

Los estados de hidratación de ATPasa y de Mg^{2+} median el acoplamiento del estímulo de noradrenalina al adenilato ciclasa y permiten modelar la función de memoria

Dr. Alfred Bennun

Full Professor Graduate School, Rutgers University

Abstract

Titulación con glicerol desplazó 16 H_2O de la esfera de hidratación de ATPasa, con inactivación. Efecto que correlaciona la dinámica de los enlaces de $-H$ con los estados de transición/hidratación que activan la ATPasa. Mg^{2+} como quelante pierde su esfera de hidratación, por lo que la enzima al hidrolizar el $MgATP^{4-}$ libera Mg^{2+} , que tiende a completar su estado de hidratación. Este Mg^{2+} tiene el potencial de sustraer H_2O del estado de hidratación del $[(6H_2O).Na^+]$. El $[(3H_2O).Na^+]$ tiene un tamaño menor que le permite acceder a su canal en la bomba de Na^+ y sustraer H_2O del $[(6H_2O).K^+]$, ciclando la translocación hídrica-iónica. El Mg^{2+} también es requerido para acoplamiento y estímulo de la Noradrenalina (NA)-dependiente adenilato ciclasa (AC). Ésta produce cAMP que activa el *response element binding proteins* (REBP), el cual, participa en la transcripción de DNA. Las proteínas resultantes actúan en la función de memoria a largo plazo, cuando son incorporadas en la membrana. Las mismas, en respuesta al impulso nervioso pueden cambiar sus estados hídricos y dipolares, y por dinámica de las uniones de $-H$ manifiestan discretos estados de vibración molecular. Por encima de la temperatura éstos pueden durar entre 200 a 2000 ns y ser evaluados como frecuencia. La mecánica cuántica los describe como onda, fonón. Esta sería encriptable en la electrogénesis de membrana-neuronal.

Métodos

Purificación de Ca^{2+} -dependiente ATPasa-latente: se purificó con DEAE-Sephadex A-50 y diluida en 2mg/ml en 20mM ATP en 10% v/v glicerol se calentó en un baño de agua a 65° por 3min. La solución de ATPasa activada por calor fue diluida y ensayada [1].

Ensayo de actividad: 3.7 μ g en 1.25ml de solución de 50mM concentración final 50mM tricina-NaOH, 8mM ATP- $CaCl_2$, pH final 8 y glicerol sustituyendo H_2O fueron incubadas a 37°C por 10min, blancos de tiempo cero por c/ensayo (fig.1) [1].

Preparación de AC: EDTA suspensión de partículas AC-membrana fueron obtenidas de la corteza cerebral de ratas [2].

Ensayo de actividad: 100 μ g de proteína de la EDTA-AC-membrana en 40mM-tricina/Tris-buffer, pH=7.4, 6.67mM-cafeína y 1mM-ATP (Sigma: purificada del músculo del caballo que contiene GTP), en 0.5ml en curva de saturación con $[Mg^{2+}]$ incubadas a 37° por 1h (fig.2) [2].

Introducción

Las diferentes estabilidades energéticas del enlace de $-H$ se pueden ciclar en función de los estados de hidratación de iones. Los cosmotrópicos tienden a sustraer agua de las esferas de hidratación de las proteínas, para completar la suya. A este grupo pertenecen con geometría hexagonal en la primera capa hídrica el $[(6H_2O).Na^+]$ y con geometría octaédrica en la primera y segunda capas hídricas $(12H_2O).[(6H_2O).Mg^{2+}]$. Mg^{2+} vs Ca^{2+} pueden competir desplazándose como ligantes entre dos proteínas, ejemplo: miosina vs actina [3].

Resultados

Aplicando la ecuación de Hill: $\log(v/(V_{max} - v)) = n \log[L] - \log[K_d]$, en la que $L=49.2/55.5$, $K_d=13.75$, permite obtener $n=16$, el N^o de sitios ocupados por H_2O en el sitio activo de la ATPasa.

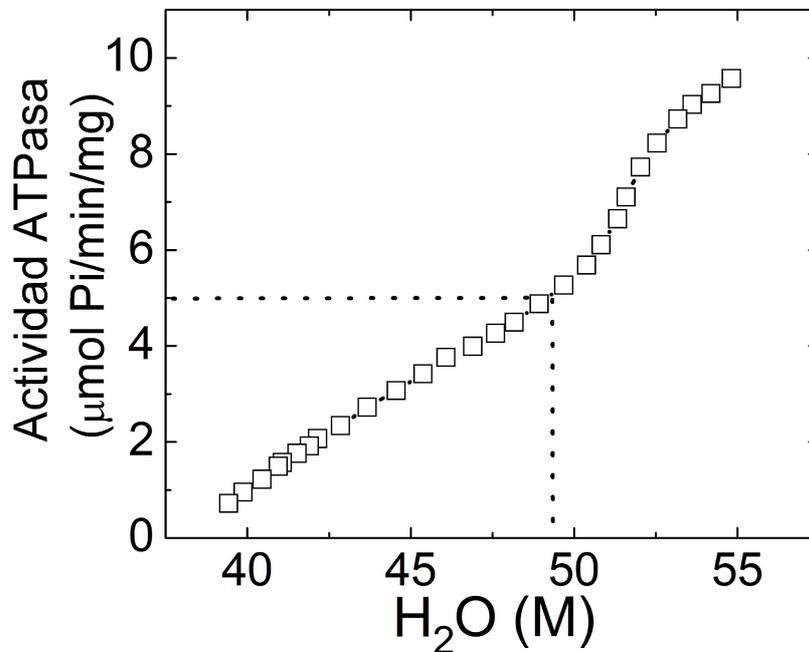


Fig. 1. La sustracción de H_2O de la esfera hídrica del ATPasa inactiva su sitio catalítico. $[H_2O]=1000/18=55.5$ M, $S_{50}(H_2O)=49.2$ M.

El grupo de las ATPasas tiene dos mecanismos de acción, uno termodinámico: $MgATP \rightarrow ADP + Pi + \Delta G = -9kcal$, y otro en el que la hidrólisis de $MgATP$, $K_d=0.1mM$, produce un quelante más débil $MgADP$ y libera $[Mg^{2+}]$, modulante de la interacción entre proteínas. En este trabajo, dichos mecanismos de acción de CF_1 se consideraron como aplicables a la ATPasa de la bomba de Na^+ .

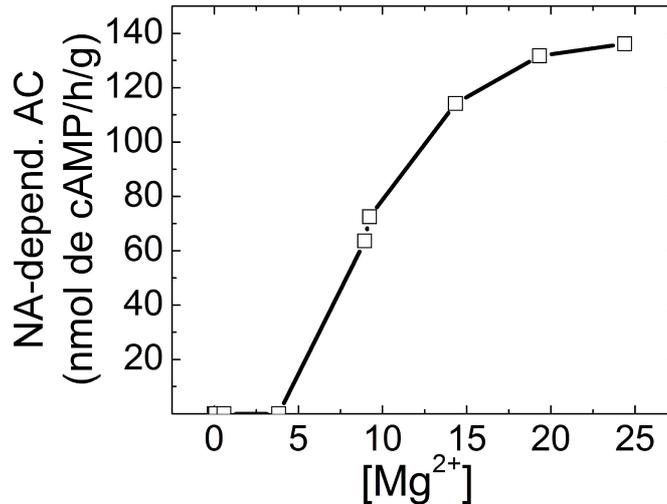


Fig.2. Efecto de [Mg²⁺] libre en exceso de 5mM MgATP. Se graficó la diferencia entre curvas de saturación en presencia de 1mM-adrenalina (NA) y en su ausencia (basal).

La fig.2 muestra la absoluta dependencia del Mg²⁺ para NA poder estimular AC-membrana. La actividad basal muestra cooperatividad negativa para el sustrato MgATP que se vuelve positiva en función de Mg²⁺.

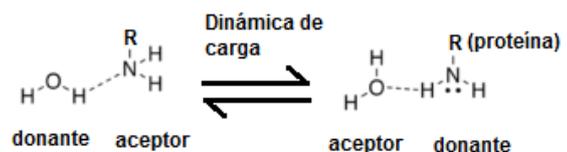
Mg²⁺ es requerido en no menos de dos sitios, uno para acoplar el receptor de NA a la AC-membrana y otro como modulador de la actividad basal [2] [4].

El (12H₂O).[(6H₂O).Mg²⁺] al actuar por unión bi-, tetra- o hexavalente coordinativa, como quelante de una proteína, pierde la mayor parte de su esfera de hidratación. Al romperse una o más de sus uniones coordinativas, puede restar H₂O del [(6H₂O).Na⁺].

El ΔG en la reacción de ATPasa puede generar un estado de transición endergónico por formación de enlaces de -H como aceptor de H₂O del [(6H₂O).Na⁺] genera [(3H₂O).Na⁺]. Este acoplamiento termodinámico del enlace de -H permite las propiedades electrogénicas de la membrana y la operatividad de la bomba de Na⁺/K⁺ que genera el potencial de membrana.

Discusión

En la relación agua-agua, la ruptura de O-H...:O + 5.0 kcal/mol, la de HO-H...:OH³⁺ + 4.3 kcal/mol, etc. La química de coordinación permite una reactividad del enlace de -H con dinámica de carga como se ilustra para un grupo amino terminal de una proteína.



Un trasfondo de los movimientos moleculares aleatorios de alrededor de 0.7 Kcal/mol a la temperatura corporal, no impide la dominancia de los cambios termodinámicos

envueltos en la ruptura de los enlaces de –H confiriendo un estado vibratorio a las estructuras hídras y cuaternarias de proteínas [3]. Estos estados son oscilaciones rápidas disipables en 200-2000ns, pero más perdurables en la relación membrana-proteína. Mantienen una discreta conectividad vibracional y resonante con las proteínas circundantes. A estos armónicos la mecánica cuántica los describe como función de onda con energía proporcional a la ruptura del enlace de –H y denominados fonón.

Conclusiones

Bio-sistemas que se caracterizan por su actividad de ATPasa muestran una dinámica de acoplamiento sincrónico de estados transicionales cíclicos [3]. La termodinámica de sistema abierto permite una cinética de no-equilibrio, que depende en muchas instancias de los enlaces de –H para operar cinética vectorial con energía de activación a temperatura celular [3] [5].

Referencias

- [1] Bennun, A. and Racker, The Journal of Biological Chemistry, **244**, 1325-1331, (1969)
- [2] Brydon-Golz, S., Ohanian, H. and Bennun, A., The Biochemical Journal **166**, 473-483, (1977)
- [3] Bennun, A., Nature New Biology, **233**, 5-8, (1971)
- [4] Bennun, A., Biosystems, **100**, 87-93 (2010)
- [5] Bennun, A. “Molecular mechanisms integrating adenylyl cyclase responsiveness to metabolic control on long-term emotional memory and associated disorders”, Long-Term Memory: Mechanisms, Types and Disorders, **C1**, 1– 44 Nova Science Publishers (Julio 2012)

Dr. Alfredo Bennun.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bennun%20A>.

<http://www.biomedexperts.com>

Godoy Cruz 3046, Torre 2, 8° Polo. CP: 1425.

Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

alfr9@hotmail.com