

# 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  $Ca^+$ -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 $\mu$ 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].

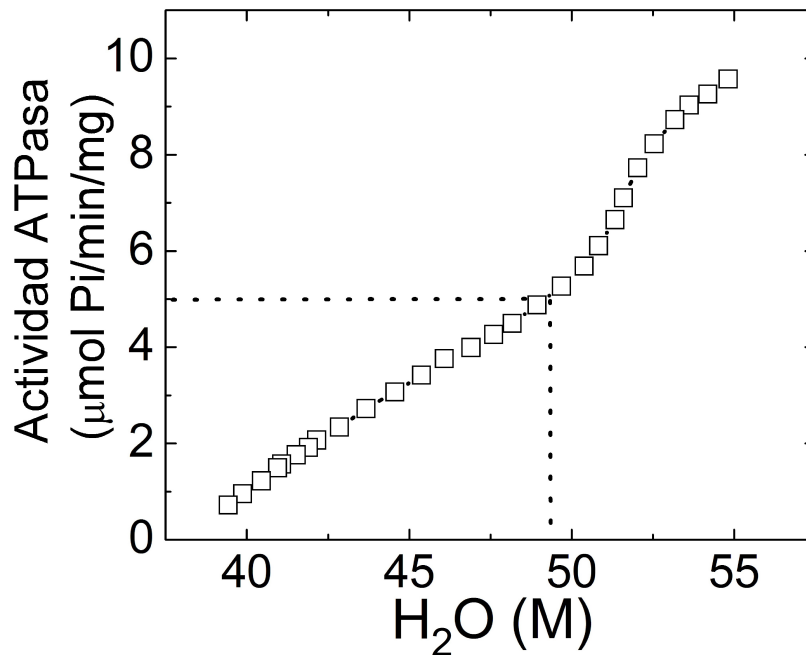
**Ensayo de actividad:** 100 $\mu$ g de proteína de la EDTA-AC-membrana en 40mM-tricina/Tris-buffer, pH=7.4, 6.67mM-cafeína y 1mM-ATP (Sigma: purificada del músculo del caballo que contiene GTP), en 0.5ml en curva de saturación con  $[Mg^{2+}]$  incubadas a 37° por 1h (fig.2) [2].

## 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].

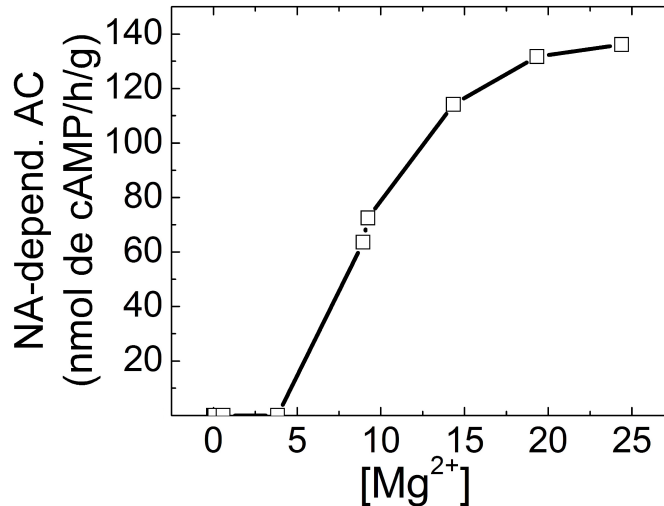
## Resultados

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 [Mg<sup>2+</sup>] 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 Mg<sup>2+</sup> para NA poder estimular AC-membrana. La actividad basal muestra cooperatividad negativa para el sustrato MgATP que se vuelve positiva en función de Mg<sup>2+</sup>.

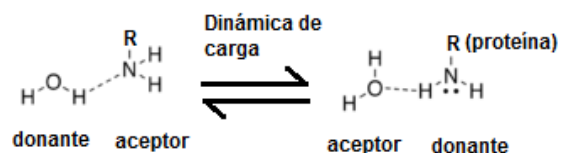
Mg<sup>2+</sup> es requerido en no menos de dos sitios, uno para acoplar el receptor de NA a la AC-membrana y otro como modulador de la actividad basal [2] [4].

El (12H<sub>2</sub>O).[ (6H<sub>2</sub>O).Mg<sup>2+</sup> ] 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 H<sub>2</sub>O del [(6H<sub>2</sub>O).Na<sup>+</sup>].

El ΔG en la reacción de ATPasa puede generar un estado de transición endergónico por formación de enlaces de -H como aceptor de H<sub>2</sub>O del [(6H<sub>2</sub>O).Na<sup>+</sup>] genera [(3H<sub>2</sub>O).Na<sup>+</sup>]. Este acoplamiento termodinámico del enlace de -H permite las propiedades electrogénicas de la membrana y la operatividad de la bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> 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...:OH<sup>3+</sup> + 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](mailto:alfr9@hotmail.com)*