



**Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ciencias
Instituto de Física**

***Caracterización termodinámica del dominio-N de la H⁺-ATPasa
de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae****

Tesis para obtener el grado de:
Maestra en Ciencias Interdisciplinarias

Presenta:
Lic. Claudia Leticia Gómez Flores

Director:
Dr. José G. Sampedro Pérez

Comité evaluador:
Dra. Monica Raquel Calera Medina
Dr. Said Eduardo Aranda Espinoza
Dr. Carlos Espinoza Soto

Tutor académico:
Dr. José Luis Arauz Lara

Créditos institucionales

El presente proyecto de tesis fue realizado en el Laboratorio de Biofísica de proteínas del Instituto de Física “Manuel Sandoval Vallarta” de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo la asesoría del Dr. José G. Sampedro Pérez, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de Proyecto 0156497 y No. de beca 466820).

Resumen

La H⁺-ATPasa de levadura es la enzima encargada de bombear protones a través de la membrana plasmática celular regulando el pH intracelular y suministrando energía para distintos procesos esenciales acoplados; por lo tanto, su correcta expresión y funcionamiento es vital. El dominio-N forma parte de la porción citoplasmica de la estructura y posee motivos conservados. Es la encargada de unir el ATP a la enzima y así dar inicio al proceso de bombeo de protones. En este proyecto se diseñó *in silico* y se expresó el dominio-N 100% homólogo de la H⁺-ATPasa codificada por el gen *PMA1* de *Saccharomyces cerevisiae* de forma recombinante en células de *Escherichia coli*.

La H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* contiene 15 residuos triptófano de los cuales solamente uno se encuentra presente en el dominio-N, el cual se usa como reportero de fluorescencia de cambios estructurales. Con experimentos en su estado nativo y curso de tiempo se evaluó la posición del residuo sobre la estructura y su distancia al sitio de unión a nucleótidos, la afinidad a nucleótidos e iones presentes en el citoplasma, y además la estabilidad termodinámica. De igual forma se realizaron experimentos donde se observa la evolución de la estructura secundaria mediante la obtención de su espectro de dicroísmo circular en distintas condiciones. Métodos de simulación computacional como docking y dinámica molecular complementaron los resultados experimentales y así se obtuvo una descripción más detallada de los fenómenos observados.

Siendo el dominio-N de la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* el más pequeño de su tipo y conteniendo los elementos mínimos estructurales para poder ser caracterizada; se espera que los resultados puedan ser extrapolados y así generar un modelo de unión a nucleótidos para P-ATPasas más complejas. De igual forma se busca contribuir a un mejor entendimiento sobre la patogénesis de distintas enfermedades involucradas con las P-ATPasas ya que se han identificado al menos 36 tipos en humanos y diversos síndromes se les han sido asociados. Además, las P-ATPasas se han identificado como un blanco para el desarrollo de fármacos para el tratamiento del cáncer y, enfermedades por hongos (micosis) y protozoarios (malaria).

Índice general

Créditos institucionales	ii
Resumen	iii
Índice general	iv
Índice de ecuaciones, figuras y tablas	v
Abreviaturas	viii
Introducción	1
Las ATPasas	1
Las P-ATPasas	2
La H ⁺ -ATPasa de membrana plasmática	6
Antecedentes	8
Caracterización estructural y funcional del dominio-N de la H ⁺ -ATPasa de membrana plasmática de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
Desplegamiento de proteínas	9
Unión de iones monoatómicos	12
Justificación	15
Hipótesis	16
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
Metodología	18
Construcción del plásmido	18
Sobreexpresión y purificación del dominio-N	18
Unión de ligandos al dominio-N	19
Posición del sitio de unión a calcio	20
Desplegamiento del dominio-N	21
Cambios en la estructura secundaria	22
Marcaje mediante FITC	23
Estequiométria de unión	23
Docking molecular	24
Dinámica molecular	24
Resultados	26
Purificación del dominio-N	26
Unión de nucleótidos	28
Unión de potasio	30
Unión de calcio	32
Efecto de la trehalosa sobre la unión a ATP en el dominio-N	41

Desplegamiento del Dominio-N.....	41
Marcaje con FITC	46
Estequiometria de unión	48
Conclusiones	51
Materiales.....	53
Referencias.....	54

Índice de ecuaciones, figuras y tablas

Figura 1 Estructura química del ATP.	1
Figura 2 Dominios estructurales de las P-ATPasas.	4
Figura 3 Ciclo catalítico Post-Albers de intercambio iónico en las P-ATPasas ¹⁰	5
Figura 4 Mecanismo detallado del transporte iónico en las P-ATPasas ⁷	6
Figura 5 Bombeo de H ⁺ y estructura de la H ⁺ -ATPasa.	7
Figura 6 Estructura 3D del dominio-N.....	8
Figura 7 Estructura secundaria del dominio-N.	8
Figura 8 Estructura química de la trehalosa.....	10
Figura 9 Representación de la posición de la trehalosa sobre las proteínas.....	11
Figura 10 Activación por glucosa en presencia de distintos cationes.....	12
Figura 11 Estados de transición del terbio.	13
Figura 12 Sitio de unión de Tb ³⁺ en la H ⁺ -ATPasa de <i>A. thaliana</i> ⁵²	14
Figura 13 Gel de SDS-poliacrilamida mostrando el dominio-N-HisTAG con un peso molecular de 17.28 kDa.	27
Figura 14 Unión de nucleótidos al dominio-N en su forma catiónica, aniónica y zwitteriónica.....	28
Figura 15 Modos de unión de nucleótidos al dominio-N.....	29
Figura 16 Tamaño del sitio de unión de nucleótidos.	30
Figura 17 Unión del K ⁺ sobre el dominio-N.	31
Figura 18 Tamaño del sitio de unión a nucleótidos posterior a la unión de K ⁺	31
Figura 19 Unión del ATP en presencia de K ⁺	32
Figura 20 Apagamiento de fluorescencia del dominio-N por unión al Ca ²⁺	33

Figura 21 Espectros de dicroísmo circular del dominio-N por la adición de Ca^{2+}	33
Figura 22 Unión del Ca^{2+} sobre el dominio-N.	34
Figura 23 Tamaño del sitio de unión a nucleótidos posterior a la unión de Ca^{2+}	34
Figura 24 Espectros normalizados de excitación del Tb^{3+} y de emisión del dominio-N...35	
Figura 25 Transferencia de energía del W524 al Tb^{3+}	35
Figura 26 Unión del ATP en presencia de Ca^{2+}	37
Figura 27 Unión de nucleótidos al dominio-N en presencia de iones Ca^{2+}	38
Figura 28 Espectros de dicroísmo circular del dominio-N por la adición de ATP en presencia de Ca^{2+}	39
Figura 29 Fracción de la estructura secundaria del dominio-N por unión de ATP y Ca^{2+} ..	40
Figura 30 Unión de ATP al dominio-N a pH 8 en presencia de 500 mM de trehalosa.	41
Figura 31 Espectros promedio de la desnaturalización del dominio-N por GndHCl.	42
Figura 32 Curvas de desnaturalización química del dominio-N.....	42
Figura 33 ΔG en función de la concentración de GndHCl.....	43
Figura 34 Curvas de desnaturalización térmica del dominio-N en presencia y ausencia de trehalosa	43
Figura 35 Gráfico de Van't Hoff de la desnaturalización térmica del dominio-N.....	44
Figura 36 Espectros de dicroísmo circular en presencia y ausencia de trehalosa.....	45
Figura 37 Fracción de la estructura secundaria del dominio-N por aumento de temperatura y trehalosa	45
Figura 38 Unión del FITC sobre el dominio-N.....	46
Figura 39 Marcaje del dominio-N por FITC.....	47
Figura 40 Cromatograma del Dominio-N marcado con FITC.....	48
Figura 41 Fluorescencia del ANS por la unión al dominio-N.	49
Figura 42 Espectro de emisión del FITC tras la adición gradual de ANS excitando a 370 nm.	
.....	50

Tabla 1 Eventos en la vida de <i>S. cerevisiae</i> a distintas temperaturas ^{34,39-41}	11
Tabla 2 Radios iónicos según el número de coordinación del Calcio y el Terbio ^{46,47}	13
Tabla 3 Concentraciones iónicas en el citoplasma de <i>S. cerevisiae</i> ⁷⁹	25
Tabla 4 Constantes de afinidad de la unión a nucleótidos a distintos pH.....	28
Tabla 5 Cambio en la fracción de estructura secundaria del dominio-N por la adición de ATP y Ca ²⁺	39
Tabla 6 Cambio en la fracción de estructura secundaria del dominio-N en presencia y ausencia de trehalosa.....	45
Ecuación 1 Reacción de hidrólisis del ATP.....	1
Ecuación 2 Proceso de desnaturización en dos estados.....	10
Ecuación 3 Proceso de desnaturización en tres estados.....	10
Ecuación 4 Ecuación de Lambert-Beer.....	19
Ecuación 5 Unión a ligandos analizado por fluorescencia.....	20
Ecuación 6 Ecuación de la eficiencia de Föster.....	20
Ecuación 7 Ecuación de la distancia de Föster.....	21
Ecuación 8 Ajuste de señal por desnaturización química.....	21
Ecuación 9 Ecuación de Gibbs-Helmholtz.....	22

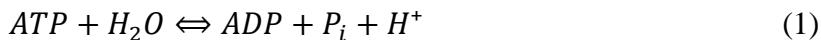
Abreviaturas

ADP	Adenosín Difosfato	K^+	Ión potasio
AMPPCP	Adenilmetilendifosfato	K_d	Constante de Disociación
ANS	8-anilinonaftaleno-1-ácido sulfónico	kDa	Kilo Dalton
ATP	Adenosín Trifosfato	K_2HPO_4	Fosfato monoácido de potasio
Ca^{2+}	Ión calcio	KH_2PO_4	Fosfato de potasio monobásico
CD	Dicroísmo circular	LB	Luria Bertani
Cl	Cloro	M	Concentración Molar
DC	Dicroísmo circular	Mg^{2+}	Ión magnesio
GndHCl	Hidrocloruro de guanidino	Na^+	Ión sodio
EGTA	Etilenbis (oxonítrilo) tetraacetato	OD	Densidad Óptica
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	pH	Potencial de Hidrógeno
FRET	Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia	PAGE	Electroforesis de gel de poliacrilamida
g	Fuerza G	Pi	Fosfato inorgánico
H^+	Protón	PMSF	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo.
H_2O	Agua	Rb^+	Ión rubidio
HC	Hidrocloruro	SDS	Dodecil Sulfato de Sodio.
Ho^{3+}	Ión holmio	Tb^{3+}	Ión terbio
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido	Tris	Tris (hidroximetil)-aminometano

Introducción

Las ATPasas

Las ATPasas son enzimas presentes en todos los organismos vivos que funcionan a base de la hidrólisis de ATP (Ec. 1), un proceso exergónico altamente energético cuya energía asociada es $\Delta G^\circ \sim -7.3$ kcal/mol¹.



Esta energía es liberada por la ruptura de las uniones fosfoanhídridas entre los tres grupos fosfatos del ATP (Figura 1). Cada uno de estos fosfatos tiene cargas negativas y la proximidad entre ellos desestabiliza a la molécula por el alto grado de repulsión electrostática. El ADP al solo tener dos fosfatos, presenta menos repulsión electrostática y es una molécula más estable, pero con menor energía; de la misma forma el Pi es aislado de las otras cargas negativas y se estabiliza con las moléculas de agua del medio. Los productos ADP y Pi tienen menor energía que el ATP, ya que la hidrólisis libera esta diferencia de energía¹.

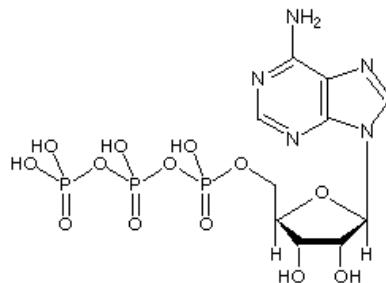


Figura 1 Estructura química del ATP.

Las ATPasas comprenden cinco familias de transportadores acoplados a la hidrólisis del ATP: V, F, A, E y P. Estas familias se distinguen por su función, localización y organismos en los cuales se expresan².

En células eucariotas, la acidificación de los orgánulos intracelulares es crucial para la realización de un gran número de procesos celulares. Esta acidificación es mediada por las V-ATPasas, transportadores rotativos que se encuentran sobre la membrana de endosomas, lisosomas y vesículas de secreción. Las V-ATPasas utilizan la energía liberada por la

hidrólisis del ATP para activar el transporte de protones desde el citosol hacia los compartimientos intracelulares^{3,4}.

La F-ATPasa y la A-ATPasa son sintasas rotativas de ATP. La F-ATPasa se encuentra en el complejo V del proceso de fosforilación oxidativa en células eucariotas, y se confina a organelos semiautónomos (mitocondrias y cloroplastos). La A-ATPasa toma su nombre de arquea, ya que es encontrada únicamente en miembros de este reino, tiene una función y estructura análoga a la F-ATPasa. La síntesis de ATP se genera a partir de un gradiente de H^+ y de forma reversa se puede crear un gradiente de H^+ a partir de la hidrólisis de ATP¹.

Las P-ATPAsas son trasportadores transmembranales de acceso alternado que funcionan a partir de la energía libre de Gibbs mediante el ciclo de Post Albers, un mecanismo de dos fases que involucra la hidrólisis de ATP en el cual se asocia a cada uno de sus estados el transporte de algún ión hacia el citosol y al espacio extracelular, logrando un óptimo gradiente de concentración en la célula^{5,6}. Estas se expresan en todos los reinos, sin embargo se tiene registro de una mayor presencia de P-ATPAsas en células eucariotas⁷.

Las E-ATPAsas, o ecto-ATPAsas se encuentran sobre la membrana plasmática en células eucariotas e hidrolizan ATP y/o ADP en presencia de Ca^{2+} o Mg^{2+} . Tienen un rol importante en diversos procesos celulares como la modulación de actividad neural, la prevención de trombosis intravascular y la regulación de la respuesta inmune⁸.

Las P-ATPAsas

Las P-ATPAsas son una gran familia de bombas iónicas y lipídicas encargadas de mantener la homeostasis celular, estas tienen como rasgo distintivo la formación de un estado intermedio fosforilado durante su ciclo de transporte⁹. Las P-ATPAsas están subdivididas en 5 tipos (I-V) los cuales se distinguen a partir de los ligandos transportados, su regulación y motivos conservados en sus secuencias; éstas a su vez tienen una subsecuente distinción la cual se distingue de A a D^{6,10}.

Las ATPAsas tipo I son las P-ATPAsas más simples y posiblemente las más antiguas. Las tipo IA son una clase de bombas iónicas bacterianas, siendo la Kdp K⁺ la prototipo. Las tipo

IB se encuentran en todos los reinos y transportan iones de metales de transición “suaves”⁷, entre ellas se encuentra el trasportador de Cu⁺ en seres humanos, el cual su estudio ha tomado mucha importancia en los últimos años por su relevancia médica¹¹.

Las ATPasas tipo II y III son las más estudiadas, se expresan en todos los reinos y son las encargadas de crear y mantener un potencial de membrana a partir de la diferencia de concentraciones iónicas. Como ejemplo están las de transporte de protones, calcio, sodio/potasio, e hidrógeno/potasio.

Las ATPasas tipo IV también conocidas como flipasas, sólo han sido identificadas en células eucariotas y se involucran en el transporte de lípidos y el mantenimiento de la asimetría de la bicapa lipídica¹².

Las ATPasas tipo V han emergido como una clase separada en los genomas eucariotas. Se sugiere que estas evolucionaron en el punto de separación de los procariontes por un evento de compartimentalización en eucariontes, ya que estas ATPasas residen en las membranas de los sistemas internos de secreción, como el retículo sarcoplásmico y el aparato de Golgi. Los substratos y roles biológicos son aún desconocidos pero se sospecha que actúan como intercambiadores iónicos^{7,13}.

Todas las P-ATPasas tienen una estructura básica que consiste en 10 hélices transmembranales las cuales se distribuyen en un dominio de transporte que va de las hélices M1 a M6 y una porción de soporte que va de la hélice M7 a M10. Su estructura también mantiene 3 dominios citoplásmicos posicionados entre las hélices del dominio de transporte^{7,10,14,15} (Figura 2).

El segmento transmembranal de transporte es el sitio de unión de los iones, es altamente flexible y se mueve durante el sitio catalítico mientras los iones se asocian y disocian¹⁰. El segmento transmembranal de soporte es una unidad auxiliar rígida que no cambia mucho durante el ciclo catalítico pero que llega a tener funciones especializadas como el proveer de cadenas coordinadoras de iones para la unión de iones adicionales^{7,16}.

Los dominios que se localizan en el espacio intracelular (citoplasma) son:

Dominio-N. Fundamental para el funcionamiento de las P-ATPasas ya que en él se encuentra el sitio de unión a nucleótidos. Se halla como una inserción en el dominio-P y contiene un motivo conservado KGAXE que interactúa con la adenina del ATP^{14,17}.

Dominio-P. Localizado entre las hélices M4 y M5, es el sitio de fosforilación transitoria de un residuo de ácido aspártico altamente conservado en un motivo DKTGTLT. Otras dos secuencias en este dominio son la TGDN y la GDGXDN involucradas en la coordinación del Mg²⁺ asociado con el ATP^{7,10}.

Dominio-A. Es un dominio actuador que transfiere el movimiento en la P-ATPasa durante el ciclo de fosforilación y defosforilación. Este dominio contiene el motivo conservado TGE y se encuentra entre las hélices M1, M2 y M3^{7,10}.

Dominio-R. Un dominio adicional regulatorio presente en algunas P-ATPasas, actúa como un autoinhibidor y puede ser fosforilado mediante la activación por glucosa^{10,16}.

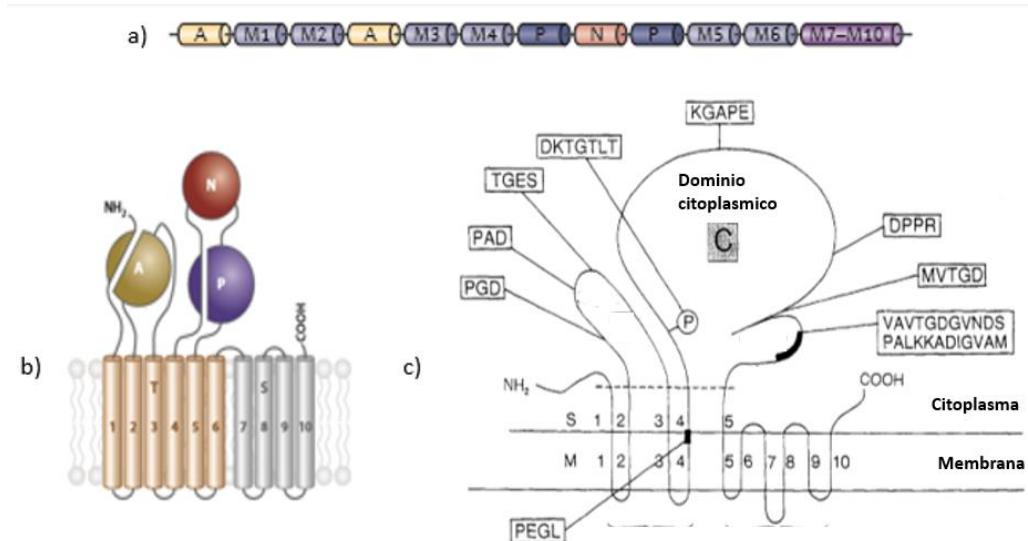


Figura 2 Dominios estructurales de las P-ATPasas.

a) Presentación lineal de la configuración mínima de los dominios¹⁶. b) Esquema 2D de las inserciones de los dominios¹⁶. c) Motivos conservados de los dominios de la Na⁺/K⁺ ATPasa¹⁴.

El ciclo catalítico de las P-ATPasas se conoce como el ciclo Post-Albers (Figura 3), este presenta un estado E₁ de alta afinidad para el ión primario transportado mientras que E₂ es un estado de baja afinidad para el transporte del ión secundario. Estos dos estados provienen

de la formación y ruptura auto-catalizada de una fosfoenzima intermedia (E₁P y E₂P), acoplada a la unión, oclusión, translocación y liberación del ion¹⁰.

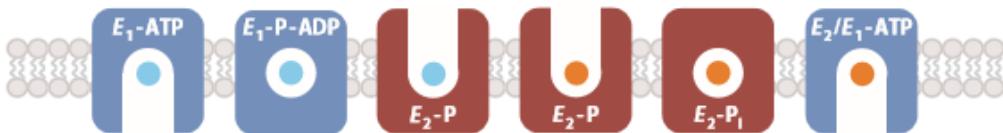


Figura 3 Ciclo catalítico Post-Albers de intercambio iónico en las P-ATPAsas¹⁰.

Los iones no se empujan a través de la membrana, sino que mantienen una posición fija interna⁷.

El ciclo comienza con la unión del Mg²⁺-ATP al dominio-N que genera cambios conformacionales que acercan a éste hacia el dominio-P; gracias a este movimiento el Mg²⁺ se ancla en el dominio-P y el γ-fosfato del ATP puede transferirse al ácido aspártico del dominio-P¹⁷. La oclusión E₁P ocurre durante la fosforilación debido a un entrecruzamiento del dominio-P con el dominio-N, que empujan al dominio-A y a las hélices M1 y M2⁷.

Posterior a la fosforilación del ácido aspártico en el dominio-P se libera al ADP del dominio-N causando un estiramiento entre M3 y el dominio-A. La tensión generada causa que el dominio-A se mueva rotando entre 90° y 120° a una posición sobre el dominio-P. Esta rotación tiene dos consecuencias: genera el estado E₂P, y el amplio movimiento del dominio-A abre un canal al otro lado de la membrana⁷.

Cuando los iones han sido liberados del otro lado de la membrana, la P-ATPasa debe defosforilarse de manera que la unión de “contraiones” al estado E₂P cause el cierre del canal. Esta oclusión en el estado E₂P se regula mediante el motivo TGE del dominio-A que se aproxima hacia el dominio-P y atrae una molécula de agua que se coordina con un residuo de ácido glutámico y el ácido aspártico del dominio-P. El agua lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre la unión al fosfato y defosforila al dominio-P⁷.

El estado E₂ defosforilado contiene a los contraiones ocluídos. Sin embargo, tras liberarse el fosfato y el Mg²⁺ del dominio-P, el dominio-A regresa a su posición original y la P-ATPasa adquiere un estado relajado E₁ otra vez (Figura 4)⁷.

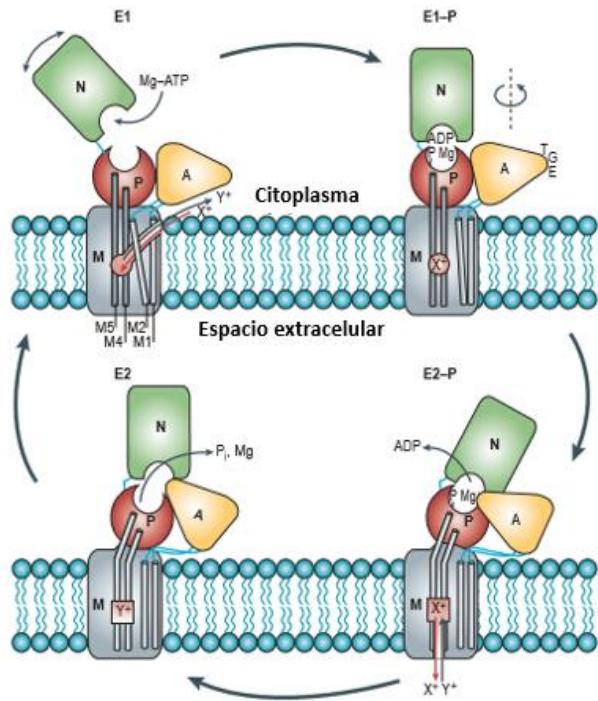


Figura 4 Mecanismo detallado del transporte iónico en las P-ATPasas⁷.

La H⁺-ATPasa de membrana plasmática

La H⁺-ATPasa de membrana plasmática se encuentra presente en células de plantas y hongos, donde la eyeción de protones de la célula genera un gradiente electroquímico vital. Dicha ATPasa se aisló por primera vez de las especies: *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Neurospora crassa*¹⁶.

El primer gen secuenciado de una P-ATPasa de levadura fue el de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática o *PMA1* (YGL008C)¹⁸, posteriormente fue secuenciado *PMA2* (YPL036W) que tiene una menor expresión¹⁹. Tras estas secuenciaciones pudo definirse que la H⁺-ATPasa se relaciona evolutivamente con la Ca²⁺-ATPasa y la Na⁺/K⁺-ATPasa, ésta última ausente en células de plantas y levaduras¹⁸.

La H⁺-ATPasa codificada por el gene *PMA1* es la proteína más abundante en la membrana plasmática de levadura e hidroliza hasta un cuarto del ATP celular. Al formar un gradiente electroquímico a través de la membrana, la H⁺-ATPasa provee energía para un gran número de co-transportadores acoplados a protones para azúcares, aminoácidos y otros nutrientes;

de igual forma contribuye a la regulación del pH intracelular^{18,20}. La H⁺-ATPasa genera altos potenciales de membrana (hasta -300mV en levadura), siendo mayor a lo reportado en cualquier otro sistema de transporte y aún mayor que los -70mV generados por la Na⁺/K⁺-ATPasa, la P-ATPasa homóloga a la H⁺-ATPasa en animales²¹.

La H⁺-ATPasa es única en el sentido que es una P-ATPasa que no intercambia algún contraíon para neutralizar su efecto electrogénico al transportar H⁺ y sólo transporta una carga H⁺ por molécula de ATP²².

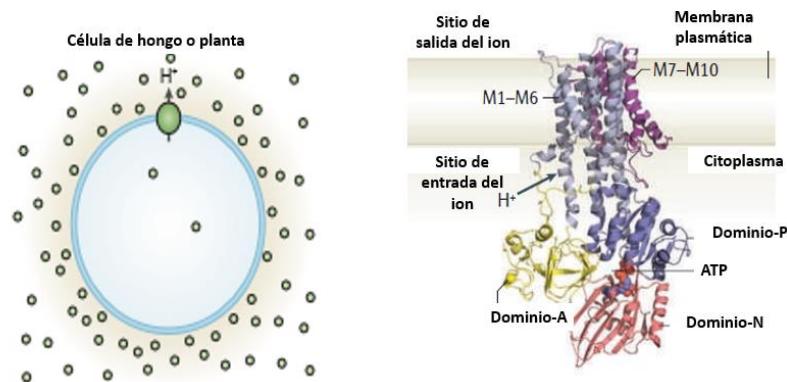


Figura 5 Bombeo de H⁺ y estructura de la H⁺-ATPasa.

a) Bombeo de carga única a través de la célula. b) Estructura 3D de la H⁺-ATPasa¹⁶.

La H⁺-ATPasa contiene un dominio citoplásmico adicional (dominio-R) en el extremo carboxilo terminal que permite su activación por medio de glucosa, esta activación se sospecha es impulsada por un cambio post-traduccional en los residuos de treonina durante su secreción del retículo endoplásmico hacia la superficie celular²³.

Como rasgo único, el dominio transmembranal entre las hélices M4, M5 y M6, presenta una cavidad que puede estar llena de agua en el estado E₁. Dos residuos conservados cargados (ácido aspártico y arginina) se localizan alrededor de esta cavidad. La arginina no toma un papel vital durante el transporte iónico, sin embargo el ácido aspártico actúa como el aceptor/donador central del H⁺ y en su forma protonada interactúa con un residuo de asparagina. La asparagina se mueve hacia el ácido aspártico durante los cambios conformacionales, alterando el pK_a y facilitando la entrada o liberación de H⁺. La formación del estado E₁P se acopla a la protonación del residuo de ácido aspártico de la hélice M6, la defosforilación puede ser estimulada por la formación de un puente salino intramolecular que actúa como un contracatión^{16,24,25}.

Antecedentes

Caracterización estructural y funcional del dominio-N de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*

En la tesis de licenciatura de Biofísica bajo el título “Caracterización estructural y funcional del dominio-N de la H⁺-ATPasa de membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*” el dominio-N de la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* se expresó en células de *Escherichia coli* BL21 DE3 y se purificó por medio de cromatografía de afinidad. Se generó un modelo estructural 3D y se estableció que tenía un residuo único de triptófano W524, medianamente expuesto sobre la superficie de la proteína a una distancia de ~23 Å del residuo F448 localizado en el sitio de unión a nucleótidos, por lo tanto, este residuo se consideró como un buen reportero de cambios estructurales del dominio-N (Figura 6 y 7).

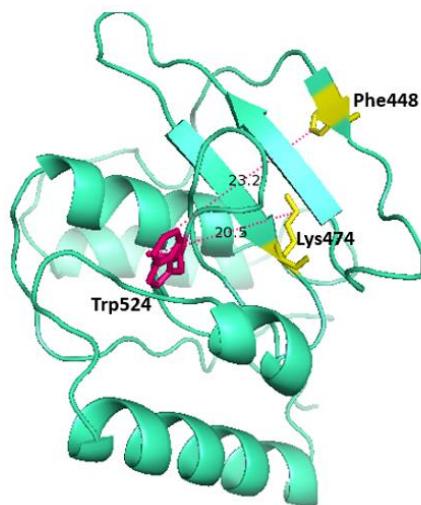


Figura 6 Estructura 3D del dominio-N.

Modelo generado por el servidor Raptor X²⁶ (raptordx.uchicago.edu) mostrando un residuo W524 a una distancia de 23.2 Å de F448 y 20.5 Å de K474.

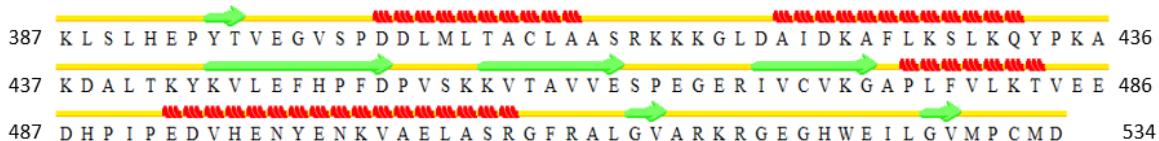


Figura 7 Estructura secundaria del dominio-N.

Colores de identificación: α -hélices en rojo; hojas- β en verde, vueltas en amarillo; generado por el software Stride²⁷ (webclu.bio.wzw.tum.de/cgi-bin/stride/stridec.cgi.py).

Experimentos de fluorescencia en estado estacionario (*steady state*) a unión a nucleótidos demostraron que existe una mayor afinidad por el ATP que por el ADP, y que en presencia de distintos iones su afinidad se ve alterada. En el caso de encontrarse en un medio con iones Mg^{2+} , se forma un complejo de Mg^{2+} -ATP cuya afinidad es menor que el ATP libre. Sin embargo, no existe un efecto por la presencia Mg^{2+} en la afinidad por el ADP. El dominio-N en presencia de iones K^+ incrementa significativamente la afinidad por ambos nucleótidos. Las constantes de afinidad del ATP y el ADP en las condiciones previamente descritas muestran el siguiente patrón: K^+ -ATP> K^+ -ADP>ATP>ADP= Mg^{2+} -ADP> Mg^{2+} -ATP. La asociación del dominio-N con el ATP modificó la estructura secundaria particularmente en la pérdida de estructura de α -hélice y el aumento de entropía sobre la proteína.

Se definieron también las constantes de disociación de distintos fluoroforos cuya actividad haya sido previamente observada como bloqueadora del dominio-N en otras P-ATPasas (quinina, curcumina y fluoresceína), ya fuera por su competitividad al motivo de unión a nucleótidos o por su unión en un sitio distinto.

En este trabajo se busca dar continuidad a la caracterización evaluando la unión a calcio y su efecto sobre dominio-N tal como ha sido descrito en la Ca^{2+} -ATPasa²⁸. También se proveerá de una caracterización termodinámica para evaluar su estabilidad y se obtendrán los distintos parámetros termodinámicos en su evolución temporal. De forma paralela mediante simulaciones computacionales por campos de fuerza se busca obtener una descripción más detallada de los resultados experimentales sobre el funcionamiento del dominio-N de la H^+ -ATPasa de *S. cerevisiae*.

Desplegamiento de proteínas

La función biológica de las proteínas depende de su estructura tridimensional, la cual es determinada por las uniones no covalentes entre su secuencia de aminoácidos y otras fuerzas químicas entre la proteína y su ambiente^{29,30}. Diversos estudios han encontrado que ciertas enfermedades tales como el Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la fibrosis quística y la diabetes tipo II provienen del desorden conformacional de las proteínas³¹, de ahí la importancia de estudiar la estabilidad y las características termodinámicas de una proteína.

La desnaturación consiste en la transformación de una proteína en estado nativo (N) a un estado desnaturizado (U), puede existir un estado intermedio (X_1) también llamado glóbulo fundido, el cual presenta una disminución en la estructura secundaria de la proteína y, un aumento en la flexibilidad y desorden de la estructura terciaria^{32,33}.

Existen dos modelos para estudiar la desnaturación en proteínas, uno descrito por proceso de dos estados (Ec.2) donde los estados nativos y desnaturizados se encuentran significativamente poblados en el equilibrio. Y el modelo de tres estados donde se forma un intermedio X_1 (Ec.3), este tipo de proceso es observado en proteínas con regiones con estabilidad estructural independiente³².



La trehalosa, α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido (Figura 8), es un disacárido encontrado en el citoplasma de algunas levaduras, plantas e invertebrados, principalmente anhidrobiontes. Funciona como un protector ante la desecación y, condiciones de estrés evitando el desplegamiento de las proteínas y suprimiendo la agregación de las ya desnaturadas (Figura 9)³⁴.

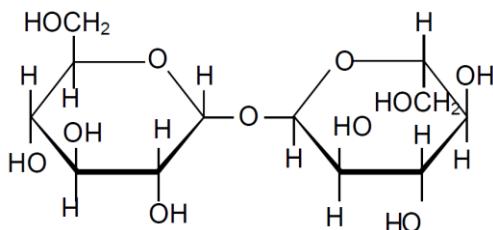


Figura 8 Estructura química de la trehalosa.

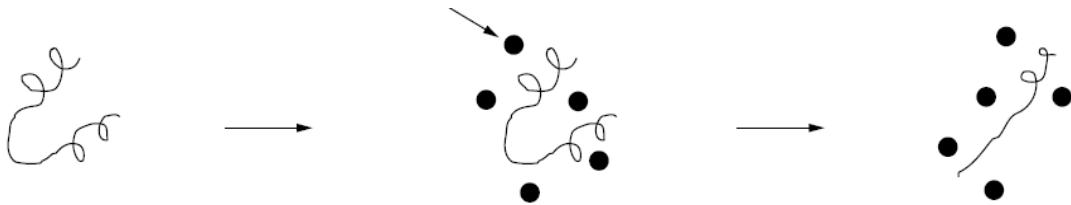


Figura 9 Representación de la posición de la trehalosa sobre las proteínas.

Cuadro 1, proteína en estado nativo; Cuadro 2, la trehalosa previene la desnaturalización de proteínas nativas; Cuadro 3, la trehalosa suprime la agregación de proteínas desnaturalizadas (trehalosa como círculos negros)³⁴.

La síntesis de trehalosa se lleva a cabo en el citoplasma, donde el dominio-N se encuentra expuesto, resulta entonces interesante evaluar si éste azúcar toma algún papel en la función de la subunidad considerando los siguientes antecedentes:

- La trehalosa tiene un rol fundamental en la supervivencia de *S. cerevisiae* ante altas temperaturas³⁴.
- La trehalosa actúa como un termoprotector en la H⁺-ATPasa de *Kluyveromyces lactis* durante ciclos de congelamiento-deshidratación y rehidratación sin cambios estructurales³⁵.
- La actividad de la H⁺-ATPasa tiene un rol fisiológico determinante durante la termotolerancia de *S. cerevisiae*³⁶.
 - La acidificación intracelular se conoce como un mecanismo que aumenta esta termotolerancia³⁷.
 - La afinidad por el ATP y por ende la actividad de la H⁺-ATPasa depende del nivel de acidez del medio, siendo este fenómeno observado a partir de un pH de 6.5^{37,38}.

La concentración fisiológica de trehalosa en *S. cerevisiae* es aproximadamente de 0.5 M, durante el estrés como el incremento de temperatura, la presencia de etanol, desecación y peróxido de hidrogeno³⁴. Algunas temperaturas importantes en la vida de la *S. cerevisiae* son las siguientes:

Tabla 1 Eventos en la vida de *S. cerevisiae* a distintas temperaturas^{34,39-41}.



Unión de iones monoatómicos

La presencia de sitios de unión a iones es una característica común en diversas enzimas ya que estos suelen tener un papel regulatorio en su actividad¹.

En la tesis de maestría “*Identificación de una potencial H⁺-ATPasa en membrana plasmática de Debaryomyces hansenii*” del MC. Miguel Arturo Rivera Moran se mostró como la activación por glucosa en la H⁺-ATPasa de *Debaryomyces hansenii* incrementa en presencia de iones Na⁺, K⁺, Li⁺ y Rb⁺ (Figura 10).

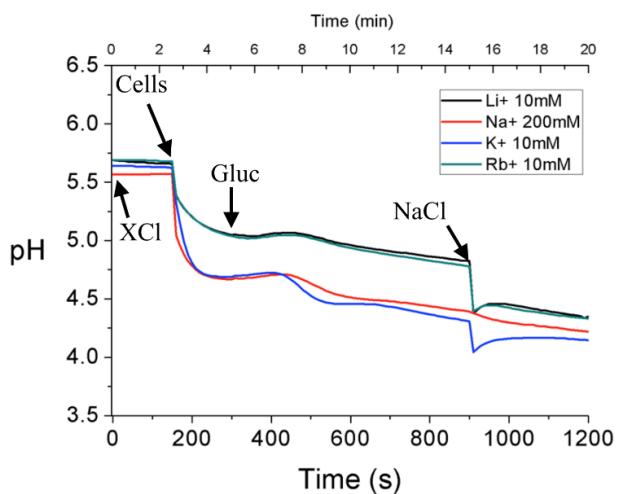


Figura 10 Activación por glucosa en presencia de distintos cationes.

Extraído de la tesis “*Identificación de una potencial H⁺-ATPasa en membrana plasmática de Debaryomyces hansenii*” del Mto. Miguel Arturo Rivera Moran.

El ión K⁺ ha sido identificado como un activador de la H⁺-ATPasa de *Arabidopsis thaliana* que se une a un residuo de ácido aspartico sobre el dominio-P. La unión del K⁺ induce la defosforilación del estado E_iP y contribuye a la estabilidad celular protegiendo a la H⁺-ATPasa de la inactivación térmica⁴².

Un sitio de unión a K⁺ que involucra a un ácido glutámico ha sido identificado en la estructura cristalográfica de la Ca²⁺-ATPasa de retículo sarcoplásmico. Los grupos que coordinan al K⁺ involucran átomos de oxígeno derivados de un residuo de ácido glutámico y tres oxígenos en de una leucina, lisina y alanina en el dominio-P⁴³.

En el dominio-N de la Ca²⁺-ATPasa de retículo sarcoplásmico se reportó la unión a Ca²⁺ involucrado en el incremento de la estructura secundaria y/o compactación, además de

actuar como un modulador que favorece la unión de ATP ante el ADP en caso de estar ambos presentes y compitiendo por su unión al dominio-N²⁸. Por otro lado en *Vicia fava* se ha propuesto una inhibición de la H⁺-ATPasa por el Ca²⁺ citosólico, siendo clave en el cierre estomático y otros procesos celulares⁴⁴.

El estudio de sitios de unión a iones en proteínas suele complicarse debido a su baja señal anómala que dificulta su identificación sobre la estructura de las proteínas, para solucionar este problema se recurre al uso de análogos isomorfos que poseen similitudes en el número de coordinación y radio iónico⁴⁵ (Tabla 1).

Tabla 2 Radios iónicos según el número de coordinación del Calcio y el Terbio^{46,47}.
Medidas en Angstroms.

Numero de coordinación	Ca ²⁺	Tb ³⁺
VI	1	0.923
VII	1.06	0.98
VIII	1.12	1.04
IX	1.18	1.095
X	1.23	-
XII	1.34	-

El terbio es un lantánido trivalente que ha sido utilizado previamente como un análogo del calcio^{45,48}, con la diferencia que el terbio posee luminiscencia proveniente de las transiciones entre los estados ⁵D₄ al ⁷F₆ (490nm) y del ⁵D₄ a ⁷F₅ (545 nm)⁴⁹ (Figura 11).

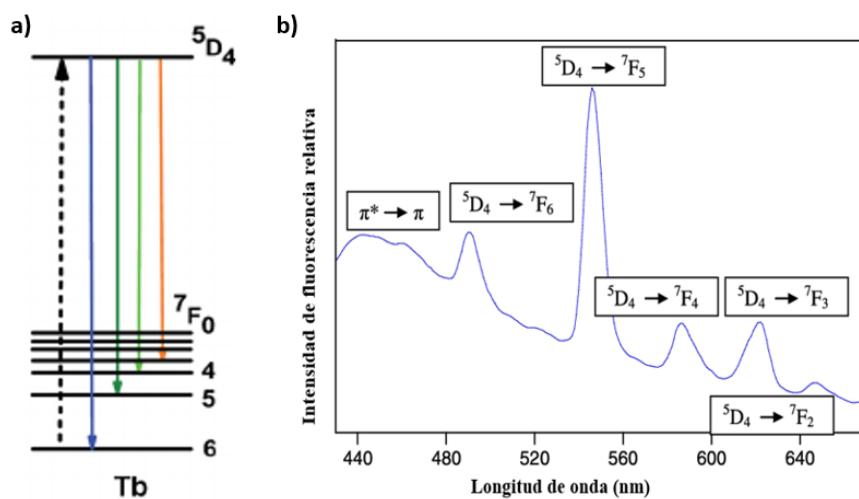


Figura 11 Estados de transición del terbio.

A) Diagrama de Jablonski de transiciones de energía del terbio⁵⁰. B) Espectros de emisión del terbio.

Estudios realizados mediante cristalografía de rayos-X en la H⁺-ATPasa de *A. thaliana* con los análogos cristalográficos de K⁺ (Rb⁺) y Ca²⁺ (Ho³⁺ y Tb³⁺) encontraron que el Rb⁺ se coordina en un residuo conservado de ácido aspártico en el dominio-P. Los iones de Ho³⁺ se coordinan en la interfaz del dominio-N y el dominio-P y sobre el dominio transmembranal hacia el lado extracelular; diversos aminoácidos involucrados en la coordinación de Ho³⁺ se conservan en H⁺-ATPasas de plantas y levaduras⁵¹.

Un sitio único para Tb³⁺ se encuentra posicionado cerca de la interfaz entre el dominio-N y dominio-P coordinando con dos residuos de ácido aspártico y una arginina conservada (R456) en las familias II y III de las P-ATPasas⁵² (Figura 12). Se sugirió entonces que la unión de Tb³⁺ y Ca²⁺ se da probablemente en las cadenas laterales de una arginina y un ácido aspártico interfiriendo con la unión a ATP y/o la transferencia del grupo fosfato. Esta inhibición de actividad también ha sido observada en la Ca²⁺-ATPasa de retículo sarcoplasmico⁵³.

Sin embargo, en el dominio-N de H⁺-ATPasa de *Schizosaccharomyces pombe* se ha descrito un sitio de unión a Tb³⁺ de alta afinidad ($K_d=20 \mu\text{M}$) que realiza un cambio conformacional sobre la estructura secundaria e interactúa con el sitio de unión a nucleótidos promoviendo su unión con el ATP. Ante este resultado se propuso que a una baja concentración de cationes libres, el sitio de unión a nucleótidos no se encuentra de forma accesible, previniendo cualquier tipo de actividad hidrolítica⁵⁴.

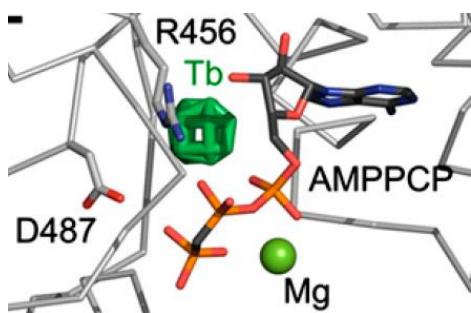


Figura 12 Sitio de unión de Tb³⁺ en la H⁺-ATPasa de *A. thaliana*⁵².

El Tb³⁺ se une cerca del nucleótido AMPPCP y a los residuos conservados Arg456 y Asp487⁵² de en la H⁺-ATPasa de *A. thaliana*.

Justificación

El dominio-N de la H⁺ATPasa de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* tiene un papel fundamental en la transición del estado E₁ al E₂ según el ciclo catalítico Post-Albers, por lo tanto, alteraciones en el dominio-N afectarán la actividad de la H⁺ATPasa y consecuentemente el mantenimiento del gradiente electroquímico de protones (H⁺) en la célula.

La caracterización del dominio-N de la H⁺ATPasa permitirá entender el mecanismo de unión de sustratos (nucleótidos) al dominio-N de las P-ATPAsas en general; lo anterior debido al alto grado de homología estructural que existe entre ellas.

Con esto se busca contribuir a un mejor entendimiento sobre la patogénesis de distintas enfermedades involucradas con P-ATPAsas. Además, las P-ATPAsas se han identificado como un blanco para el desarrollo de fármacos para el tratamiento del cáncer y, enfermedades por hongos y protozoarios.

Hipótesis

Existe al menos un sitio de unión a iones en el dominio-N de la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* con efecto sobre la actividad de la enzima. Estos sitios de unión a iones modifican la estructura secundaria y a su vez las propiedades ópticas del dominio-N, por lo que podrán ser caracterizados por señal de fluorescencia y dicroísmo circular.

El dominio-N mantiene su función de unión a nucleótidos frente altas temperaturas para asegurar el bombeo de H⁺, un proceso vital para la levadura. Para poder preservar su función y estructura, el dominio-N hace uso de la trehalosa presente en el citoplasma.

Objetivo general

Obtener información sobre la estructura, estabilidad y grado de afinidad hacia su ligando del dominio-N de la H⁺-ATPasa de *S. cerevisiae* ante diversas condiciones fisiológicas.

Objetivos específicos

1. Determinar las constantes de afinidad del dominio-N para ATP y ADP a diferentes pH.
2. Determinar los modos de unión de ATP y ADP con los residuos involucrados.
3. Determinar las constantes de afinidad del dominio-N para el ión Ca²⁺.
4. Determinar los residuos involucrados con la unión de iones Ca²⁺ y K⁺ al dominio-N.
5. Determinar las constantes de afinidad del dominio-N para ATP y ADP en ambientes saturados de iones Ca²⁺ y K⁺.
6. Determinar el cambio de estructura secundaria ante la adición de ATP en ambientes saturados de iones Ca²⁺ y K⁺.
7. Determinar la energía de Gibbs asociada al despliegamiento del dominio-N ante cambios de temperatura y agentes desnaturalizantes.
8. Determinar el rol termoprotector de la trehalosa sobre el dominio-N evaluando el cambio de energía de Gibbs.
9. Determinar la relación estequiometria de unión entre ATP y el dominio-N.

Materiales

*Medio LB**

Para un litro:

5 gr Extracto de levadura
10 gr Bacto Tryptone
10 gr NaCl

* Debe ser centrifugado para eliminar
partículas no solubles y autoclaveado

Buffer de fosfatos 0.1 M pH 8

Para 100 ml se utilizan:

1.5 gr K₂HPO₄
0.18 gr KH₂PO₄

Buffer de lisis

0.05 M Buffer Tris pH 7.4
0.3 M NaCl
5 mM EGTA
1 mM de PMSF
0.25 mg/ml de lisozima

Referencias

1. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*; 2005. doi:10.1016/j.jse.2011.03.016.
2. Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature*. 2000;405(6787):647-655. doi:10.1038/35015017.
3. Nakamura S. Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) activated by glucose: A possible link to diabetes. In: *Handbook of H⁺-ATPases*. ; 2014. doi:10.4032/9789814411929.
4. Anandakrishnan R, Zuckerman DM. Biophysical comparison of ATP-driven proton pumping mechanisms suggests a kinetic advantage for the rotary process depending on coupling ratio. *PLoS One*. 2017. doi:10.1371/journal.pone.0173500.
5. Apell HJ. How do P-Type ATPases transport ions? In: *Bioelectrochemistry*. ; 2004. doi:10.1016/j.bioelechem.2003.09.021.
6. Okamura H, Denawa M, Ohniwa R, Takeyasu K. P-type ATPase superfamily: Evidence for critical roles for kingdom evolution. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. ; 2003. doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07163.x.
7. Kühlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(4):282-295. doi:10.1038/nrm1354.
8. Plesner L. Ecto-ATPases: Identities and Functions. *Int Rev Cytol*. 1995. doi:10.1016/S0074-7696(08)62487-0.
9. Pedersen PL, Carafoli E. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem Sci*. 1987. doi:10.1016/0968-0004(87)90071-5.
10. Palmgren MG, Nissen P. P-Type ATPases. *Annu Rev Biophys*. 2011. doi:10.1146/annurev.biophys.093008.131331.
11. Strausak D, Mercer JFB, Dieter HH, Stremmel W, Multhaup G. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. In: *Brain Research Bulletin*. ; 2001. doi:10.1016/S0361-9230(01)00454-3.
12. Devaux PF, Herrmann A, Ohlwein N, Kozlov MM. How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2008. doi:10.1016/j.bbamem.2008.03.007.
13. Sørensen DM, Buch-Pedersen MJ, Palmgren MG. Structural divergence between the two subgroups of P5 ATPases. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2010. doi:10.1016/j.bbabi.2010.04.010.
14. Moller J V., Juul B, Maire M le. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta*. 1996. doi:10.1016/0304-419X(95)00020-G.

15. Bublitz M, Morth JP, Nissen P. P-type ATPases at a glance. *J Cell Sci.* 2011. doi:10.1242/jcs.102921.
16. Morth JP, Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, et al. A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12(1):60-70. doi:10.1038/nrm3031.
17. Hilge M, Siegal G, Vuister GW, Güntert P, Gloor SM, Abrahams JP. ATP-induced conformational changes of the nucleotide-binding domain of Na,K-ATPase. *Nat Struct Biol.* 2003. doi:10.1038/nsb924.
18. Serrano R, Kiellandbrandt MC, Fink GR. Yeast Plasma-Membrane ATPase Is Essential for Growth and Has Homology with (Na⁺⁺K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature.* 1986. doi:10.1038/319689a0.
19. Schlesser A, Ulaszewski S, Ghislain M, Goffeau A. A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1988.
20. Ambesi A, Miranda M, Petrov V V, Slayman CW. Biogenesis and function of the yeast plasma-membrane H⁽⁺⁾-ATPase. *J Exp Biol.* 2000;203(Pt 1):155-160. doi:10.1016/0003-9861(86)90400-5.
21. Yatime L, Buch-Pedersen MJ, Musgaard M, et al. P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* 2009;1787(4):207-220. doi:10.1016/j.bbabi.2008.12.019.
22. Perlin DS, San Francisco MJD, Slayman CW, Rosen BP. H⁺/ATP stoichiometry of proton pumps from *Neurospora crassa* and *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* 1986. doi:10.1016/0003-9861(86)90400-5.
23. Ferreira T, Mason AB, Slayman CW. The Yeast Pma1 Proton Pump: A Model for Understanding the Biogenesis of Plasma Membrane Proteins. *J Biol Chem.* 2001. doi:10.1074/jbc.R100022200.
24. Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Preben Morth J, Palmgren MG, Nissen P. Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature.* 2007;450(7172):1111-1114. doi:10.1038/nature06417.
25. Catty P, De Kerchove D'Exaerde A, Goffeau A. The complete inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Lett.* 1997. doi:10.1016/S0014-5793(97)00446-8.
26. Källberg M, Wang H, Wang S, et al. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc.* 2012. doi:10.1038/nprot.2012.085.
27. Frishman D, Argos P. Knowledge-based protein secondary structure assignment. *Proteins Struct Funct Bioinforma.* 1995. doi:10.1002/prot.340230412.
28. Páez-Pérez ED, De La Cruz-Torres V, Sampedro JG. Nucleotide Binding in an Engineered Recombinant Ca²⁺-ATPase N-Domain. *Biochemistry.* 2016;55(49):6751-6765. doi:10.1021/acs.biochem.6b00194.

29. Gummadi SN. What is the role of thermodynamics on protein stability? *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2003. doi:10.1007/BF02932892.
30. Martin ACR, Orengo CA, Hutchinson EG, et al. Protein folds and functions. *Structure.* 1998. doi:10.1016/S0969-2126(98)00089-6.
31. Soto C. Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett.* 2001. doi:10.1016/S0014-5793(01)02486-3.
32. Apenten RKO, Khokhar S, Galani D. Stability parameters for β -lactoglobulin thermal dissociation and unfolding in phosphate buffer at pH 7.0. *Food Hydrocoll.* 2002. doi:10.1016/S0268-005X(01)00067-4.
33. Trevino SR, Scholtz JM, Pace CN. Measuring and Increasing Protein Solubility. *J Pharm Sci.* 2008;97(10):4155-4166. doi:10.1002/jps.21327.
34. Singer M a, Lindquist S. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 1998;16(11):460-468. doi:10.1016/S0167-7799(98)01251-7.
35. Sampedro JG, Guerra G, Pardo JP, Uribe S. Trehalose-Mediated Protection of the Plasma Membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis* during Freeze-Drying and Rehydration. *Cryobiology.* 1998. doi:10.1006/cryo.1998.2109.
36. Coote PJ, Jones M V., Seymour IJ, et al. Activity of the plasma membrane H⁺-ATPase is a key physiological determinant of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 1994. doi:10.1099/13500872-140-8-1881.
37. Coote PJ, Cole MB, Jones M V. Induction of increased thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* may triggered by a mechanism involving intracellular pH. *J Gen Microbiol.* 1991. doi:10.1099/00221287-137-7-1701.
38. Eraso P, Gancedo C. Activation of yeast plasma membrane ATPase by acid pH during growth. *FEBS Lett.* 1987. doi:10.1016/0014-5793(87)80445-3.
39. Vanoni M, Vai M, Frascotti G. Effects of temperature on the yeast cell cycle analyzed by flow cytometry. *Cytometry.* 1984. doi:10.1002/cyto.990050515.
40. N'Guessan FK, Coulibaly HW, Alloue-Boraud MWA, Cot M, Djè KM. Production of freeze-dried yeast culture for the brewing of traditional sorghum beer, tchapalo. *Food Sci Nutr.* 2016. doi:10.1002/fsn3.256.
41. Bond C. Freeze-Drying of Yeast Cultures. In: *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols.* ; 2007. doi:10.1007/978-1-59745-362-2_6.
42. Buch-Pedersen MJ, Rudashevskaya EL, Berner TS, Venema K, Palmgren MG. Potassium as an Intrinsic Uncoupler of the Plasma Membrane H⁺-ATPase. *J Biol Chem.* 2006;281(50):38285-38292. doi:10.1074/jbc.M604781200.
43. Sørensen TLM, Clausen JD, Jensen AML, et al. Localization of a K⁺-binding site involved in dephosphorylation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem.* 2004. doi:10.1074/jbc.C400414200.

44. Kinoshita T. Cytosolic Concentration of Ca²⁺ Regulates the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Guard Cells of Fava Bean. *PLANT CELL ONLINE*. 1995. doi:10.1105/tpc.7.8.1333.
45. Pidcock E, Moore GR. Structural characteristics of protein binding sites for calcium and lanthanide ions. *J Biol Inorg Chem*. 2001. doi:10.1007/s007750100214.
46. Shannon RD. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Crystallogr Sect A*. 1976. doi:10.1107/S0567739476001551.
47. Ahrens LH. The use of ionization potentials Part 1. Ionic radii of the elements. *Geochim Cosmochim Acta*. 1952. doi:10.1016/0016-7037(52)90004-5.
48. Wallace RW, Tallant EA, Dockter ME, Cheung WY. Calcium Binding Domains of Calmodulin. *J Biol Chem*. 1982. doi:10.1109/MCOM.2016.7565270.
49. Bhaumik ML, El-Sayed MA. Mechanism and rate of the intramolecular energy transfer process in rare-earth chelates [1]. *J Chem Phys*. 1965. doi:10.1063/1.1696007.
50. Maciel GS, Rakov N. Photon conversion in lanthanide-doped powder phosphors: concepts and applications. *RSC Adv*. 2015. doi:10.1039/C4RA15804K.
51. Seto-Young D, Na S, Monk BC, Haber JE, Perlin DS. Mutational analysis of the first extracellular loop region of the H⁺- ATPase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1994.
52. Ekberg K, Pedersen BP, Sørensen DM, et al. Structural identification of cation binding pockets in the plasma membrane proton pump. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21400-21405. doi:10.1073/pnas.1010416107.
53. Highsmith SR, Head MR. Tb³⁺ binding to Ca²⁺ and Mg²⁺ binding sites on sarcoplasmic reticulum ATPase. *J Biol Chem*. 1983.
54. Ronjat M, Lacapere JJ, Dufour JP, Dupont Y. Study of the nucleotide binding site of the yeast *Schizosaccharomyces pombe* plasma membrane H⁺-ATPase using formycin triphosphate-terbium complex. *J Biol Chem*. 1987.
55. Froger A, Hall JE. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. *J Vis Exp*. 2007. doi:10.3791/253.
56. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-275. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.
57. Van De Weert M, Stella L. Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology. *J Mol Struct*. 2011. doi:10.1016/j.molstruc.2011.05.023.
58. Teale FWJ, Weber G. Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. *Biochem J*. 1957;65(3):476-482. doi:10.1042/bj0650476.
59. Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Lakowicz JR, ed.). Boston, MA: Springer US; 2006. doi:10.1007/978-0-387-46312-4.

60. Sampedro JG, Nájera H, Uribe-Carvajal S, Ruiz-Granados YG. Mapping the ATP binding site in the plasma membrane H^{+} -ATPase from *Kluyveromyces lactis*. *J Fluoresc*. 2014. doi:10.1007/s10895-014-1473-1.
61. Sampedro JG, Ruiz-Granados YG, Nájera H, Téllez-Valencia A, Uribe S. Fluorescence quenching by nucleotides of the plasma membrane H^{+} -ATPase from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemistry*. 2007. doi:10.1021/bi700016v.
62. Wu PG, Brand L. Resonance energy transfer: Methods and applications. *Anal Biochem*. 1994. doi:10.1006/abio.1994.1134.
63. England JL, Haran G. Role of Solvation Effects in Protein Denaturation: From Thermodynamics to Single Molecules and Back. *Annu Rev Phys Chem*. 2011;62(1):257-277. doi:10.1146/annurev-physchem-032210-103531.
64. Vivian JT, Callis PR. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys J*. 2001. doi:10.1016/S0006-3495(01)76183-8.
65. Trevino SR, Scholtz JM, Pace CN. Measuring and Increasing Protein Solubility. *J Pharm Sci*. 2008;97(10):4155-4166. doi:10.1002/jps.21327.
66. Guthrie C, Fink GR. Methods in enzymology: Preface. *Methods Enzymol*. 2002. doi:10.1016/S0076-6879(02)51836-X.
67. Prabhu N V., Sharp KA. HEAT CAPACITY IN PROTEINS. *Annu Rev Phys Chem*. 2005. doi:10.1146/annurev.physchem.56.092503.141202.
68. Roman EA, Santos J, Flecha FLG. The Use of Circular Dichroism Methods to Monitor Unfolding Transitions in Peptides, Globular and Membrane Proteins. In: *Circular Dichroism: Theory and Spectroscopy*; 2011.
69. Autry JM, Rubin JE, Svensson B, Li J, Thomas DD. Nucleotide activation of the Ca^{2+} -ATPase. *J Biol Chem*. 2012. doi:10.1074/jbc.M112.404434.
70. Matulis D, Baumann CG, Bloomfield VA, Lovrien RE. 1-Anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent. *Biopolymers*. 1999. doi:10.1002/(SICI)1097-0282(199905)49:6<451::AID-BIP3>3.0.CO;2-6.
71. Morris GM, Lim-Wilby M. Molecular docking. *Methods Mol Biol*. 2008;443:365-382. doi:10.1007/978-1-59745-177-2_19.
72. Hirose K. A practical guide for the determination of binding constants. *J Incl Phenom*. 2001. doi:10.1023/A:1011117412693.
73. Morris GM, Lim-Wilby M. Molecular Docking. In: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.); 2008:365-382. doi:10.1007/978-1-59745-177-2_19.
74. Oleg T, J OA. AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J Comput Chem*. 2010. doi:10.1002/jcc.
75. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004. doi:10.1002/jcc.20084.

76. Astuti AD, Mutiara AB. h. *arXiv Prepr arXiv09120893*. December 2009. <http://arxiv.org/abs/0912.0893>.
77. Abraham M, Hess B, Spoel D van der, Lindahl E. Gromacs - Reference Manual Version 2016.3. *SpringerReference*. 2015. doi:10.1007/SpringerReference_28001.
78. Jorgensen WL, Tirado-Rives J. The OPLS Potential Functions for Proteins. Energy Minimizations for Crystals of Cyclic Peptides and Crambin. *J Am Chem Soc*. 1988. doi:10.1021/ja00214a001.
79. Van Eunen K, Bouwman J, Daran-Lapujade P, et al. Measuring enzyme activities under standardized in vivo-like conditions for systems biology. *FEBS J*. 2010. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07524.x.
80. Mao L, Wang Y, Liu Y, Hu X. Multiple Intermolecular Interaction Modes of Positively Charged Residues with Adenine in ATP-Binding Proteins. *J Am Chem Soc*. 2003. doi:10.1021/ja036096p.
81. Copeland KL, Anderson JA, Farley AR, Cox JR, Tschumper GS. Probing phenylalanine/adenine ??-stacking interactions in protein complexes with explicitly correlated and CCSD(T) computations. *J Phys Chem B*. 2008. doi:10.1021/jp805528v.
82. Mcphalen CA, Strynadka NCJ, James MNG. Calcium-Binding Sites in Proteins: A Structural Perspective. *Adv Protein Chem*. 1991. doi:10.1016/S0065-3233(08)60535-5.