoli E.** The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently, *J. Biol. Chem.* 262: 6425-6430, 1987.
- Fabiato A, Fabiato F.** Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J Physiol.* 75: 463-505, 1979.
- Ferrandi M, Salardi S, Tripodi G, Barassi P, Rivera R, Manunta P.** Evidence for an interaction between adducin and  $Na^{+},K^{+}$ -ATPase: relation to genetic hypertension. *Am J Physiol.* 277: 1338-1349, 1999.
- Fujimoto T.** Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J. Cell Biol.* 120: 1147-1157, 1993.



- Gancedo C, Serrano R.** *Energy yielding metabolism in yeast. The yeast, Academic Press, Inc. NY. ISBN vol. 3: 205, 1989.*
- Garrahan, P, Rega, A.** *Plasma membrana calcium pump. Intracellular Calcium Regulation (Broker, F. ed.) Alan, R. Liss. Nueva York. pp: 271-303, 1990.*
- Gopinath R, Vicenzi F.** *(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)-ATPase activity of sickle cell membranes: decreased activation by red blood cell cytoplasmic activator. Am J. Hematol. 7: 303-312, 1979.*
- Graceffa P, Dominguez R.** *Crystal Structure of Monomeric Actin in the ATP State: structural basis of nucleotide- dependent actin dynamics. J Biol Chem. 278: 34172-34180, 2003.*
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien R.** *A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem. 260: 3440-3450, 1985.*
- Hallak M, Rodriguez J, Barra H, Caputto R.** *Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. FEBS Lett. 73: 147-150, 1977.*
- Hammond J, Cai D, Verhey KJ.** *Tubulin modifications and their cellular functions. Curr Opin Cell Biol. 20: 71-76, 2008.*
- Hofer A.** *Another dimension to calcium signaling: a look at extracellular calcium. J. Cell. Sci. 118: 855-862, 2005.*
- Horn J, Janicki P, Franks J.** *Diminished brain synaptic plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity in spontaneously hypertensive rats: association with reduced anesthetic requirements. Life Sci. 56: 427-432, 1995.*
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang X, Yao T.** *HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. Nature 417: 455-458, 2002.*
- Hubert J, Schenk D, Skeelli H, Leffert H.** *Rat hepatic Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase: alpha-subunit isolation by immunoaffinity chromatography and structural analysis by peptide mapping. Biochem. 5: 4156-4163, 1986.*
- Hyanms J, Lloyd C.** *Microtubules, Wiley-Liss 1993.*

- Ikegami K, Setou M.** Unique post-translational modifications in specialized microtubule architecture. *Cell Struct Funct.* 35: 15-22, 2010.
- James P, Pruschy M, Vorherr T, Penniston J, Carafoli E.** Primary structure of the cAMP-dependent phosphorylation site of the plasma membrane calcium pump. *Biochem.* 28: 4253-4258, 1989b.
- James P, Vorherr T, Krebs J, Morelli A, Castello G, McCormick D, Penniston J, De Flora A, Carafoli E.** Modulation of erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by selective calpain cleavage of the calmodulin-binding domain. *J Biol Chem.* 264: 8289-8296, 1989a.
- Jarrett H, Penniston J.** Partial purification of the  $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$  ATPase activator from human erythrocytes: its similarity to the activator of 3,5 -cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res. Commun* 77: 1210-1216, 1977.
- Jiang L, Fernandes D, Mehta N, Bean J, Michaelis M, Zaidi A.** Partitioning of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase into lipid rafts in primary neurons: effects of cholesterol depletion. *J Neurochem.* 102: 378-388, 2007.
- Kirschner M, Mitchison T.** Microtubule dynamics. *Nature* 324: 621, 1986.
- L'Hernault S, Rosenbaum L.** Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochem.* 24: 473-478, 1985.
- Laemmli U.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- LeDizet M, Piperno G.** Cytoplasmatic microtubules containing acetylated alpha-tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*: spatial arrangement and properties. *J. Cell Biol.* 103: 13-22, 1986.
- Lee W, Roberts-Thomson S, Holman N, May F, Lehrbach G, Monteith G.** Expression of plasma membrane calcium pump isoform mRNAs in breast cancer cell lines *Cellular Signalling* 14: 1015-1022, 2002.
- Lemas M, Yu H, Takeyasu K, Kone B, Fambrough D.** Assembly of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase alpha-subunit isoforms with  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase beta-subunit isoforms and  $\text{H}^+, \text{K}^+$ -ATPase beta-subunit. *J Biol Chem.* 269: 18651-18655, 1994.

- Levilliers N, Fleury A, Hill A.** Monoclonal and polyclonal antibodies detect a new type of post-translational modification of axonemal tubulin. *J Cell Sci.* 108: 3013-3028, 1995.
- Liffourrena A, Massimelli M, Forrellad M, Lisa A, Domenech C, Lucchesi G.** Tetradecyltrimethylammonium inhibits *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C induced by cholina. *Curr Microbiol.* 55: 530-536, 2007.
- Magendantz M, Solomon F.** Analyzing the components of microtubules: antibodies against chartins, associated proteins from cultured cells. *PNAS USA* 82: 6581-6585, 1985.
- Mariani M, Maretzki D, Lutz H.** A tightly membrane-associated subpopulation of spectrin is <sup>3</sup>H-palmitoylated. *J Biol Chem.* 268: 12996-3001, 1993.
- Michaelis E, Michaelis M, Chang H, Kitos T.** High affinity Ca<sup>2+</sup> stimulated Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase in rat brain synaptosomes, synaptic membranes, and microsomes. *J. Biol Chem.* 258: 6101-6108, 1983.
- Missiaen L, Raeymaekers L, Wuytack F, Vrolix M, De Smedt H, Casteels R.** Phospholipid-protein interactions of the plasma-membrane Ca<sup>2+</sup> transporting ATPase. Evidence for a tissue-dependent functional difference. *Biochem J.* 263: 687-694, 1989.
- Monesterolo N, Santander V, Campetelli A, Arce C, Barra H, Casale C.** Activation of PMCA by calmodulin or ethanol in plasma membrane vesicles from rat brain involves dissociation of the acetylated tubulin/PMCA complex. *FEBS Journal* 275: 3567-3579, 2008.
- Niggli V, Adunyah E, Carafoli E.** Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca<sup>2+</sup> ATPase. *J Biol Chem.* 256: 8588-8592, 1981.
- Niggli V, Penniston J, Carafoli E.** Purification of the (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J Biol Chem.* 254: 9955-9958, 1979.
- Nogales E, Wolf S, Downing K.** Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391: 199-203, 1998.

- North B, Marshall B, Borra M, Denu J, Verdin E.** *The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase.* *Mol Cell.* 11: 437-444, 2003.
- Nuñez-Fernandez M, Beltramo D, Alonso A, Barra H.** *Conversion of hydrophilic tubulin into a hydrophobic compound. Evidence for the involvement of membrane proteins.* *Mol Cell Biochem.* 170: 91-98, 1997.
- Oakley B.**  *$\gamma$ -Tubulin.* *Curr Top Dev Biol.* 49: 27-54, 2000.
- Oakley C, Oakley B.** *Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of Aspergillus nidulans.* *Nature* 338: 662-664, 1989.
- Ostroff R, Vasil A, Vasil M.** *Molecular Comparison of a Nonhemolytic and a Hemolytic Phospholipase C from Pseudomonas aeruginosa.* *J of Bacteriology* 172: 5915-5923, 1990.
- Pang Y, Zhu H, Wu P, Chen J.** *The characterization of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains.* *FEBS Letters* 579: 2397-2403, 2005.
- Pászty K, Verma A, Padányi R, Filoteo A, Penniston J, Enyedi A.** *Plasma membrane Ca<sup>2+</sup>ATPase isoform 4b is cleaved and activated by caspase-3 during the early phase of apoptosis.* *Biol Chem.* 277: 6822-6829, 2002.
- Pellerin L, Magistretti P.** *Glutamate uptake stimulates Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain.* *J Neurochem.* 69: 2132-2137, 1997.
- Pérez-Gordones M, Lugo M, Winkler M, Cervino V, Benaim G.** *Diacylglycerol regulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes by direct interaction.* *Arch Biochem Biophys.* 489: 55-61, 2009.
- Piperno G, Fuller M.** *Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognizes the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms.* *J Cell Biol.* 101: 2085-2094, 1985.
- Popova J, Garrison J, Rhee S, Rasenick M.** *Tubulin, Gq, and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Interact to Regulate Phospholipase C $\beta$ 1 Signaling.* *J Biol Chem.* 272: 6760-6765, 1997.

- Popova J, Greene A, Wang J, Rasenick M.** Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate modifies tubulin participation in phospholipase  $C_{\beta 1}$  signaling. *J. Neurosci.* 22: 1668-1678, 2002.
- Redeker V, Levilliers N, Schmitter J, Le Caer J, Rossier J, Adoutte A, Bre M.** Polyglucylation of tubulin: a posttranslational modification in axonemal microtubules. *Science* 266: 1688-1691, 1994.
- Regnard C, Audebert S, Desbruyeres, Denoulet P, Edde B.** Tubulin polyglutamylase: partial purification and enzymatic properties. *Biochem.* 37: 8395-8404, 1998.
- Reisler E.** Actin molecular structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 5: 41-47, 1993.
- Salamino F, Sparatore B, Melloni E, Michetti M, Viotti P, Pontremoli S, Carafoli E.** The plasma membrane calcium pump is the preferred calpain substrate within the erythrocyte. *Cell Calcium* 15: 28-35, 1994.
- Salvador J, Mata A.** Purification of the synaptosomal plasma membrane ( $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$ ) ATPase from pig brain. *Biochem. J.* 315: 183-187, 1996.
- Santander V, Bisig C, Purro S, Casale C, Arce C, Barra H.** Tubulin must be acetylated in order to form a complex with membrane  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase and to inhibit its enzyme activity. *Mol Cell Biochem.* 291: 167-174, 2006.
- Schatzmann H.** ATP-dependent  $Ca^{2+}$ -extrusion from human red cells. *Experientia* 22: 364-365, 1966.
- Sepúlveda M, Berrocal-Carrillo M, Gasset M, Mata A.** The Plasma Membrane  $Ca^{2+}$  ATPase Isoform 4 Is Localized in Lipid Rafts of Cerebellum Synaptic Plasma Membranes. *J Biol Chem.* 281: 447-453, 2006.
- Sepúlveda M, Mata A.** Localization of intracellular and plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase in the cerebellum. *The Cerebellum* 4: 82-89, 2005.
- Sepúlveda M, Mata A.** The interaction of ethanol with reconstituted synaptosomal plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1665: 75-80, 2004.
- Shen Q, Zheng X, McNutt M, Guang L, Sun Y, Wang J, Gong Y, Hou L, Zhang B.** NAT10, a nucleolar protein, localizes to the midbody and regulates cytokinesis and acetylation of microtubules. *Exp Cell Res.* 315: 1653-1667, 2009.
- Slomiany A, Yano S, Slomiany B, Glass G.** Lipid composition of the gastric mucous barrier in the rat. *J Biol Chem.* 253: 3785-3791, 1978.

- Smith M.** *A regional survey of myelin development: some compositional and metabolic aspects.* *J Lipid Res.* 5: 541-551, 1973.
- Solomon F.** *Organizing microtubules in the cytoplasm.* *Cell* 22: 331-332, 1980
- Stauffer T, Guerini D, Carafoli E.** *Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump. A study using specific antibodies.* *J. Biol. Chem.* 270: 12184-12190, 1995.
- Strehler E, Zacharias D.** *Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps.* *Physiological Reviews* 81: 21-50, 2001.
- Suri C, Fung B, Tischler A, Chikaraishi D.** *Catecholaminergic cell lines from the brain and adrenal glands of tyrosine hydroxylase-SV40 T antigen transgenic mice.* *J Neurosci.* 13: 1280-129, 1993.
- Sweadner K.** *Isozymes of the  $Na^+,K^+$ -ATPase.* *Biochem Biophys Acta* 988: 185-220, 1989.
- Tang D, Deanb W, Borchmana D, Paterson C.** *The influence of membrane lipid structure on plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase activity.* *Cell Calcium* 39: 209-216, 2006.
- Tezanos Pinto F, Adamo H.** *Deletions in the Acidic Lipid-binding Region of the Plasma Membrane  $Ca^{2+}$  Pump A Mutant With High Affinity For  $Ca^{2+}$  Resembling The Acidic Lipid-Activated Enzyme.* *J Biol Chem.* 277: 12784-12789, 2002.
- Tilney L, Bryan J, Bush D, Fujiwara K, Mooseker M, Murphy D, Snyder D.** *Microtubules: evidence for 13 protofilaments.* *J Cell Biol.* 59: 267-275, 1973.
- Verbist J, Gadella T, Raeymaekers L, Wuytack F, Wirtz K, Casteels R.** *Phosphoinositide-protein interactions of the plasma-membrane  $Ca^{2+}$ -transport ATPase as revealed by fluorescence energy transfer.* *Biochim. Biophys. Acta* 1063: 1-6, 1991.
- Vinh J, Langridge J, Bre M, Levilliers N, Redeker V, Loyaux D, Rossier J.** *Structural characterization by tandem mass spectrometry of the posttranslational polyglycylation of tubulin.* *Biochem.* 38: 3133-3139, 1999.
- Westermann S, Weber K.** *Post-translational modifications regulate microtubule function.* *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4: 938-947, 2003.
- Wolff J.** *Plasma membrane tubulin.* *Biochim Biophys Acta* 1788: 1415-1433, 2009.

**-Zampar G, Chesta M, Carbajal A, Chanaday N, Díaz N, Casale C, Arce C.** *Acetylated tubulin associates with the fifth cytoplasmic domain of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>ATPase: possible anchorage site of microtubules to the plasma membrane. Biochem J. 422: 129-137, 2009.*

**-Zurini M, Krebs J, Penniston, J, Carafoli E.** *Controlled proteolysis of the purified Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the erythrocyte membrane. A correlation between the structure and the function of the enzyme. J Biol Chem. 259: 618-627, 1984.*

**-Zvaritch E, James P, Vorherr T, Falchetto R, Modyanov N, Carafoli E.** *Mapping of functional domains in the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump using trypsin proteolysis, Biochem. 29: 8070-8076, 1990.*

**-Zylinska L, Guerini D, Gromadzinska E, Lachowicz L.** *Protein kinases A and C phosphorylate purified Ca<sup>2+</sup>-ATPase from rat cortex, cerebellum and hippocampus. Biochim Biophys Acta 1448: 99-108, 1998.*



UNRC  
Biblioteca Central



71179

71179