



## **Modificaciones Estructurales y Funcionales de la $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de Retículo Sarcoplásmico de Músculo Estriado**

Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Interdisciplinarias presenta:

**M en C Miguel Arturo Rivera Morán**

### **Línea de Investigación**

Bioquímica y Biología Celular

### **Director de Tesis**

Dr. José Guadalupe Sampedro Pérez, Universidad Autónoma de San Luis Potosí

San Luis Potosí, 20 de septiembre de 2024



**POSGRADO  
EN CIENCIAS  
INTERDISCIPLINARIAS**



Modificaciones Estructurales y Funcionales de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de Retículo Sarcoplásmico de Músculo Estriado © 2024 by Miguel Arturo Rivera Morán is licensed under [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

## Resumen

Durante el último siglo distintos procedimientos de purificación de proteínas han sido reportados y adaptados a proteínas y enzimas específicas. Estas metodologías usualmente no toman en cuenta a las proteínas de membrana debido a su naturaleza anfipática. De hecho, los métodos más efectivos de purificación de proteínas de membrana involucran la generación de genes sintéticos, sobreexpresión heteróloga, en algunos casos solubilización de cuerpos de inclusión y aislamiento por cromatografía. Frecuentemente, estas construcciones de genes poseen mutaciones, proteínas truncadas, etiquetas como His-tag, u otras manipulaciones que pueden cambiar la estructura nativa o modificación de la actividad, como la falta de modificaciones postraduccionales naturalmente realizadas. Por lo anterior, métodos de alto rendimiento de aislamiento para proteínas de membrana silvestres deben ser desarrolladas sin cambiar las propiedades catalíticas y conformación tridimensional de las proteínas. Como en el caso de las bombas primarias, ATPasas tipo P, muchos impedimentos dificultan la purificación de estas enzimas ya que son muy lábiles y sensibles a la temperatura. En este sentido, es bien sabido que el disacárido trehalosa modifica el entorno de la proteína previniendo inactivación catalítica y desnaturalización por interacción de puentes de hidrógeno, alta viscosidad y compactación de la estructura. Estas características previenen efectos negativos en la estructura proteica durante la purificación por muchas horas en ultracentrifugación. La purificación con trehalosa de alta eficiencia (>95%) de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (SERCA) de músculo de conejo y  $\text{H}^{+}$ -ATPasa de *Kluyveromyces lactis* silvestres son ejemplos de la efectividad de esta metodología. Más aun, se espera que los esfuerzos para purificar otras ATPasas como  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPasa,  $\text{H}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPasa, y  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (PMCA) se logren en el futuro cercano. Notablemente, el uso de ATPasas silvestres purificadas produce estructuras e información enzimática más confiables debido a que poseen todas las modificaciones postraduccionales durante la maduración de la enzima. Finalmente, las ATPasas purificadas con trehalosa pueden ser usadas para cinética enzimática, fluorescencia, experimentos de espectro de dicroísmo circular, cristalización y determinación de estados oligoméricos. En este trabajo desarrollamos un nuevo método para aislar a la enzima SERCA

de músculo de contracción rápida de conejo al adaptar nuestra metodología para H<sup>+</sup>-ATPasa de membrana plasmática de levaduras. El cual garantiza la preservación del plegamiento de proteínas por la adición de trehalosa durante la purificación por muchas horas y a alta velocidad angular. SERCA purificada mostró actividad y estructura normal de ATPasa, por ensayo acoplado de enzimas y marcado del dominio N con FITC. La cinética enzimática de ATPasa, por ensayo acoplado de enzimas, reveló una saturación hiperbólica por el ATP. Además, incrementos continuos de la concentración de ATP revelaron una saturación similar a la hiperbólica del dominio N. Tomando lo anterior, hemos desarrollado un método de aislamiento de alto rendimiento para ATPasas tipo P embebidas en membranas intracelulares usando la estabilización estructural mediada por trehalosa. En el futuro cercano este protocolo se podría usar para purificar distintas enzimas y proteínas de membrana con el fin de describir más detalladamente todas las características usando biomoléculas (enzimas o membranas) silvestres y naturalmente modificadas.

## Abstract

During the last century different protein purification procedures had been reported and adapted for specific proteins and enzymes. These methods usually do not take into account membrane proteins owing its amphipathic nature. In fact, the most effective membrane protein purification methods involve synthetic genes, heterologous over expression, in some cases inclusion bodies solubilization, and chromatographic isolation. Frequently, these gene constructions possess mutations, protein truncations, labels as His-tag, or other manipulations that may disrupt the native structure or modify the activity, as lack of natural-occurring post-translational modifications. Due to above, high performance isolation methods for native membrane proteins must be developed without changing their catalytic properties and protein three-dimensional conformation. As in the case of the primary active pumps, the P-type ATPases, several impediments make difficult their purification since they are very labile and sensitive to temperature. In this sense, it is well known that the disaccharide trehalose modifies the protein's environment preventing its catalytic inactivation and denaturation by hydrogen bonds, high viscosity and structural compaction. These features prevent negative effects on the protein structure during insulation by ultracentrifugation during several hours. The high efficiency trehalose-mediated purification (>95%) of wild-types  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) from rabbit muscle and  $\text{H}^{+}$ -ATPase from *Kluyveromyces lactis* are examples of the effectiveness of this methodology. Furthermore, it is expected that the efforts for purify other ATPases as well as  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase,  $\text{H}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) will be reached in the near future. Notably, the usage of purified wild-type ATPases yield more reliable structural and enzymatic data due that they possess all the post-translational modifications during enzyme maturation. Finally, purified ATPases with trehalose can be used for enzyme kinetics, fluorescence, CD spectra, crystallization, and oligomeric states determination. In this work we developed a new method for SERCA isolation from fast twitch muscle from rabbit by adapting our methodology for plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase from yeasts. Which, guarantee protein folding preservation by the addition of trehalose during purification at high angular velocity for several hours. Purified SERCA displayed normal ATPase activity and structure by enzymes-coupled assay and FITC-labeling N domain. Enzyme kinetics revealed a hyperbolic ATP saturation. In

addition, step-wise ATP increasing concentration revealed N-Domain hyperbolic-like saturation. Taking together, we have developed a high yield isolation method for P-type ATPases embedded in intracellular membranes using trehalose-mediated structural-stabilization. In the near future this protocol might be used to purify diverse membrane enzymes and proteins in order to describe more precisely all their features using wild-type and natural modified biomolecules.

## Agradecimientos

A Ana Karen, mi esposa, por el apoyo que me has dado siempre. Por aventurarte conmigo en esta experiencia en la ciencia. Tu apoyo y motivación han sido muy importantes para lograr terminar el posgrado. Cuando he tenido duda o incertidumbre siempre me has dado tu apoyo y apuestas por nosotros. Con ese respaldo no necesito más para saber que lograremos nuestros objetivos porque nuestra voluntad es fuerte.

A Ana Sofía y Ana Victoria, mis hijas, que en esta nueva etapa me dan la motivación, fuerza y resiliencia para continuar con nuevos proyectos con largas horas de trabajo físico y mental. Es increíble lo que un padre puede hacer por sus hijas para asegurar su felicidad y cuidar sus sueños para que se puedan cumplir.

A Verónica Morán, mi mamá, que siempre me recordó que obtener el grado de esta tesis era muy importante para mi desarrollo profesional fuera de la academia. Gracias por tu apoyo y consejos que me has dado desde que era un niño en el kínder hasta hoy concluyendo el doctorado. A mis hermanos, Luis, José y Carlos. Por demostrar el cariño y apoyo a mi familia y a mí en momentos complicados después del doctorado. Extiendo este agradecimiento a mi familia política que me han tratado como a un hijo, hermano y tío. A Arturo Rivera, mi papá, que está pendiente de nuestras actividades y proyectos. Que nos apoya cuando se necesita resolver algún inconveniente o dar un buen consejo.

A toda la comunidad del Instituto de Física con los que conviví más de una década. Aprendí mucho de cada uno y también me hice de grandes amigos. Especialmente agradecer por su apoyo a los doctores Enrique González, Pedro Ruíz, Pedro Ramírez, Alfredo Méndez y Edgardo Ugalde.

A mis compañeras de laboratorio que vieron mi mejor y peor etapa en el doctorado (Jos, Yola, Lety y en su momento Valentín). Hicieron que esos años se llenaran de buenos recuerdos en el laboratorio. Recordaré las charlas por las tardes en viernes sobre experimentos, enzimas y bioquímica con café, vino, pizza y botana.

A mis amigos de toda la vida Pedro, Ulises, Erick, Yoshua y Toño; y sus respectivas esposas. Con quienes desde hace muchos años hemos convivido y son una parte importante en mi vida y de mi familia.

Mil gracias a la ciencia.

# Índice

## Contenido

Modificaciones Estructurales y Funcionales de la Ca <sup>2+</sup> -ATPasa de Retículo Sarcoplásmico de Músculo Estriado.....	1
M en C Miguel Arturo Rivera Morán .....	1
Línea de Investigación .....	1
Director de Tesis.....	1
Resumen.....	2
Abstract .....	5
Agradecimientos .....	7
Índice .....	8
Introducción .....	9
P-ATPasas .....	9
Ca <sup>2+</sup> -ATPasa de Retículo Sarcoplásmico .....	11
Estructura de SERCA.....	12
Trehalosa .....	15
Objetivos .....	17
Materiales y métodos .....	18
Resultados y discusión .....	34
Estructura y Función de SERCA .....	34
Dominio N de SERCA silvestre .....	44
Referencias.....	47
Portada del Artículo .....	54

## Introducción

### P-ATPasas

Las P-ATPasas son enzimas ubicuas en la naturaleza e integrales en membranas como: membrana plasmática, retículo endoplásmico, vacuolas y complejo de Golgi. Estas enzimas son capaces de translocar iones (uno o más) en contra de su gradiente electroquímico o intercambiar lípidos de una monocapa a otra. Esta actividad se lleva a cabo a expensas del gasto de la energía liberada por la hidrólisis de ATP. Esta molécula al ser hidrolizada por las P-ATPasas forma un estado intermediario fosforilado de la enzima, de aquí que se les denomine ATPasas tipo P. Esta fosforilación tiene como resultado cambios conformacionales permitiendo así el transporte de los iones. A este tipo de enzimas se les denomina transportadores o bombas primarias y son de suma importancia para restituir el potencial de membrana, generar el desequilibrio iónico y mantener la homeostasis celular.

Durante muchas décadas se han estudiado y caracterizado distintas P-ATPasas pudiendo así clasificar a las distintas enzimas de esta familia en varios grupos. En un inicio la clasificación se basaba en el tipo de ion que translocan: metales pesados y metales no pesados [Lutsenko, S. y Kaplan, J.H. 1995]. Esta clasificación se dejó de utilizar al intentar clasificar, en su tiempo, a las recién descubiertas P-ATP capaces de translocar lípidos. La nueva clasificación toma en cuenta toda la información disponible de las estas enzimas como los iones o lípidos que transportan, su secuencia de aminoácidos, su secuencia de DNA, el gene, locus y su origen evolutivo. La nueva clasificación subdivide a las P-ATPasas en 5 grupos (Figura 1):

**PI.** En este grupo se encuentra la subunidad B de la Kdp-ATPasa de *Escherichia coli*, con la evidencia reportada a esta ATPasa se le propone como la más primitiva [Altendorf, K. *et al.*, 1998]. También en este grupo se encuentran las ATPasas capaces de translocar metales pesados como  $\text{Co}^+$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  [Lutsenko, S. y Kaplan, J.H. 1995; Axelsen, K.B. y Palmgren, M.G. 1998].

**PII.** En este grupo se encuentran ATPasas estudiadas más exhaustivamente por su importancia en la fisiología y fisiopatología humana. Por ejemplo,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (NKA) o bomba de sodio, la bomba de protones de las células parietales o  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (HKA), y las bombas de calcio o  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (SERCA y PMCA).



## Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de Retículo Sarcoplásmico

La Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de retículo sarco(*endo*)plásmico, SERCA1a o bomba de calcio (SERCA en este documento), es una enzima integral de retículo sarcoplásmico y aproximadamente comprende el 50-90 % de las proteínas totales en la membrana de este organelo en músculo estriado de contracción rápida [McFarland, B.H. & Inesi, G 1971; Palmgren, M.G. & Nissen, P 2011; Dang, D. & Rao, R. 2016]. Normalmente, en las células ocurren distintos fenómenos que modifican la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup>. A estas modificaciones se les conoce como señalización global de calcio, las cuales pueden variar en duración, concentración, localización en el tiempo y origen [Bergner, A. & Huber, R.M. 2008]. En las células musculares, cuando ocurre un aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> debido a la entrada a mansalva de este ion por la apertura de canales de calcio o por el desacople del calcio de la maquinaria contráctil, se recupera el potencial de membrana y la concentración de los iones se restituye por varias vías; como el transporte activo primario y transporte activo secundario. Además, es bien sabido que el incremento sostenido de calcio en el citosol provoca apoptosis celular [Dang, D. & Rao, R. 2016] por lo que la restitución de los gradientes electroquímicos debe ser rápida y muy eficiente por distintos mecanismos como el transporte al espacio extracelular o almacenar el Ca<sup>2+</sup> dentro de algunos organelos. En la literatura, se han reportado distintos reservorios de Ca<sup>2+</sup> como la mitocondria, el núcleo, el complejo de Golgi y vesículas de transporte. Aunque el principal reservorio de calcio es el retículo sarcoplásmico por medio de la actividad de la bomba primaria Ca<sup>2+</sup>-ATPasa [Bergner, A. & Huber, R.M. 2008].

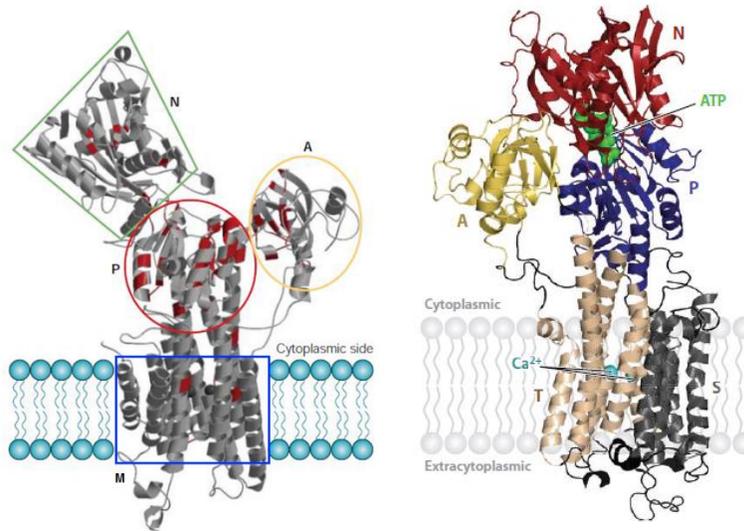


Figura 2. Estructura tridimensional de SERCA. Izquierda: Estructura de las P-ATPasas conformadas por tres dominios citoplásmicos y uno transmembranal. En rojo se muestran residuos conservados en SERCA de conejo, NKA de rata, PMA1 de *Neurospora crassa* y  $\text{Cu}^+$ -ATPasa de *Homo sapiens* [Kühlbrandt, W. 2004]. Derecha: Estructura cristalográfica de SERCA (PDB: 1T5S). En color amarillo

A principios del siglo XXI, Toyoshima y colaboradores determinaron por difracción de rayos X la estructura cristalográfica de SERCA [Toyoshima, C. *et al.* 2000]. En su trabajo describieron la estructura terciaria de esta P-ATPasa la cual consiste de tres dominios citoplásmicos y uno transmembranal. Lo más notable es que se han reportado las estructuras cristalográficas de distintas P-ATPasas por un sinnúmero de grupos y es evidente que se conserva la estructura en todas las enzimas de esta superfamilia, a pesar de las diferencias en secuencia, extensión y tamaño de los dominios, tamaño de la enzima, interacción con otras proteínas, o sin importar qué iones son capaces de translocar, o en su caso, lípidos (Figura 2) [Kühlbrandt, W. *et al.* 2002; Pedersen, B.P. *et al.* 2007].

### Estructura de SERCA

El dominio TM, o dominio M, está compuesto por varios segmentos transmembranales, 10 segmentos transmembranales en SERCA, los cuales conforman la cámara donde se alojan los iones a ser translocados [Toyoshima, C. *et al.* 2000; Kühlbrandt, W. 2004; Bublitz, M, *et al.* 2012]. Algunos autores sugieren que este dominio es en realidad dos dominios transmembranales, ya que los seis segmentos transmembranales que componen el poro por donde pasan los iones conforman el dominio T, este dominio es capaz de sufrir

modificaciones estructurales durante el ciclo catalítico con lo que deja expuesto o bloqueado el sitio de unión del ion a translocar. El dominio transmembranal restante está compuesto por los cuatro segmentos transmembranales restantes, los cuales forman un dominio de soporte estructural a la porción embebida en la membrana, dominio S, ya que no presenta cambios importantes en su estructura secundaria y terciaria durante el ciclo catalítico de las P-ATPasas [Palmgren, M.G. & Nissen, P 2011]. Continuando con la estructura, la mayor parte de la estructura de las P-ATPasas es la porción citosólica, la cual está compuesta por tres dominios bien definidos y estructuralmente conservados en todas las P-ATPasas [Kühlbrandt, W. 2004; Palmgren, M.G. & Nissen, P 2011]. El dominio N recibe esta denominación por la interacción con los nucleótidos, *Nucleotide-binding Domain*, es el dominio que más varía en tamaño en las distintas P-ATPasas, aunque el sitio de unión de ATP se conserva en las distintas ATPasas (Fig. 2), posee un amplio radio de giro y durante el ciclo catalítico presenta varios rearrreglos en la estructura secundaria y terciaria facilitando la interacción del dominio con el ATP,  $\text{Ca}^{2+}$ , etcétera [Kühlbrandt, W. 2004; Palmgren, M.G. & Nissen, P 2011]. En la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa el sitio de unión de ATP/ADP se encuentra en el residuo K515 (Fig. 2), además, recientemente se ha demostrado que posee sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  y la afinidad a nucleótidos es modificada por la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio [Toyoshima, C. 2000; Kühlbrandt, W. 2004; Sampedro *et al.* 2007; Palmgren, M.G. & Nissen, P 2011; Bublitz, *et al.* 2012; Páez-Pérez, E.D. *et al.* 2016; De la Cruz Torres, V. *et al.* 2020]. El dominio P, *Phosphorylation domain*, es el dominio más conservado de las P-ATPasas y es donde se encuentra el sitio activo (Fig. 2). En el motivo DKTGTLT (D351 en SERCA) es donde ocurre la autofosforilación transitoria de la enzima para llevar a cabo el transporte de iones tomando la energía de la hidrólisis de ATP [Scarborough, G.A. 1999; Kühlbrandt, W. 2004]. Finalmente, en el extremo amino terminal se encuentra el dominio A, *Actuator domain*, también este dominio es muy conservado en secuencia y en estructura en las distintas P-ATPasas. Su función principal es ser un facilitador de la interacción del dominio N con el dominio P durante el ciclo catalítico y amplificar los cambios en la estructura terciaria de la enzima [Kühlbrandt, W. 2004; Palmgren, M.G. & Nissen, P 2011]. Además, se ha propuesto que su asa, TGES, está envuelta en la defosforilación de la enzima (E-183 en SERCA). De hecho, en sí mismo este dominio es una fosfatasa unida al dominio T transmembranal [Clausen, J.D. *et al.* 2004; Kühlbrandt, W. 2004; Palmgren, M.G. & Nissen, P 2011].

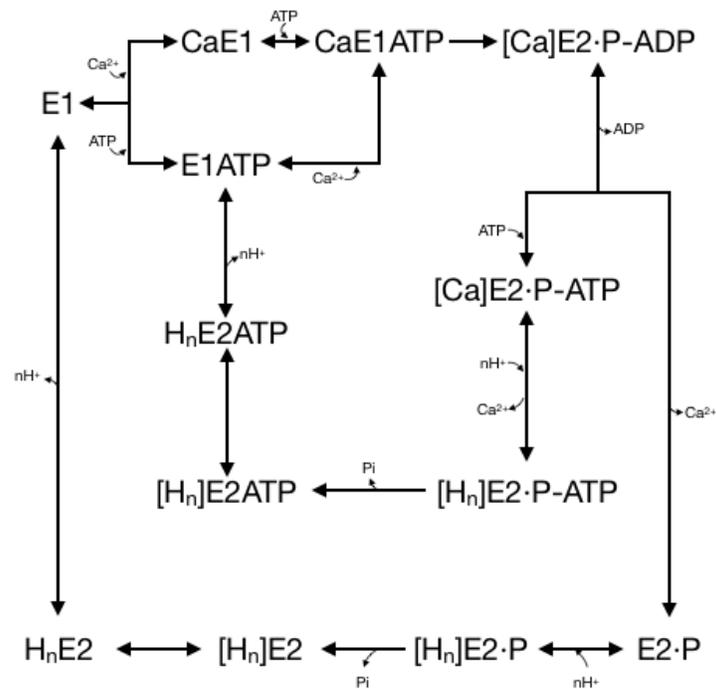


Figura 3. Diagrama Post-Albers. Descripción del ciclo catalítico de SERCA, donde los estados E1 y E2 se diferencian por distintas disposiciones de los dominios citosólicos influenciadas por la unión de  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP. En la literatura, la mayor parte de los estudios de SERCA se han centrado en la estructura de la enzima, arrestada, en distintas fases del ciclo catalítico. Gracias a esto se ha extendido el diagrama Post Albers para la actividad de las P-ATPasas (Figura 3) [Albers, R.W. 1967; Aumer, M. *et al.* 1998; Toyoshima, C. *et al.* 2000; 2004; Toyoshima, C. y Nomura, H. 2002; Abu-Abed, M. *et al.* 2004; Toyoshima, C. y Mizutani, T. 2004; Olesen, C. *et al.* 2004; 2007; Sørensen, T.L. *et al.* 2004; Obara, K. *et al.* 2005; Inesi, G. *et al.* 2006; 2008; Jensen, A-M L. *et al.* 2006; y Autri, J.M. *et al.* 2012]. Lamentablemente estos estudios solo toman en cuenta grandes cambios conformacionales de los dominios al inhibir a la enzima con distintas moléculas en ciertas configuraciones en su estructura, impidiendo observar cambios transitorios importantes de la estructura secundaria y terciaria y con ello determinar constantes de reacción, constantes de unión y cambios dinámicos puntuales.

Recientemente, se han realizado estudios más finos de los cambios estructurales del dominio N al cambiar las condiciones del entorno de la proteína. En estos estudios utilizaron la fluorescencia intrínseca del dominio N de la  $\text{H}^+$ -ATPasa (PMA1) de *Kluyveromyces lactis*

[Sampedro, J.G. *et al.* 2014]. En donde se muestra que la fluorescencia de un único residuo de triptófano (Trp) cerca del sitio de unión a ATP en el dominio N, está ligeramente expuesto al medio lo que permitió utilizar la fluorescencia de este aminoácido aromático para monitorear los cambios estructurales intradominio al exponerlo a agentes que modifican la fluorescencia intrínseca [Sampedro, J.G. *et al.* 2014]. Sin embargo, el dominio N de SERCA no posee el residuo de Trp en la posición adecuada que permita monitorear los cambios en la estructura por fluorescencia intrínseca [Páez-Pérez, E.D. *et al.* 2016]. La información dinámica intradominio de la unión de nucleótidos con el dominio N de SERCA por fluorescencia fue posible al insertar mutaciones puntuales en el dominio N (Trp552Leu y Tyr587Trp) [Páez-Pérez, E.D. *et al.* 2016]. La fluorescencia del Trp en la posición 587 sí fue modificada por la adición de nucleótidos de adenina, acrilamida, NBS y por el agente desnaturizante Gnd-HCl [Páez-Pérez, E.D. *et al.* 2016]. Interesantemente, en ese trabajo también se demostró que la constante de disociación del dominio N mutante por el ATP aumenta en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  [Páez-Pérez, E.D. *et al.*, 2016]. Este dato es de relevancia dentro de la fisiología muscular, ya que durante la relajación muscular se libera al citosol el  $\text{Ca}^{2+}$  utilizado para la contracción de las fibras musculares, y este mismo  $\text{Ca}^{2+}$  vuelve más afín a SERCA por el ATP y la recaptura de calcio al retículo sarcoplásmico es regulada de manera positiva [Páez-Pérez, E.D. *et al.*, 2016].

### Trehalosa

La trehalosa es un disacárido no reductor, formado por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace 1,1- $\alpha$  glicosídico. Este disacárido se ha encontrado en distintos organismos como agente kosmotrópico en condiciones de estrés [Jain, N.K. & Roy, I 2009]. Desde finales del siglo pasado se ha demostrado la interacción de la trehalosa con biomoléculas. De esta interacción se ha sugerido que la trehalosa protege las bioestructuras [Crowe, J.H. *et al.* 1984; 1987; Sampedro, J.G. *et al.* 1998; Anchordoquy, T.J. *et al.* 2001; Sampedro, J.G. & Uribe, S. 2004; Paz-Alfaro, K.J. *et al.* 2009]. Esta protección se ha propuesto que ocurre de tres maneras en donde invariablemente la viscosidad aumenta: Atrapamiento mecánico (vitricación), Reemplazamiento de agua y Atrapamiento de Agua [Gekko, K. & Timasheff, S.N. 1981; Green, J.L. & Angell, C.A. 1989; Crowe, J.H. *et al.* 1993]. Años después por dinámica molecular se mostró que estos tres modelos de protección pueden ocurrir al mismo

tiempo [Federov, M.V. *et al.* 2011]. En ese trabajo se formaron parches de trehalosa en algunas regiones de la proteína (lisozima) y en otras regiones la interacción de la trehalosa con la proteína estaba mediada por moléculas de agua atrapadas entre la proteína y el disacárido; así como la interacción directa de la trehalosa con la proteína estabilizando la estructura con puentes de hidrógeno. Además, la trehalosa se acumuló en regiones con asas y regiones carentes de estructura secundaria [Federov, M.V. *et al.* 2011]. Más aún, en enzimas también se han descrito efectos protectores de la actividad: protector, estabilizador y activador [Carninci, P. *et al.* 1998]. El efecto protector se describe como la preservación de la actividad enzimática sin cambios después de someter a la enzima a condiciones no favorables. El efecto estabilizador es aquel que le permite a la enzima tener actividad en condiciones donde normalmente es inactiva. Y finalmente, el efecto activador es aquel que potencia la actividad enzimática en presencia de trehalosa, aunque el efecto contrario también se ha reportado en otras enzimas [Sampedro, J.G. *et al.* 2020].

## Objetivos

### **Objetivos generales:**

- Obtener la actividad específica de SERCA en ausencia y presencia de distintas concentraciones de trehalosa
- Generar información y evidencia de los cambios en la estructura secundaria de SERCA en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y si esto también modifica la unión de nucleótidos a la enzima

### **Objetivos específicos:**

- Purificación de SERCA con alto grado de pureza por gradiente de trehalosa
- Analizar el efecto de la viscosidad en la actividad específica de SERCA
- Obtener información estructural por dicroísmo circular de SERCA, en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y nucleótidos.
- Generar versiones del gen con mutaciones puntuales estructural del dominio N modificado, propiedad del laboratorio. Estas mutaciones serán para obtener el gen estructural del dominio N de SERCA silvestre de músculo de conejo.
- Purificar el dominio N silvestre para monitorear los cambios en la estructura secundaria al adicionar  $\text{Ca}^{2+}$  y nucleótidos.

## Materiales y métodos

### **Conejo**

Para este trabajo el tejido muscular se obtuvo de conejo silvestre *Oryctolagus cuniculus*. Los animales de seis meses de edad seleccionados fueron comprados en la Unidad de Manejo Animal Tangamanga, en la ciudad San Luis Potosí, SLP. La principal motivación de la elección de un conejo silvestre, y no de una cepa comercial, fue que los datos generados en este proyecto fueran información de un organismo que se encuentra de manera natural y no seleccionado genéticamente por los seres humanos.

### **Obtención de tejido muscular**

Se encerró al animal en una caja de unicel de 39.5 x 28 x 27 cm<sup>3</sup> donde se dejaron inconscientes con una torunda de algodón parcialmente humedecido con 5 mL de isoflurano. Se sacrificaron los animales por dislocación craneal y después se corroboró la muerte del animal, por reflejo ocular y toma de pulso. Inmediatamente después se realizó un corte con bisturí en Y bilateral desde el abdomen bajo hasta el pubis. El corte se siguió hacia el fémur hasta llegar a la región distal de la tibia de ambas extremidades. Se retira la piel para exponer el tejido muscular y con ayuda de unas pinzas y el bisturí se extraen los músculos de contracción rápida de las extremidades posteriores. Inmediatamente el tejido muscular fue pesado y lavado de 2 a 3 veces con 100 mM KCl por 1 minuto.

### **Preparación de vesículas de retículo sarcoplásmico de músculo de conejo**

Después de obtener el tejido muscular y lavarlo, este fue triturado y homogenizado en 3 volúmenes de 100 mM KCl hasta que no se observen grumos de gran tamaño. La mezcla fue centrifugada a 3 000 rpm a 4 °C por 5 minutos en el rotor F1256X500. De ser necesario se realizó una segunda centrifugación a 5 000 rpm. Se retiraron los residuos y se homogenizó la muestra. El homogenizado fue centrifugado a 9 200 rpm por 15 minutos a 4 °C en el rotor F21-8X50Y y se descartaron los residuos para volver a centrifugar ahora a 16 700 rpm por 120 minutos a 4 °C. La muestra fue resuspendida en 0.5 M sacarosa y se centrifugó a 10 100 rpm por 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se diluyó hasta 0.6 M KCl, 0.15 M sacarosa y se para después centrifugar a 17 000 rpm por 165 minutos a 4 °C. La muestra se resuspendió en 0.3 M sacarosa, 0.1 M KCl y 5 mM Tris-HCl pH 7.0 y se resguardó a -72 °C.

**Purificación de SERCA** (EC 3.6.3.8, AT2A1\_Rabbit) [modificado de Sampedro, J.G. *et al.* 2007]

Se diluyeron las membranas hasta 2 mg/mL en 0.6 M KCl, 75 mM Tris, 6 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% deoxicolato, pH 7.2; y se incubó la mezcla en agitación por 10 minutos a 0 °C (hielo). La muestra se centrifugó a 100 000 g por 60 minutos a 4 °C. Se resuspendió la pastilla en < 3 mL de 0.3 M KCl, 25 mM Tris, 45% glicerol, 2 mM EDTA, pH 7.5 y se homogenizó la muestra. Se determinó la concentración de proteína con el ensayo de Lowry [Lowry, O.H. *et al.*, 1951]. Se adicionó 5 mg/mL asolectina y 0.85 (p/p) zwittergent 3-14 y se homogenizó la mezcla para después ser centrifugada a 100 000 g por 60 minuto a 4 °C. Se descartaron los residuos y la muestra se diluyó 1:2 en 2 mM EGTA pH 7.2 y se vertió en un gradiente discontinuo de concentración de trehalosa (45, 40, 35, 30% p/v) en 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 0.1% deoxicolato, 1 mg/mL asolectina, pH 7.0. Inmediatamente después de cargar la muestra sobre el gradiente se centrifugó a 100 000 g por 14 horas a 4 °C. Al terminar este paso, encima de la fracción de 30% trehalosa se observaron dos bandas blancas donde no se encontró a la enzima, por SDS-PAGE Coomassie-blue staining. Similarmente, otra banda fue observada entre las fracciones 30 y 35% trehalosa y no se encontró evidencia de la enzima de interés, por SDS-PAGE Coomassie-blue staining. También se resuspendió en 2 mM EGTA la pastilla que se formó después de la ultracentrifugación, en esta fracción sí se logró medir la actividad de ATPasa y se observó la presencia de una proteína de 110 kDa por SDS-PAGE Coomassie-blue staining. En todos los casos se calculó concentración de proteína, se realizó electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% y se midió actividad de ATPasa con el ensayo acoplado de enzimas.

**Cuantificación de proteína** [Lowry, O.H. *et al.* 1951]

Se calculó la concentración de proteína por el ensayo de Lowry. La curva de calibración se realizó con HSA (*Human Serum Albumin*) como estándar de proteína a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, y 80 µg, tomados de una solución *stock* de 1 mg/mL. La cantidad en µL de la muestra varió entre 10 y 20 µL según fue conveniente. Para la curva de calibración como para las muestras, se llevaron hasta 500 µL con agua bidestilada en tubos de ensaye de 5 mL. Después se adicionó 2.5 mL de una mezcla de 1 mL de solución 1 (0.02 M CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.034 M Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O) con 50 mL de solución 2 (0.189 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1 M NaOH). Se

homogenizó en vórtex y se dejó en reposo 10 minutos. Al término de ese tiempo se agregó a la mezcla 0.25 mL de reactivo de fenol Folin y Ciocalteu (1:2 v/v), se agitó en vórtex y se dejó en reposo 30 minutos en condiciones con poca luz. Al término de este tiempo se procedió a la medición de la absorbencia a 660 nm en el espectrofotómetro 8453UV/VIS (Agilent technologies, Shanghái, China). La concentración de proteína de la muestra fue calculada por interpolación en la curva de calibración. Cada muestra fue medida por triplicado.

### **Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida [Laemmli, U.K. 1970]**

La preparación del gel desnaturalizante (10 mL) consistió en la mezcla de 3.3 mL agua bidestilada, 4 mL 30% acrilamida (29.2 g acrilamida y 0.8 g bis-acrilamida, 100 mL), 100  $\mu$ L 10% SDS, 2.5 mL 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 100  $\mu$ L 10%  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  (APS), 4  $\mu$ L TEMED. Para la preparación del gel concentrador (4 mL) se mezcló 2.7 mL agua bidestilada, 670  $\mu$ L 30% acrilamida, 40  $\mu$ L 10% SDS, 40  $\mu$ L 10% APS, 4  $\mu$ L TEMED. La preparación del amortiguador de electroforesis, solución de tinción y solución para destañar se prepararon de acuerdo al libro *Protein methods* [Bollag, D.M. *et al.* 1996].

### **Medición de la actividad específica de ATPasa**

Se midió la actividad de ATPasa de SERCA a 37 °C con el ensayo acoplado de enzimas [Anderson, K.W. y Murphy, A.J. 1983]. El cual constó de 50 mM MOPS pH 7.0, 1 mM EGTA, 80 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 3mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM PEP, 250  $\mu$ M NADH, concentraciones crecientes de ATP desde 0.001 a 0.25 mM, 0.9075 U de lactato deshidrogenasa “LDH” de músculo de conejo (Roche) en 1 mL de la reacción y 1.504 U de piruvato cinasa “PK” de músculo de conejo (Sigma-Aldrich) en 1 mL de la reacción. La reacción se inició con la adición de 10  $\mu$ g de SERCA pura. La mezcla del amortiguador con las sales se incubó por 10 minutos a la temperatura seleccionada después de agitar en vórtex. Al término de este tiempo se adicionaron los sustratos y el cofactor y se volvió a agitar en vórtex. Solamente se dejó reposar después de la agitación el tiempo en que las enzimas fueron sacadas de refrigeración y SERCA descongelarse, aproximadamente 5 minutos. Se midió el cambio en la absorbencia a 340 nm de la mezcla sin y con enzimas, LDH y PK. Aunque, solamente se observaron cambios en la absorbencia hasta que se adicionó SERCA, comenzando la catálisis de ATP. Estas condiciones, para la ATPasa, son de estado

estacionario lo que nos indica que la variación de la concentración de ATP no cambia, ya que la reacción de la PK restituye el ATP hidrolizado por la P-ATPasa. El cambio en la absorbencia del NADH es por la acción de la LDH ya que utiliza al NADH para oxidar al piruvato.

### **Actividad de ATPasa en medios con trehalosa**

Para observar el efecto de la trehalosa en la actividad enzimática de SERCA, se siguieron las instrucciones de la “Medición de la actividad de ATPasa”. Con la diferencia que la concentración de ATP se mantuvo fija (0.25 mM) y la que se varió fue la de trehalosa (0 a 0.8 M). La reacción fue iniciada con la adición de SERCA pura y se siguió la actividad por cambios en la absorbencia a 340 nm a 25 °C. La actividad enzimática de SERCA fue calculada de la pendiente de la región lineal de cada trazo y se utilizó el coeficiente de extinción molar del NADH en  $6\ 220\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$ .

### **Dicroísmo circular de SERCA**

Para observar los cambios en la estructura secundaria de SERCA al interactuar con ATP y/o  $\text{Ca}^{2+}$  se utilizó un espectropolarímetro (J-1500 Jasco, Oklahoma, EUA) para medir los cambios en la estructura de SERCA a 25 °C. La enzima fue suspendida en amortiguador 10 mM fosfatos de potasio a pH especificado y se midieron los cambios de la elipticidad de la luz a concentraciones crecientes de ATP (0 a 0.1 mM) en presencia y ausencia de 200  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ . La longitud de onda de emisión fue 340 nm y se registró desde 260 nm hasta 190 nm con intervalos de 1 nm, ancho de banda de 1 nm, velocidad de escaneo de 50 nm/min, tres acumulaciones de datos a una concentración de 3  $\mu\text{M}$  SERCA.

### **Ensayo de marcaje de SERCA con isotiocianato de fluoresceína**

Se marcó selectivamente la enzima SERCA con isotiocianato de fluoresceína (FITC por su nombre en inglés) en el residuo K515 sitio de unión de nucleótido en el dominio N de SERCA. El ensayo fue tomado de Winters, D.L. y colaboradores (2008) que consiste una solución para permitir la reacción de FITC con SERCA (*labeling buffer*) y otra solución para evitar o detener la reacción (*stopping buffer*). El primer amortiguador consistió en 100 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 30 mM Tris-HCl pH 8.9 y fue suplementado con 3 mM  $\text{CaCl}_2$  según fue

conveniente. Y el amortiguador de paro consistió de 300 mM sacarosa y 30 mM MOPS pH 7.0 y segundos antes de parar la reacción de le adicionó 5 mM ATP a este amortiguador. Este método se siguió hasta la fase estacionaria en presencia de trehalosa (0 M hasta 0.5 M). También se realizó un análisis temporal dentro de los primeros 15 minutos en ausencia de trehalosa. Cada gel fue expuesto a radiación ultravioleta (302 nm) en un transiluminador (Cole-Parmer, Illinois, EUA) a alta intensidad. Los geles fluorescentes fueron fotografiados para su análisis y modificación digital a escala de grises.

### **Escisión del dominio N de SERCA purificada**

Se tomó del ultracongelador una alícuota de SERCA purificada (50  $\mu$ L) y se descongeló rápidamente en hielo y se tomó todo el volumen para depositarlo en un microtubo de 1.5 mL con 50  $\mu$ L del amortiguador para la escisión enfriado en hielo (10 mM fosfatos de potasio pH 7.5, 2 mM EDTA y 10 mM NaCl). En seguida se adicionó proteinasa K a razón de 0.03  $\mu$ g/ $\mu$ L de proteinasa K por cada 1  $\mu$ g/ $\mu$ L de SERCA; la proteinasa K previamente fue reconstituida en 50 mM Tris-HCl pH 8.0 y 3 mM CaCl<sub>2</sub>. La proteólisis se llevó a cabo por 30 min a 20 °C en una placa de calentamiento con pozos donde se colocaron los microtubos. Al término de este tiempo se inactivó a la proteinasa K con 0.5 mM PMSF a 0 °C y se dejó reposar la mezcla por 10 min en hielo. Para aislar el dominio N utilizamos columnas de centrifugación con la resina ADP-sepharose. El resultado de la escisión fue diluido hasta 500  $\mu$ L con el amortiguador para la escisión ya mencionado y se depositó todo el volumen en la columna para centrifugarla a 600 rpm por 60 s y se repitió el proceso. Para la elución del dominio N se utilizó el amortiguador de escisión adicionado con 250 mM NaCl o bien ATP (5, 10, 25 mM ATP). Finalmente se lavó tres veces la columna con el amortiguador de escisión y al final se lavó con agua bidestilada y para su resguardo se lavó con agua bidestilada y 0.012% azida de sodio.

### **Método de elaboración de células competentes**

Inocular 350 mL de medio LB con 3.5 mL de un preinóculo saturado (5 mL 16 h) y crecer las bacterias a 37 °C en agitación constante. Medir la densidad óptica a 600 nm cada hora hasta que la absorbencia sea de 0.2 y cada 20 min cuando la absorbencia sea >0.2. Al medir 0.4 de absorbencia, aproximadamente 3 h de crecimiento a 37 °C y 150 rpm de agitación, las

bacterias son enfriadas en hielo por 10-15 min y son agitadas gentilmente para evitar gradientes de temperatura en el medio. Desde este paso todas las soluciones y frascos con las que las bacterias serán expuestas deben estar enfriados en hielo. Al término de este tiempo de enfriamiento las bacterias son cosechadas por centrifugación a 3000 g a 4 °C por 5 min. Se lavó y resuspendió gentilmente la pastilla con 10 mL de 20 mM CaCl<sub>2</sub> + 80 mM MgCl<sub>2</sub> para volver a centrifugar a 2000 g a 4 °C por 5 min. El sobrenadante es desechado y la pastilla es lavada con 2 mL de la solución 85 mM CaCl<sub>2</sub> + 15% glicerol y después fue resuspendida gentilmente con 3 mL de la misma solución. Las células son depositadas (50 µL) en microtubos de 1.5 mL estériles pre enfriados a 0 °C para su resguardo en el ultracongelador a -72 °C.

### **Transformación de células competentes**

Las cepas de *Escherichia coli* Top10, BL21 (DE3) y 10-beta fueron transformadas con los plásmidos pUC57-NDomain, pET28a (+) y pWTSERCAND. Las células fueron descongeladas rápidamente en hielo para adicionar el plásmido. Se mezcló gentilmente y se dejó reposar por 30 min en hielo. Al cabo de este periodo, las células se sometieron a choque térmico a 42 °C por 90 s. Y se dejaron reposar por 5 min en hielo. Después se adicionó 1.5 mL de medio líquido LB y las células se dejaron crecer por 1 h a 37 °C en agitación constante (150 rpm). Para obtener las células se centrifugó a 4000 rpm por 3 min en la centrífuga 5418 eppendorf (Hamburgo, Alemania) usando el rotor FA-45-18-11. El sobrenadante fue descartado y en poco volumen de LB las células fueron resuspendidas para después ser sembradas en cajas de Petri con medio LB-agar (sólido). Las células sembradas se dejaron en incubación por 16 h a 37 °C.

### **Obtención de DNA circular:**

#### **I) Minipreparación hirviente de STET**

La obtención del material genético se llevó a cabo por mini preparación hirviente de STET y lisozima. Se dejaron crecer bacterias *E. coli* (transformadas) en medio LB líquido suplementado con antibiótico (kanamicina o ampicilina según el plásmido) por 16 h a 37 °C en agitación 150 rpm. Al término de esta incubación se tomaron 1.5 mL del medio saturado y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min en la centrífuga 5418 eppendorf (Hamburgo, Alemania)

usando el rotor FA-45-18-11. El sobrenadante fue desechado y si fue necesario el paso anterior se repitió hasta obtener una pastilla de buen tamaño. Después se resuspendieron las células en 350  $\mu$ L de STET (8% sacarosa, 0.5 % TRITON X-100, 50 mM EDTA pH 8.0. y 10 mM Tris pH 8.0) y se agregaron 25  $\mu$ L de 12 mg/mL lisozima (suspendida en 10 mM Tris pH 8.0) y se mezcló en vórtex. Inmediatamente después se somete a choque térmico por un minuto a 100 °C. El material insoluble se descartó después de centrifugar a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C. Al sobrenadante se le adicionó 1  $\mu$ L RNasa H y 4  $\mu$ L de buffer de esta enzima, cabe mencionar que para la mayoría de las veces que se hizo este protocolo este paso no se siguió porque la enzima se terminó. Posteriormente se agregaron 40  $\mu$ L de acetato de sodio al 20 % y 420  $\mu$ L de isopropanol y se mezcló todo en vórtex para después volver a centrifugar en las condiciones anteriores. El sobrenadante se desechó y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 20 min. La pastilla fue lavada con 500  $\mu$ L de 70% etanol y se dejó secar por 20 min. Finalmente se adicionaron 35  $\mu$ L de agua inyectable (PiSA, Jalisco, México) y se resuspendió la pastilla.

## **II) Lisis alcalina (Molecular cloning a Laboratory Manual)**

Similarmente para esta metodología se seleccionaron colonias únicas resultado de la siembra de células transformadas o por la inoculación con material de muestras resguardadas en 50% glicerol. En ambos casos, 5 mL de medio suplementado con el antibiótico de selección son inoculados con la bacteria transformada y se deja crecer a 37 °C por 16 h a 150 rpm de agitación. Las células son cosechadas por centrifugación a 4 500 rpm por 5 min a 4 °C en el rotor F21-8X50Y. El sobrenadante se descarta y la pastilla de bacterias es colocada en hielo se resuspenden con 100  $\mu$ L de la solución BDI (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA). Una vez que se resuspenden las células son depositadas en un microtubo de 1.5 mL enfriado. Después se adicionan 150  $\mu$ L de la solución BDII (0.2 N NaOH y 1% SDS) y se agita por inversión 5 veces hasta que aumente la viscosidad y se deja reposar en hielo por 5 min. Posteriormente se añaden 150  $\mu$ L de la solución BDIII (5 M CH<sub>3</sub>COOK, CH<sub>3</sub>COOH) y se repite la inversión del microtubo y reposo en hielo. Posteriormente se centrifuga la muestra a 14 000 rpm por 10 min (rotor enfriado previamente en el congelador a -20 °C al menos media hora). El sobrenadante es transferido a otro microtubo de 1.5 mL y los ácidos nucleicos se precipitan con 2 volúmenes de 100% etanol y 1/5 volúmenes de 3 M

CH<sub>3</sub>COONa pH 5.2. Se agita gentilmente y se deja en reposo en hielo por 40-60 min. Se vuelve a centrifugar la muestra por 10 min a 14 000 rpm en el rotor enfriado. El sobrenadante se descarta y la pastilla se lava con 200 µL 70% etanol. La pastilla se deja secar para después resuspenderla con 35 µL agua inyectable (PiSA, Jalisco, México). El material genético es resguardado a -20 °C en el congelador.

### **Cuantificación de plásmido**

De las muestras de DNA se prepararon diluciones 1:500 en agua desionizada. Se midió la absorbencia en el espectrofotómetro Agilent 8453UV/VIS (Shanghái, China) a 260 y 280 nm. Además, se calculó la pureza del plásmido con el cociente  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ . Y el cálculo de la concentración de plásmido se llevó a cabo con la siguiente ecuación:

$$\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} = \frac{(A)(X)(dil)^{-1}}{1000}$$

Donde A es la absorbencia a 260 nm, X=50 que es un factor específico para DNA de doble cadena y dil es la dilución a la que se realizó la medición.

### **Electroforesis en gel de agarosa**

Se preparó solución amortiguadora TAE 50X (50 mM EDTA, Tris 2M pH 8.5 y 1 M ácido acético glacial). De esta solución concentrada se preparó TAE 1X (50-100 mL) y se le adicionó (0.5-1 g) de agarosa. La suspensión fue homogenizada aumentando la temperatura de la solución. Se midieron 20 mL de esta solución y se le adicionó bromuro de etidio (2µL). Esta mezcla fue vertida en el soporte de la cámara de electroforesis y se colocó el peine para formar los pozos en el gel. Se preparó más TAE 1X para usarse como medio continuo conductor. Una vez cargados los pozos con las muestras preparadas se aplicó una diferencia de potencial de 70 V por 20 min. Las bandas de DNA fueron observadas al irradiar el gel con luz UV (302 nm) en un transiluminador (Cole-Parmer, Illinois, EUA).

## **Reacción en cadena de polimerasa por extensión de superposición (*Overlap extension PCR, OE-PCR*)**

Para insertar las mutaciones L522W y W587Y en el gene estructural del dominio N mutante de SERCA utilizamos los siguientes oligonucleótidos:

NDCaATPasaforward2: 5'TTAGGATCCCAGATGTCTGTGTGCAAGATC3'  
NDCaATPasareverse: 5'TTAGAATTCTCAGTCCAGCATGCCCACGAC3'  
L522W upper: 5'CCCGGCCGGTGCCCCACTCCTTGATCACGGAG3'  
L522W lower: 5'CTCCGTGATCAAGGAGTGGGGCACCGGCCGGG3'  
W587Y upper: 5'CGTCAGGTCCGTCTCGTACTCCATGAACCGGG3'  
W587Y lower: 5'CCCGGTTTCATGGAGTACGAGACGGACCTGACG3'

La primera mutación insertada fue L522W utilizando como templado el plásmido con el gene estructural del dominio N mutante de SERCA “pUC57-NDCaATPase”. Los oligonucleótidos utilizados primero fueron NDCaATPasaforward2 y L522W upper y por reacción en cadena de polimerasa, PCR insertamos la mutación. Para mutar en la cadena complementaria utilizamos los oligonucleótidos NDCaATPasareverse y L522W lower. Los resultados de estas dos amplificaciones fueron unidos por otro ciclo de PCR utilizando los oligonucleótidos NDCaATPasa. Para insertar la segunda mutación se utilizó como templado la cadena sintetizada en el paso anterior, la cual posee la primera mutación y se utilizaron los oligonucleótidos NDCaATPasaforward2 y W587Y upper para insertar para la mutación en la cadena primaria y los oligonucleótidos NDCaATPasareverse y W587Y lower para insertar la mutación en la cadena complementaria. Similarmente a la primera mutación, la segunda mutación fue sobrelapada utilizando los oligonucleótidos NDCaATPasa. El protocolo de PCR para la inserción de las mutaciones fue el siguiente cambiando solamente en los tiempos de alineamiento y extensión de la cadena de DNA.

95 °C	3 min
95 °C	25 s*
55-60 °C	30-42 s*
72 °C	20-48 s*
72 °C	3-5 min
4 °C	∞

\* Estos pasos se repitieron 27 veces de manera cíclica

### **Ensayo de restricción de DNA circular**

La digestión del material genético se llevó a cabo a 37 °C utilizando una placa de calentamiento con pozos de tamaño suficiente para colocar dentro los microtubos de 1.5 mL con la mezcla para la reacción. El procedimiento se siguió como recomienda el productor dependiendo de la o las enzimas que se utilizaron, Eco RI y Bam HI de New England BioLabs (Massachusetts, EUA) y Hind III y Xba I de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, EUA), para la digestión de los plásmidos pET-28 a (+), pGEX-2T, pWTSERCAND y pXWTSERCAND. Las reacciones fueron preparadas en microtubos de 1.5 mL estériles adicionando el volumen necesario para cada reacción de agua inyectable (PiSA, Jalisco, México), volumen necesario de la solución amortiguadora 10X de cada enzima, 0.5-6 µg de plásmido y 1-2 µL de la enzima. Para los casos de doble digestión se utilizó la solución amortiguadora Bam HI para las enzimas NEB y el amortiguador indicado para las enzimas Thermo Fisher Scientific.

### **Purificación del plásmido lineal digerido con Bam HI y Eco RI**

El DNA digerido fue visualizado en un gel de agarosa 1X o 2X irradiado por luz UV para escindir la banda única de interés. La cual fue depositada en un microtubo de 1.5 mL estéril y se calculó la masa del gel. La purificación del plásmido se llevó a cabo como se indica en el instructivo del kit “QIAquick® Gel Extraction Kit (50) Cat. No. 28704” hasta la elución del DNA de interés con 18-30 µL de agua inyectable.

### **Reamplificación del gene estructural del dominio N silvestre de SERCA**

Para obtener más DNA codificante para el dominio N de SERCA silvestre se volvió a realizar una PCR con 2  $\mu$ L del producto de la etapa final de *Overlap Extension PCR* utilizando los oligonucleótidos NDCaATPasafoward2 y NDCaATPasareverse con el siguiente protocolo de temperaturas:

95 °C	5 min
95 °C	1 min*
55-60 °C	1 min*
72 °C	1 min*
72 °C	15 min
4 °C	$\infty$

\* Estos pasos se repitieron 30 veces de manera cíclica.

### **Purificación del gene estructural del dominio N silvestre de SERCA producto de PCR**

El producto de PCR reamplificado fue purificado como se indica en el instructivo del kit “QIAquick® PCR Purification Kit (50) Cat. No. 28104” hasta la elución del gene estructural de SERCA con 18  $\mu$ L de agua inyectable.

### **Reacción de ligación**

El gene estructural del dominio N de SERCA fue insertado en un plásmido pGEX-2T por reacción de ligación con la ligasa T4 aislada de *E. coli* New England BioLabs (Massachusetts, EUA). La reacción de ligación se llevó a cabo en microtubos de 1.5 mL esterilizados adicionando el volumen necesario de agua inyectable (PiSA, Jalisco, México), solución amortiguadora 10X de la T4 ligasa, 6  $\mu$ g plásmido pGEX-2T previamente digerido con Bam HI y Eco RI, 7  $\mu$ g del gene estructural del dominio N silvestre “WTSERCAND” y finalmente 0.2  $\mu$ L de la T4 ligasa. Cada uno de los microtubos fue colocado en la placa de calentamiento a 22 °C para la reacción de ligación e inmediatamente se calentaron a 65 °C por 20 min para inactivar a la enzima.

### **Método de elaboración de células competentes BL21 Y TF2**

Inocular 350 mL de medio SOB (5 g triptona, 1.75 g extracto de levadura, 0.175 g NaCl, 0.0651 KCl, 0.333 g MgCl<sub>2</sub> y 0.421 g MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O) con 3.5 mL de un preinóculo de medio LB saturado (5 mL 16 h) y crecer las bacterias a 37 °C en agitación constante. Medir la densidad óptica a 600 nm cada hora hasta que la absorbencia sea de 0.2 y cada 5-20 min cuando la absorbencia sea cada vez más cercana a 0.4 UA. Al medir 0.4 de absorbencia, aproximadamente, 3 h de crecimiento a 37 °C y 150 rpm de agitación, las bacterias son enfriadas en hielo por 20 min y son agitadas gentilmente sin retirarlas del hielo cada cierto tiempo. Desde este paso todas las soluciones y frascos con los que las bacterias serán expuestas deben estar enfriados. Las bacterias son cosechadas por centrifugación a 3 000 rpm a 4 °C por 15 min la pastilla se lava y se resuspende gentilmente con 15 mL de 100 mM CaCl<sub>2</sub> y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Nuevamente la pastilla se resuspende, pero ahora con 15 mL de 20 mM CaCl<sub>2</sub> y 80 mM MgCl<sub>2</sub> para volver a centrifugar en las condiciones anteriores. El sobrenadante es desechado y la pastilla es lavada con 5 mL de 85 mM CaCl<sub>2</sub> y 15% glicerol para después resuspender gentilmente y volver a centrifugar. La pastilla final se resuspende cuidadosamente con 2.5-3 mL de 85 mM CaCl<sub>2</sub> y 15% glicerol. Finalmente, las células son depositadas en microtubos de 1.5 mL estériles pre enfriados para su resguardo en el ultracongelador; cada alícuota de 50 µL.

### **Transformación de células competentes BL21 Y TF2 con pWTSERCAND**

Anteriormente en el laboratorio ya se ha desarrollado una metodología para la expresión del dominio N de SERCA con dos mutaciones puntuales haciendo uso de una cepa de *E. coli* GroEL/GroES la cual es capaz de sintetizar proteínas chaperonas [Páez-Pérez, E.D. 2015]. Estas proteínas chaperonas ayudan al correcto plegamiento del dominio N durante la traducción, evitando la formación de cuerpos de inclusión con la proteína de interés. En el caso de este proyecto se siguió esta metodología, pero con la cepa de *E. coli* BL21 Y TF2. Dicha cepa de bacterias fue transformada con 0.5 µL del plásmido pXWTSERCAND como se enuncia en la metodología de transformación. Se seleccionó el tubo #2 de las colonias analizadas ya que en este se obtuvo mayor rendimiento en la producción de pXWTSERCAND. De las colonias formadas se seleccionaron siete y se dejaron crecer en 5 mL de medio LB con 34 µg/mL cloranfenicol y 100 µg/mL ampicilina por 18 horas a 37 °C

a 150 rpm de agitación. Una de estas fue seleccionada de manera aleatoria para la expresión de la proteína de interés.

### **Expresión del dominio N de SERCA**

De las bacterias ya transformadas se hicieron gliceroles (50%) de los cuales se toma un poco con un palillo de madera esterilizado. El palillo es depositado en un tubo cónico de 50 mL con 10 mL de medio LB suplementado con 34  $\mu\text{g/mL}$  cloranfenicol y 100  $\mu\text{g/mL}$  ampicilina. Estos dos antibióticos son para seleccionar células que tengan los plásmidos para las proteínas chaperonas y para el dominio N de SERCA. Las células son crecidas a 37 °C por 18 horas a 150 rpm. A un matraz de 500 mL con 100 mL de medio LB se le adicionan 3 mL del preinóculo. Este medio LB además de 34  $\mu\text{g/mL}$  cloranfenicol, 100  $\mu\text{g/mL}$  ampicilina se le adicionó 5 ng/mL tetraciclina para inducir la expresión de las proteínas chaperonas. Se vuelve a incubar el medio a 37 °C a 150 rpm por cerca de 3 horas. A partir de las 2 horas se monitorea la absorbencia del medio a 600 nm hasta que la densidad óptica sea de 0.6, valor se alcanza cerca de las 3 horas. Una vez alcanzado este valor se adiciona al medio 0.5 mM IPTG y se incuba a temperatura ambiente en agitación constante por 18 horas. Pasado este tiempo las células son cosechadas por centrifugación a 7000 rpm por 10 min a 4 °C en rotor F21-8X50Y la pastilla se resguarda en el ultracongelador para su posterior lavado y purificación del dominio N.

### **GSTrap HP regeneración de la columna**

La limpieza y regeneración de la columna se siguió como se especifica en el instructivo de la columna. La remoción de sustancias precipitadas o desnaturalizadas y sustancias unidas hidrofóbicamente a la columna se lleva a cabo en dos pasos. Primero se lava la columna con 2 volúmenes de columna de 6 M cloruro de guanidinio (Gnd-HCl) e inmediatamente después se lava con 5 volúmenes de PBS pH 7.3. Después de esto la columna se lava con 4 volúmenes de 70% etanol e inmediatamente después se pasan 5 volúmenes de PBS pH 7.3. Para almacenar la columna se pasan 3 volúmenes de 20% etanol y se resguarda la columna a 4 °C. Hace falta remarcar que todas las soluciones acuosas fueron filtradas y degasificadas. PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

### **Purificación del dominio N de SERCA**

La pastilla de bacterias cosechadas anteriormente fue resuspendida en 8 mL de amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0 y 0.3 M NaCl) utilizando un pistilo con punta de teflón. Una vez resuspendida la pastilla y homogenizada se adiciona 0.25 mg/mL lisozima y 5 mM PMSF. Se homogeniza rápidamente e inmediatamente después la muestra se sonica con amplitud de 50% por 15 s diez veces con 59 s de reposo entre cada pulso. La muestra en todo momento está rodeada de hielo para evitar la degradación de proteínas por aumento de la temperatura. El lisado celular se centrifuga a 15 000 rpm por 30 min a 4 °C. La pastilla se descarta y el sobrenadante, vertido previamente en un tubo cónico, es tomado con una jeringa para filtrarlo con filtros tipo pirinola es de 0.22 µm, esto con el fin de eliminar material sólido en la muestra que pueda perjudicar el funcionamiento de la columna GStrap HP. Después, a la parte superior de la columna se conecta un adaptador para poder anclar una jeringa a la columna (evitando introducir aire). La columna es equilibrada con 5 volúmenes del amortiguador de unión (PBS, pH 7.3: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). A continuación de esto el sobrenadante de las células lisadas fue inyectado a la columna GStrap HP a 3 mL/min. Se lava con 5 volúmenes de amortiguador de unión a 3 mL/min. La proteína fusión se eluye con 3 volúmenes de amortiguador de elución (50 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 10 mM glutatión reducido) a flujo de 3 mL/min. Se recupera el efluente separando cada volumen de columna para su análisis.

### **Operación de la columna de desalado PD10 para cambiar de amortiguador**

La columna PD10 se lava con 4 volúmenes de columna (1 volumen de columna = 5 mL) de agua bidestilada, filtrada y degasada. Después de esto la columna se equilibra con 5 volúmenes de columna con el amortiguador de interés, en nuestro caso amortiguador de digestión (50 mM Tris-HCl, pH 8 y 10 mM CaCl<sub>2</sub>) y amortiguador de lisis celular (50 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 0.3 M NaCl). Una vez que el menisco del amortiguador entra a la columna se adiciona la muestra de proteína con volumen final de 1.5 mL. Al observar que no hay flujo se adicionan 5.6 mL de amortiguador de elección a la columna y se colectan las fracciones. Originalmente cada fracción fue de 800 µL a 1 mL, pero se hizo más eficiente la colecta con 1.5 mL fracción 1, ~750 µL fracción 2, 1.5 mL fracción 3, 500 µL fracción 4 y las demás de 1 mL o hasta que para el flujo de la columna. Inmediatamente se debe lavar la columna con

4 volúmenes de columna de agua bidestilada, filtrada y degasada. Finalmente, la columna es puesta en 20% etanol al lavar con 2 volúmenes de columna y se adicionan 3 mL de 20% etanol antes de cerrar la columna y sellarla con Parafilm y resguardarla a 4 °C.

### **Digestión de GST-WTSERCAND con Thrombin CleanCleave™ kit**

En la información del fabricante se especifica que la muestra de proteína fusión debe estar en amortiguador de digestión (50 mM Tris-HCl, pH 8 y 10 mM CaCl<sub>2</sub>). La resina de trombina-agarosa se resuspende hasta homogenizar la solución, inmediatamente se toman 100 µL y en un microtubo se centrifugan a 2500 rpm por 5 min y se descarta el sobrenadante con una pipeta. Adicionar 500 µL de amortiguador de digestión y resuspender gentilmente invirtiendo el tubo varias veces y se vuelve a centrifugar a 2500 rpm por 5 min y se descarta el sobrenadante. El paso anterior se repite una vez más para poder iniciar con la preparación de la solución de digestión. Se adiciona la muestra al microtubo con las esferas de trombina-sefarosa y si es necesario se lleva el volumen hasta 1 mL con agua o amortiguador de digestión. La reacción de digestión se incuba a temperatura ambiente en agitación constante por 24 horas continuas para GST-WTSERCAND. Para recuperar la muestra se centrifuga la mezcla a 2500 rpm por 5 min y tomar el sobrenadante con pipeta. Para aumentar la cantidad de proteína recuperada se resuspende la resina en un volumen igual de amortiguador de digestión y se centrifuga y se toma el mayor volumen posible y se suma al primer sobrenadante.

### **Purificación del dominio N de SERCA**

Después de la digestión de la proteína fusión la muestra es pasada por la columna PD10 para cambiar el amortiguador en donde está suspendida a amortiguador de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 0.3 M NaCl) y se observa la presencia de las proteínas con 12% SDS-PAGE. La fracción con mayor cantidad de proteínas es inyectada a la columna GSTrap HP equilibrada con amortiguador de unión. El dominio N es recuperado en los primero 500 µL del lavado 1 con PBS. Las proteínas afines a glutatión, GST y GST-WTSERCAND, se observan en la elusión 1 y poco en la elusión 2 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 10 mM glutatión reducido). El dominio N es cambiado de amortiguador al utilizar un centricon tipo microtubo (0.5 mL) al

centrifugar la muestra 5 min a 14 000 g (12753 rpm). El amortiguador final donde se encuentra el dominio N de SERCA es 10 mM fosfatos de potasio, pH 8.0.

### **Regeneración de Thrombin CleanCleave™ kit**

Se regeneró la resina del kit como lo indica el fabricante. Enjuagar la resina con un volumen igual de 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 con 500 mM NaCl. Inmediatamente después se lavó la resina con un volumen igual de 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 y este paso se repitió dos veces más. Para finalizar, la resina se lavó y para resguardar como suspensión al 50% se lavó con 50% glicerol, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0. La resina se resguardó en refrigerador hasta su uso.

### **Cinética enzimática de piruvato cinasa de *Geobacillus stearothermophilus***

La actividad de piruvato cinasa “PK” fue monitoreada a 340 nm por la oxidación de NADH mediante un ensayo acoplado de enzimas [Lovell, S.C. et al 1998] Las cinéticas enzimáticas se llevaron a cabo a 30 °C ya que a esta temperatura a la que se ha reportado la actividad de piruvato cinasa [Lovell, S.C. et al 1998]. La reacción se llevó a cabo en amortiguador de 50 mM imidazol pH 7.2 a 30 °C. Los reactivos para la cinética fueron 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 6 mM ADP, 0.25 mM NADH, 1 U de LDH de músculo de conejo (Roche), 0.2 U PKGs (Sigma-Aldrich) y PEP desde 0.125 a 5 mM. Además, cuando se indicó se adicionó a la mezcla 6 mM fenilalanina y/o 0.6 M trehalosa. El volumen final de la reacción fue de 2 mL y se incubó por 15 min a 30 °C la mezcla con todos los reactivos a excepción de las enzimas. Se adicionó la LDH y se monitoreó el cambio de la absorbencia. Finalmente, se adicionó PKGs para iniciar la reacción y observar cambios en el espectro de absorbencia de las muestras.

## Resultados y discusión

### Estructura y Función de SERCA

Al inicio del programa se aprendió a manipular, sacrificar y extraer músculo de contracción rápida de conejo, *Oryctolagus cuniculus*. Los animales fueron adquiridos de la Unidad de Manejo Animal Tangamanga (INE/CITES/DGVS-ZOO-E0055-SLP-98). Los criterios de inclusión fueron edad, peso, sexo (macho), buena salud y que los animales no hayan sufrido alguna pérdida orgánica o atrofia muscular. Los animales fueron recogidos en la mañana del día del sacrificio. Una vez en el laboratorio y para evitar más estrés los animales dentro de una jaula grande tapada con una tela son dejados por poco más de una hora y hasta que los materiales, soluciones y el espacio de trabajo fueron preparados. Para el sacrificio, el animal estuvo expuesto al anestésico volátil isofluorano (3 mL) dentro de una caja de unicel (39.5 X 28 X 27 cm<sup>3</sup>) hasta que se aseguró la inconciencia. Inmediatamente se tomó al animal para colocarlo en el espacio de trabajo para la obtención del tejido muscular. La finalización fue realizada por dislocación craneal y se confirmó la muerte por toma de pulso y revisión de reflejo ocular. Inmediatamente después se comenzó con la extracción de los músculos de las patas traseras. Los músculos de contracción rápida se diferencian por una coloración más opaca en comparación con los de contracción lenta, esta diferencia es evidente a simple vista y es la mayor proporción de los músculos de las patas. El tejido muscular fue pesado y lavado dos veces como se describe en métodos y se comenzó con el protocolo de preparación de vesículas de retículo sarcoplásmico y al final se calculó la cantidad de proteínas en cada fracción. Las distintas fracciones solubles y precipitados se cargaron (20 µg) en un gel desnaturizante SDS-PAGE y la fracción con SERCA fue resguardada a -72 °C en alícuotas de 1 mL (Fig. 1). A una muestra representativa diluida de la fracción de retículo sarcoplásmico se le sometió a un ensayo de Lowry para calcular la cantidad de proteína para el procedimiento de purificación de SERCA, para visualizar el rendimiento de la obtención de retículo en geles, medición de actividad enzimática y para determinar la cantidad total de proteína obtenida por animal. Aproximadamente, por animal (ambas patas traseras) se obtienen aproximadamente 70 g de tejido muscular de los cuales se recuperan entre 30 a 33 mg/mL de retículo sarcoplásmico (proteína) estimado por ensayo de Lowry en poco más de 3 mL finales.

Como el objetivo principal de este proyecto fue el estudio de la SERCA, las vesículas y hojas de membrana de retículo sarcoplásmico solo se les midió la cantidad de proteína por el ensayo de Lowry, electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida y actividad enzimática (ATPasa). Lo anterior para corroborar la presencia de la enzima de interés en cantidad y actividad característica como control de calidad de la muestra para continuar con la purificación de SERCA. La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa fue purificada al adaptar el protocolo de purificación de la  $\text{H}^{+}$ -ATPasa de membrana plasmática de levaduras (*Kluyveromyces lactis*) [Sampedro J.G. *et al* 2007], la adaptación del método de purificación de SERCA se siguió como se describe en Materiales y Métodos. Este protocolo permite separar a las P-ATPasas de otras proteínas, todas embebidas en membranas, mediante un gradiente discontinuo de trehalosa. La mayoría de las proteínas solubles son descartadas durante el procedimiento de obtención de vesículas de retículo sarcoplásmico, para después solubilizar las proteínas de membrana con detergentes suaves y fosfolípidos. En el caso de SERCA, se siguió el protocolo original (Sampedro J.G. 2007) hasta la tercera ultracentrifugación. Ya que después de la ultracentrifugación de 14 horas se observaron dos halos blanquecinos por encima de la marca de 30 % de trehalosa. Ambos fueron recuperados con ayuda de una bomba peristáltica, así como el líquido entre estas bandas. También se recuperó una franja transparente en la marca de 35% de trehalosa con distinto índice de refracción que el líquido restante del gradiente de trehalosa. La determinación de proteína de estas bandas y su posterior visualización en gel desnaturizante no mostraron evidencia de proteínas (Fig. 2). En el caso de PMA1, la enzima se encontraba invariablemente en los halos suspendidos en el gradiente de trehalosa en gran cantidad, pero en el caso de SERCA la enzima se encontró en la pastilla formada después de la ultracentrifugación en todas y en cada una de las ocasiones que se realizó este procedimiento (Fig. 2). Esta pastilla es pequeña de aspecto transparente, amarillenta y compacta se resuspende suavemente, pues el uso de una pipeta para resuspender la pastilla induce la desnaturización de las P-ATPasas por la turbulencia generada durante este proceso mecánico. Si bien es sencillo resuspender la pastilla, este procedimiento tiene que realizarse gentilmente con un pincel de pelo de camello tamaño 4 en un volumen pequeño de amortiguador B en baño de hielo (0 °C). El protocolo original dicta una última ultracentrifugación de 3 horas, pero para SERCA esta fue descartada ya que la cantidad de proteína aislada es suficiente para realizar bastantes experimentos (Fig. 2), además que la

actividad enzimática se pierde cuando se llevó a cabo este último paso (desnaturalización de la enzima por la dilución de la trehalosa en la solución lo que provoca la pérdida de la propiedad su kosmotrópica). Esto fue evidente por ausencia de actividad enzimática de SERCA purificada con el protocolo original, pero en geles SDS-PAGE y determinación de cantidad de proteína se corroboró la purificación de la enzima y con suficiente cantidad para los experimentos (datos no mostrados). Con este protocolo adaptado para SERCA el volumen final de la enzima purificada es de 1 a 1.5 mL que fueron separados en alícuotas de 50  $\mu$ L y se resguardaron a -72  $^{\circ}$ C hasta su uso. Una fracción representativa fue tomada para determinar la cantidad de SERCA por ensayo de Lowry y su posterior visualización en geles de poliacrilamida, así como para determinar su actividad enzimática (datos no mostrados).

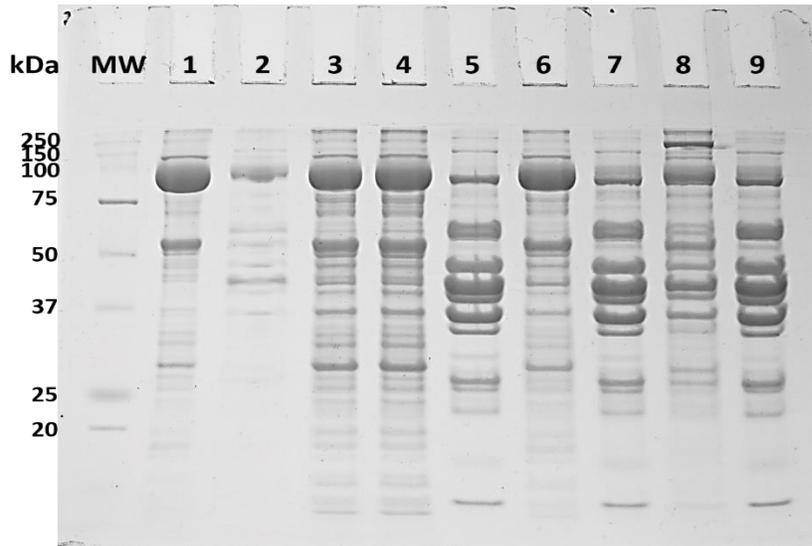


Figura 1. Obtención de retículo sarcoplásmico. La obtención del organelo desde tejido muscular fresco se llevó a cabo como se menciona en métodos y cada paso de este procedimiento se muestra en el gel desnaturizante. Carril MW: Marcador de peso molecular. Carril 1: Fracción de vesículas y hojas de membrana retículo sarcoplásmico. Carriles 2-9: Fracciones de sobrenadantes y pastillas de las etapas de la purificación de retículo sarcoplásmico.

Una vez que se determinó la cantidad de proteína y se visualizó por SDS-PAGE, se procedió a corroborar que la enzima purificada es en efecto SERCA y que esté correctamente plegada después de ser solubilizada y sometida al protocolo de purificación. El primer indicio en la

dirección correcta es el tamaño de la proteína de la banda enriquecida después del procedimiento de purificación, ya que corresponde con el tamaño esperado para SERCA (110 kDa). Normalmente, para demostrar la identidad de una proteína se utiliza la técnica de *Western-blot*, ya que el uso de anticuerpos específicos para la proteína de interés hace que la evidencia sea contundente, aunque no nos brinda información del plegamiento de la proteína. En nuestro caso, no pudimos realizar el *Western-blot* pues no se contó con un anticuerpo específico para SERCA1a que funcionaría como anticuerpo primario. En vez de esto, desde el siglo pasado se sabe que la molécula derivada de la fluoresceína: FITC (isotiocianato de fluoresceína), es un potente inhibidor de la bomba de sodio (NKA) y de SERCA. Esta molécula compite por el sitio de unión de nucleótidos y uniéndose a este covalentemente demostrado por los experimentos de Pick U. & Bassilian S. (1981). Además, esta molécula es fluorescente y ha sido utilizada para marcar selectivamente proteínas globulares que poseen un residuo de lisina parcialmente expuesto. Caso como el dominio N de SERCA, cuyo marcado ha sido reportado anteriormente por distintos grupos tanto en enzima completa como en dominio N único [Winters, D.L. *et al.* 2008; Autry, J.M. *et al.* 2012; Páez-Pérez, E.D. *et al.* 2016, De la Cruz-Torres, V. *et al.* 2020]. Por lo anterior, utilizamos esta molécula capaz de marcar de manera específica a SERCA en nuestras muestras asiladas. El procedimiento empleado se tomó de varias referencias resultando en un protocolo adecuado a nuestros intereses [Winters, D.L. *et al.* 2008; Autry, J.M. *et al.* 2012; Páez-Pérez, E.D. *et al.* 2016]. El marcado fue realizado para 20  $\mu$ g de SERCA incubados en presencia de FITC durante 7, 10 y 15 minutos en completa oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con la adición del amortiguador de paro de reacción, 1:1 (v/v), y se dejó en hielo por 5 minutos. Inmediatamente, se adicionó el amortiguador de carga para SDS-PAGE y se realizó la electroforesis. Al término de esta, los geles brillantes fueron documentados al irradiarlos con luz UV mostrando con brillo verde el complejo FITC unido a la proteína. La proteína aislada fue marcada casi en su totalidad (Fig. 3) demostrando que SERCA ha sido aislada con su estructura y plegamiento correctos desde tejido muscular de conejo.

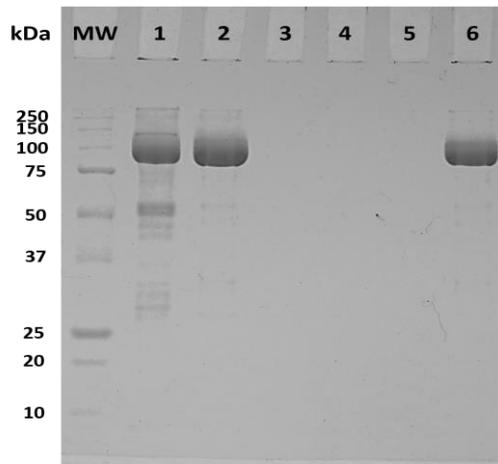


Figura 2. Purificación de SERCA. La purificación de SERCA se llevó a cabo por la implementación del método descrito por Sampedro, JG y cols. 2007 para PMA1. En este procedimiento se utiliza la trehalosa como agente estabilizante durante la purificación, así como agente para separar por densidad. En los carriles 1 y 2 se muestra la diferencia entre las proteínas de retículo sarcoplásmico y el aislamiento de SERCA. Los carriles 3-6 son fracciones del gradiente de trehalosa como halos y pastilla.

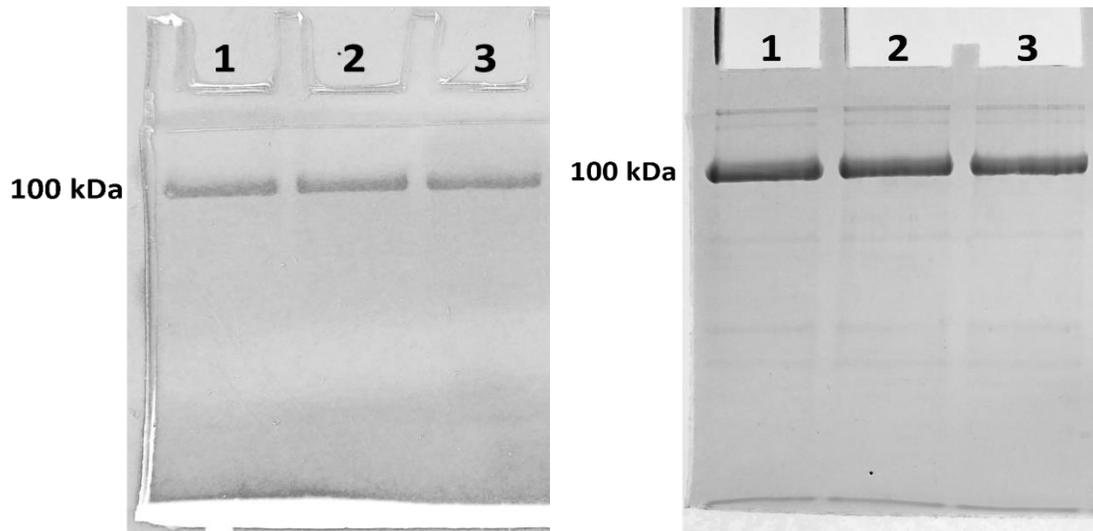


Figura 3. Marcaje con FITC. Izquierda: SERCA fue marcado selectivamente con FITC para corroborar su identidad así como su correcto plegamiento. Los carriles muestran el procedimiento de marcaje a los 15, 10 y 7 minutos mostrando nulas diferencias en el tiempo de reacción. Derecha: Mismo gel teñido con azul brillante de Coomasie.

Al demostrar el correcto plegamiento del dominio N de SERCA se llevó a cabo la medición de la actividad enzimática de la proteína purificada. La medición se llevó a cabo por el ensayo acoplado de enzimas [Anderson, K.W. & Murphy, A.J. 1983; Sampedro, J.G. *et al.* 2002], el cual consta de la actividad en conjunto de las enzimas lactato deshidrogenasa, piruvato cinasa y SERCA purificada. La relación de la catálisis entre estas enzimas es de 1:1:1 por lo que la determinación de actividad no tuvo que corregirse por algún factor. La medición de la actividad se llevó a cabo a baja temperatura (25 °C) para observar con mayor detalle el efecto de la viscosidad en la actividad enzimática. Contraintuitivamente, la actividad de SERCA en medios con mayor viscosidad aumentó en condiciones saturantes de sustrato, 0.25 mM ATP, (Fig. 4). Esto se debe hacer notar, pues la teoría de Kramers [Kramers, H.A. 1940] predice que las reacciones químicas, y enzimáticas, son afectadas negativamente con el aumento de la viscosidad del medio en que estas ocurren, como sí se observa en H<sup>+</sup>-ATPasa de *Kluyveromyces lactis* [Sampedro, J.G. *et al.* 2002, 2020; Sampedro, J.G. & Uribe, S. 2004; Uribe, S. & Sampedro, J.G. 2003]. Sin embargo, una de las hipótesis de la interacción de la trehalosa con las biomoléculas enuncia que este disacárido envuelve a las biomoléculas. Y por la formación de puentes de hidrógeno el plegamiento de proteínas se ve influenciado disminuyendo sus grados de libertad [Federov, M.V. *et al.* 2011]. Por lo que se ha propuesto la hipótesis que para ciertas enzimas esta interacción favorece la formación de la estructura de la enzima apropiada para la catálisis y/o afinidad [Carninci, *et al.* 1998; Paz-Alfaro *et al.* 2009; Sampedro, J.G. *et al.* 2002]. Cabe mencionar que este efecto fue observado a 25 °C, pero cuando se llevó a cabo a 30 °C no se observó influencia positiva o negativa, ya que las velocidades en condiciones saturantes de sustrato calculadas se mantuvieron iguales sin importar la viscosidad del medio (datos no mostrados).

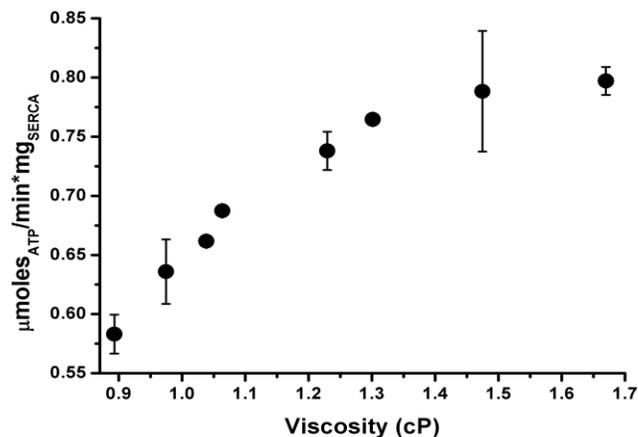


Figura 4. Efecto de la viscosidad en la actividad en condiciones saturantes de ATP (0.25 mM). Para observar la actividad de la enzima purificada se realizaron ensayos de actividad a 25 °C para observar más fácilmente algún efecto en la actividad causada por la viscosidad. Se observó un patrón hiperbólico dependiente de la viscosidad del medio lo que es opuesto lo esperado por la teoría de Kramers.

Finalmente, con la información estructural indirecta y la actividad enzimática dependiente de ATP y presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  se tuvo la certeza de que la enzima estudiada es SERCA. Con esto se procedió a la medición de la estructura secundaria de SERCA en presencia y ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP por dicroísmo circular (DC). Los experimentos se realizaron a 25 °C con 3  $\mu\text{M}$  de SERCA (determinado por absorbencia a 280 nm). Experimentos recientes en el laboratorio con DC se observaron los cambios de la estructura secundaria del dominio N mutante de SERCA en función de la concentración de ATP en el medio [Páez-Pérez, E.D. *et al.* 2016]. La estructura secundaria de SERCA ha sido reportada anteriormente y algunos autores concluyen que la estructura secundaria no presenta cambio significativos o evidentes con la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP [Csermely, P. *et al.* 1987; Shivanna, B.D. & Rowe, E.S. 1997]. Notablemente, en este trabajo la diferencia en los espectros se encontró en  $\lambda=225$  nm (Fig. 5). Longitudes de onda en DC similares a esta anteriormente se ha relacionado con la estructura del dominio N de SERCA: 218 nm [Páez-Pérez, E.D. *et al.* 2016], 222 nm [Abu-Abed, M., *et al.* 2004] y 223 nm [Shivanna, B.D. & Rowe, E.S. 1997]. Más aun, en este trabajo la franja de 225 nm se modificada por la adición escalonada de ATP ( $\mu\text{M}$ ), concentraciones similares en los ensayos de cinética enzimática (Fig. 5).

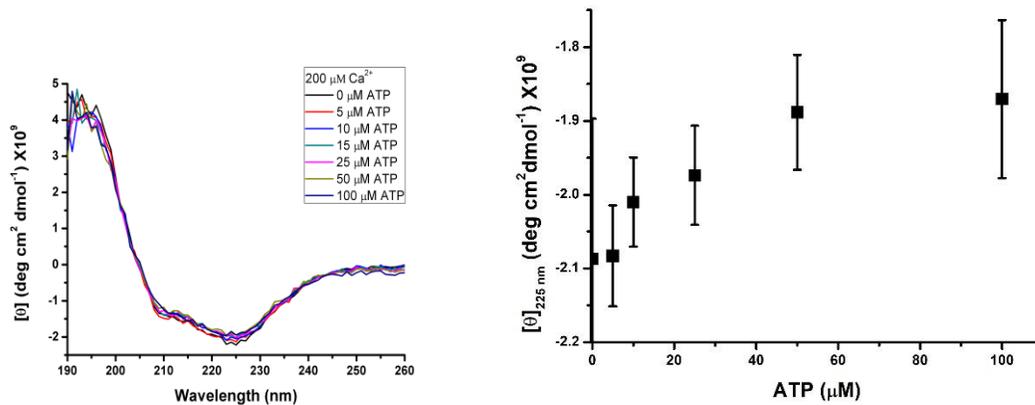


Figura 5. Dicroísmo circular de SERCA. Los espectros de dicroísmo circular son presentados como imágenes representativas. Izquierda. Cambios con la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  fueron nulos, aunque, pequeños cambios fueron observados a 225 nm, similar a lo reportado por Abu-Abed (2004) y Páez-Pérez (2016). También se muestra un gráfico de los cambios a 225 nm con la adición de ATP (Derecha). Estos cambios muestran un gráfico hiperbólico como respuesta a la saturación de ATP.

La medición de la estructura secundaria de SERCA purificada mostró la forma del espectro de DC muy parecido a los ya reportados entre los 80's y 90's del siglo pasado [Csermely, P. *et al.* 1987; Shivanna, B.D. & Rowe, E.S. 1997]. Sin embargo, los espectros DC obtenidos mostraron una débil modificación estructural con la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por el contrario, la adición de ATP a concentraciones más altas mostró cambios en el espectro DC a 225 nm. Similar a la longitud de onda reportada al titular el dominio N mutante [Páez-Pérez, E.D. *et al.* 2016]. Estas variaciones fueron representadas como función de la concentración de ATP (Fig. 5). Sorprendentemente, la titulación con ATP mostró una saturación hiperbólica en 225 nm lo que se relacionó con la unión del nucleótido al dominio N de SERCA como ya había sido publicado por Páez-Pérez ED y cols. (2016) para el dominio N mutante.

Con todo lo anterior concluimos que SERCA fue purificada desde músculo de conejo y presenta actividad enzimática, sensibilidad a ATP,  $\text{Ca}^{2+}$  y FITC con lo que se demostró que la estructura no fue comprometida por el proceso de purificación. Además, la viscosidad dependiente de trehalosa modifica la velocidad de la reacción de SERCA por lo que la interacción del disacárido con la enzima no es estable y esto nos permitió realizar experimentos de viscosidad y actividad específica. Para esto, se midió la actividad enzimática con el ensayo acoplado de enzimas a 37 °C a concentraciones crecientes de ATP. Para el aumento de la viscosidad del amortiguador donde se llevaron a cabo se utilizó trehalosa disuelta en el mismo amortiguador a una concentración 1 M. Las concentraciones de trehalosa usadas fueron desde la ausencia del disacárido hasta 0.8 M. En todas las condiciones probadas la actividad mostró una curva hiperbólica de saturación a ATP (fig. 6). Cada curva se ajustó a la ecuación de Michaelis-Menten para determinar la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) y la afinidad por ATP ( $K_s$ ). Tras analizar cada curva se observó el efecto de la viscosidad en la afinidad por el ATP que se ajusta a la teoría de Kramers, pero no se observaron efectos claros en la  $V_{max}$  (fig. 6). El efecto sobre la afinidad visualizado en la figura 8 muestra que la afinidad es afectada negativamente por el aumento de la viscosidad del medio. Este cambio de la afinidad mostró una dependencia lineal al aumento de la viscosidad y se hipotetiza que esto es ocasionado por la disminución de los grados de libertad espaciales del dominio N, ya que anteriormente se reportó que este dominio posee movimiento durante la etapa E1 del ciclo catalítico, o bien, que la red de trehalosa que envuelve a la enzima e interacciona con esta por puentes de hidrógeno obliga al dominio N a tomar un arreglo tridimensional el cual no es óptimo para la unión del nucleótido. Aunque, este impedimento en la unión del nucleótido no afecta la velocidad de la reacción con nuestros datos. Similarmente, se realizó el gráfico Lineweaver-Burk para determinar el tipo de inhibición. Ese gráfico es notorio pues la intercepción de los ajustes ocurre en el cuadrante I lo que sugiere una inhibición competitiva parcial especial, por la misma característica del gráfico (fig. 6).

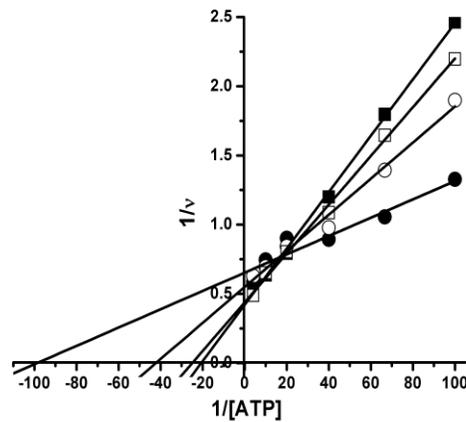
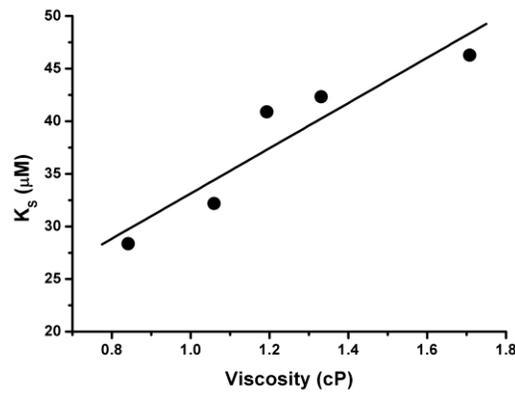
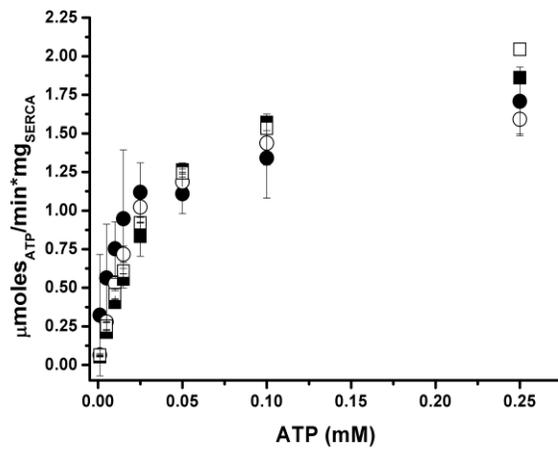


Figura 6. Cinética enzimática de SERCA. (A) La curva de saturación de ATP mostró ser hiperbólica con lo que se ajustaron los datos a la ecuación de Michaelis-Menten. El efecto sobre la afinidad se muestra en el panel B el cual es lineal con el aumento de la viscosidad. (C) regráfico Lineweaver-Burk para inferir el tipo de inhibición de SERCA por la viscosidad.

## Dominio N de SERCA silvestre

Por motivos fuera de nuestras posibilidades de negociación, se pausó este proyecto y se inició con la síntesis del dominio N silvestre a partir de una versión mutante que ya se encontraba en el laboratorio. Este dominio N mutante se encuentra dentro de un plásmido de expresión pET-28 a (+) [Páez-Pérez, E.D. *et al.* 2016]. Se amplificó el vector al transformar bacterias BL-21 DE3 y después del crecimiento el material genético fue recuperado y purificado desde banda de gel. Después, el plásmido fue digerido con las enzimas de restricción Bam HI y Eco RI, o bien, el plásmido fue usado como templado de PCR para la amplificación del gene utilizando dos oligonucleótidos que flanquean todo el gene (oligonucleótidos en Páez-Pérez, E.D. *et al.* 2016). El gene fue recuperado de banda de gel y con este se procedió a insertar las mutaciones para generar el dominio N silvestre. La inserción de las mutaciones se llevó a cabo por *Overlap extension PCR* la cual consta de introducir las mutaciones una por una, tanto en la cadena principal y después en la cadena complementaria. Primero se insertó la mutación W552L con los oligonucleótidos diseñados para la mutación y los oligonucleótidos de Páez. Una vez que la mutación W552L fue insertada en ambas cadenas se fusionaron estos pedazos de gene utilizando los oligonucleótidos de Páez obteniendo así el gene con una sola mutación. Similarmente, la segunda mutación, Y587W, fue insertada a partir de este gene amplificado y purificado de banda (Fig. 7). Una vez obtenido y purificado el gene estructural del dominio N silvestre de SERCA se procedió a clonarlo en un vector de expresión. Los extremos del gene como del plásmido fueron preparados con las enzimas de restricción Bam HI y Eco RI. Después el material genético fue purificado de gel. Con los extremos pegajosos expuestos se facilitó la clonación del gene en el vector pGEX-2T con la T4 ligasa. El producto de ligación (5  $\mu$ L) fue utilizado para transformar bacterias Top 10. De las colonias observadas se seleccionaron 4 y se guardaron muestras de estas mismas en el ultracongelador. Con todas estas colonias se procedió a confirmar la presencia del gene en el plásmido. Para ello se digirieron 6  $\mu$ g de plásmido con las enzimas Bam HI y Eco RI el producto de digestión fue sometido a electroforesis en gel en el cual se observaron dos bandas correspondientes con la masa del vector pGEX-2T (4.9 kbp) y la otra con masa a la calculada para el gene del dominio N (0.8 kbp) (Fig. 7).

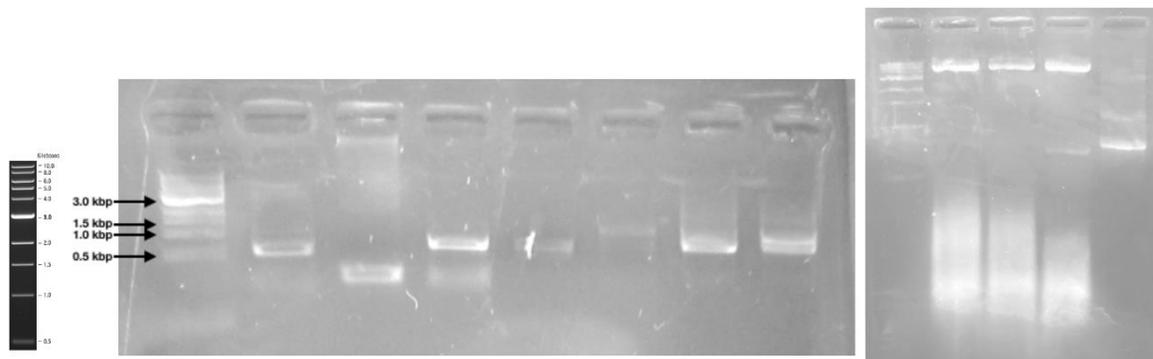


Figura 7. Izquierda: pasos de la inserción de mutaciones del gene estructural del dominio N hasta la obtención del mismo en el último pozo. Derecha: Confirmación de la clonación del gene en el vector pGEX-2T. Pozo 2 pXWTSERCAND digerido con Bam HI, pozo 3 pGex-2T digerido con Bam HI, pozo 4 pXWTSERCAND digerido con Bam HI y Eco RI donde se observa también el gene liberado del plásmido, y pozo 5 gene estructural amplificado por PCR antes de la clonación.

Con este vector se transformaron bacterias BL21 Y TF2, las cuales fueron transformadas con un plásmido que codifica proteínas chaperonas las cuales son necesarias para el correcto plegamiento del dominio N. Estas bacterias fueron hechas competentes por la metodología ya descrita en métodos y a su vez fueron transformadas con el plásmido pXWTSERCAND en presencia del antibiótico de selección establecido por el plásmido de las chaperonas. La expresión del dominio N fue estimulada con la adición de IPTG al medio y se dejaron crecer las bacterias a temperatura ambiente por 20 horas. La proteína fue recuperada de extractos celulares sometidos a cromatografía por la columna GSTrap HP. Cabe mencionar que el plásmido pGEX-2T inserta una proteína GST en el extremo N-terminal de la proteína de interés. Esta proteína fue usada para la purificación del dominio N, la cual a su vez fue cambiada de amortiguador con la columna PD10 (fig. 8). Con el cambio de amortiguador fue posible realizar la digestión de la proteína fusión. Esto fue realizado con el kit Thrombin CleanCleave™ durante 24 horas en agitación media a temperatura ambiente. Esto último es determinante para el éxito de la digestión pues se probaron distintas temperaturas, revoluciones de agitación e incluso en incubadoras de agitación temperadas y no se obtuvieron patrones de digestión normales. Finalmente, para la obtención del dominio

N silvestre se volvió a cambiar el amortiguador y el producto de digestión fue sometido a cromatografía de columna GSTrap HP obteniendo nuestra proteína en los primeros lavados de la columna (fig. 8).

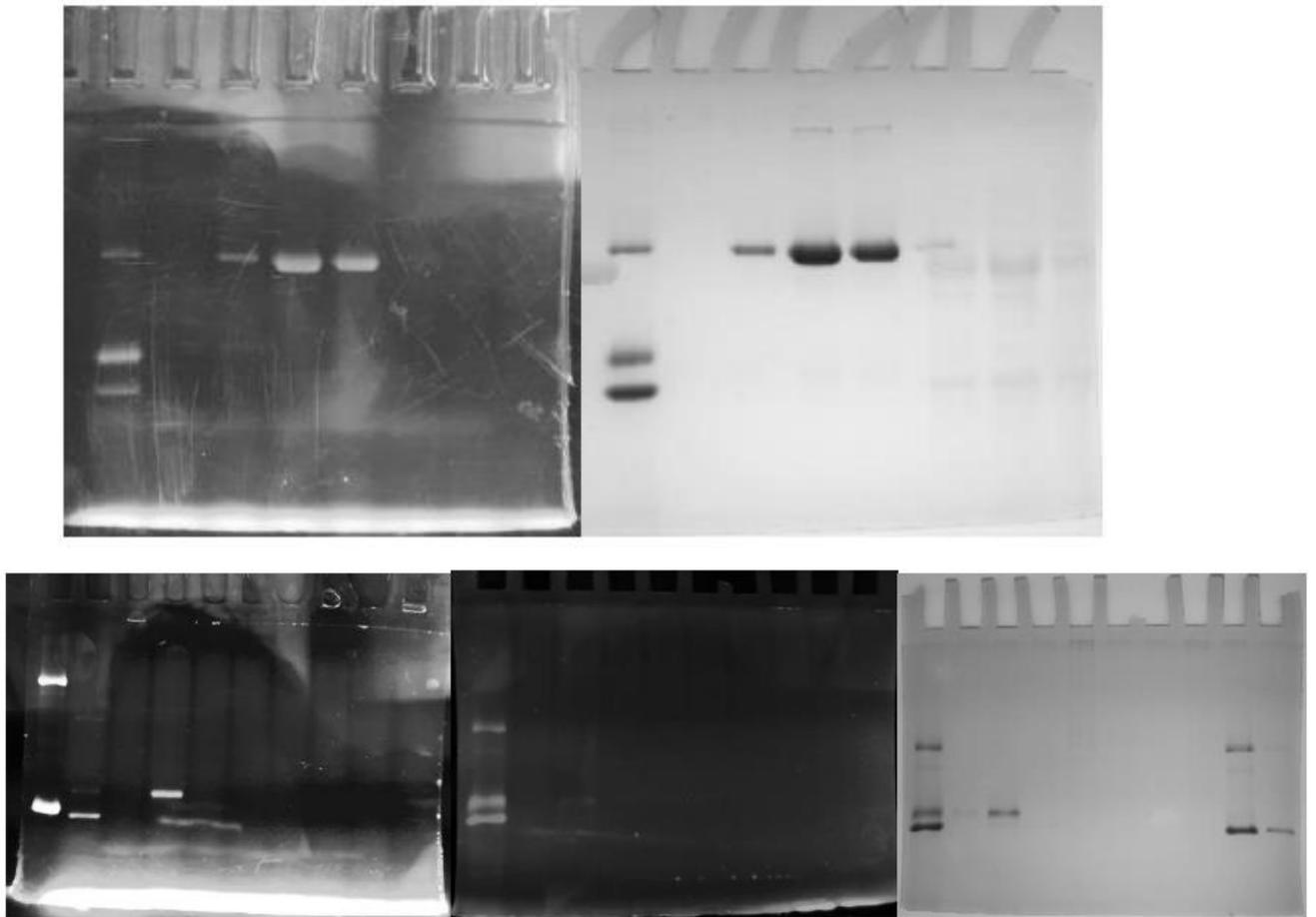


Figura 8. Obtención del dominio N utilizando geles brillantes y geles teñidos con azul brillante de Comassie. Arriba: Se muestran los pasos de cambio de amortiguador de la proteína fusión y su consecuente digestión por 24 horas. Este resultado de digestión fue sometido a otras cromatografías hasta la columna GSTrap HP. Abajo: Se muestra la obtención del dominio N en el primer lavado de la columna y se obtiene proteína fusión y GST hasta que se adiciona el amortiguador de elusión.

## Referencias

1. Abu-Abed, M., Millet, O., MacLennan, D.H. & Ikura, M. (2004) Probing nucleotide-binding effects on backbone dynamics and folding of the nucleotide-binding domain of the sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, *Biochemistry* 379, 235-242
2. Albers, R.W. (1967) Biochemical aspects of active transport, *Annual Review of Biochemistry* 36, 727-756
3. Altendorf, K., Gassel, M., Puppe, W., Möllenkamp, T., Zeek, A., Boddien, C., Fendler, K., Bamberg, E. & Dröse, S. (1998) Structure and function of the Kdp-ATPase of *Escherichia coli*, *Acta Physiologica Scandinavica* 643, 137-146
4. Anchordoquy, T.J., Izutsu, K.I., Randolph, T.W. & Carpenter, J.F. (2001) Maintenance of quaternary structure on the frozen state stabilizes lactate dehydrogenase during freeze-drying *Archives of Biochemistry and Biophysics* 390, 35-41
5. Anderson, K.W. & Murphy, A.J. (1983) Alterations in the structure of the ribose moiety of ATP reduce its effectiveness as a substrate for the sarcoplasmic reticulum ATPase, *Journal of Biological Chemistry* 258, 14276-14278
6. Aumer, M., Scarborough, G.A. & Kühlbrandt, W. (1998) Three-dimensional map of the plasma membrane  $\text{H}^{+}$ -ATPase in the open conformation, *Nature* 392, 840-843
7. Autry, J.M., Rubin, J.E., Svensson, B., Li, J. & Thomas, D.D. (2012) Nucleotide activation of the Ca-ATPase, *Journal of Biological Chemistry* 287 (46), 39070-39082
8. Axelsen, K.B. & Palmgren, M.G. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily, *Journal of Molecular Evolution* 46, 84-101
9. Birmachu, W., Nisswandt, F.L. & Thomas, D.D. (1989) Conformational transitions in the calcium adenosinetriphosphatase studied by time-resolved fluorescence resonance energy transfer, *Biochemistry* 28, 3940-3947
10. Bollang, D.M., Rozycki, M.D. & Edelstein, S.J. (1996) Protein Methods, 2<sup>nd</sup> edition, ISBN: 978-0-471-11837-4
11. Bublitz, M., Morth, J.P. & Nissen, P. (2012) P-type ATPases at a glance, *Journal of Cell Science* 124, 2515-2519
12. Carninci, P., Nishiyama, Y., Westover, A., Itoh, M., Nagaoka, S., Sasaki, N., Okazaki, Y., Muramatsu, M. & Hayashizaki, Y. (1998) Thermostabilization and

Thermoactivation of thermolabile enzymes by Trehalose and its Applications for the Synthesis of full-length cDNA *Biochemistry* 95, 520-524

13. Champeil, P., Menguy, T., Soulié, S., Juul, B., Gomez de Garcia, A., Rusconi, F., Falson, P., Denoroy, L., Henao, F., le Maire, M. & Møller, J.V. (1998) Characterization of a protease-resistant domain of the cytosolic portion of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, *Journal of Biological Chemistry* 273 (12), 6619-6631
14. Clausen, J.D., Vilsen, B., McIntosh, D.B., Einholm, A.P. & Andersen, J.P. (2004) Glutamate-183 in the conserved TGES motif of domain A of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase assists in catalysis of E<sub>2</sub>/E<sub>2</sub>P partial reactions, *PNAS USA* 101 (9), 2776-2781
15. Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Carpenter, J.F. (1993 A) Preserving dry biomaterials: The water replacement hypothesis Part I, *Biopharm* 4, 28-33
16. Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Carpenter, J.F. (1993 B) Preserving dry biomaterials: The water replacement hypothesis Part II, *Biopharm* 5, 40-43
17. Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Carpenter, J.F. (1993) Preserving dry biomaterials: The water replacement hypothesis Part 1 *Biopharm* 4, 28-33
18. Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Carpenter, J.F. (1993) Preserving dry biomaterials: The water replacement hypothesis Part 2 *Biopharm* 5, 40-43
19. Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Chapman, D. (1984) Infrared spectroscopic studies on interactions of water and carbohydrates with biological membranes *Archives of Biochemistry and Biophysics* 232 (1), 400-407
20. Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Chapman, D. (1984) Preservations of membranes in anhydrobiotic organisms -the role of trehalose *Science* 223, 701-703
21. Csermely, P., Katopis, C., Wallace, B.A. & Martonosi, A. (1987) The E<sub>1</sub> → E<sub>2</sub> Transition of Ca<sup>2+</sup>-Transporting ATPase in Sarcoplasmic Reticulum Occurs without Major Changes in Secondary Structure. A Circular-Dichroism Study, *Biochemistry Journal* 241, 663-669
22. Dang, D. & Rao, R. (2016) Calcium ATPases: Gene disorder and dysregulation in cancer, *Biochimica et Biophysica Acta* 1863, 1344-1350
23. De la Cruz-Torres, V., Cataño, Y., Olivo-Rodríguez, M. & Sampedro, J.G. (2020) ANS Interacts with the Ca<sup>2+</sup>-ATPase Nucleotide Binding Site, *Journal of Fluorescence* 30 (3),

24. Federov, M.V., Goodman, J.M., Nerukhm, D. & Schumm, S. (2011) Self-assembly of trehalose molecules on a lysozyme surface: the broken glass hypothesis, *Physical Chemistry Chemical Physics* 13, 2294-2299
25. Gekko, K. & Timasheff, S.N. (1981) Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures, *Biochemistry* 20, 4667-4676
26. Gekko, K. & Timasheff, S.N. (1981) Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures *Biochemistry* 20, 4667-4676
27. Gradman, D., Hansen, U.P., Long, W.S., Slayman, C.L. & Warncke, J. (1978) Current-voltage relationships for the plasma membrane and its principal electrogenic pump in *Neurospora crassa*: I. Steady-state conditions, *Journal of Membrane Biology* 39 (4), 333-367
28. Green, J.L. & Angell, C.A. (1989) Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly *Journal of Physical Chemistry* 93 (8), 2880-2882
29. Hernández-Meza, J.M. & Sampedro, J.G. (2018) Trehalose mediated inhibition of lactate dehydrogenase from rabbit muscle. The application of Kramers' theory in enzyme catalysis, *Journal of Physical Chemistry B* 122, 4309-4317
30. Higinbotham, H., Graves, J.S. & Davis, R.F. (1970) Evidence for an electrogenic ion transport pump in cells of higher plants, *Journal of Membrane Biology* 3, 210-222
31. Inesi, G., Lewis, D., Ma, H., Prasad, A. & Toyoshima, C. (2006) Concerted conformational effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and ATP are required for activation of sequential reactions in the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) catalytic cycle, *Biochemistry* 45, 13769-13778
32. Inesi, G., Lewis, D., Toyoshima, C., Hirata, A. & Meis, L. (2008) Conformational fluctuations of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in the native membrane environment. Effects of pH, temperature, catalytic substrate, and thapsigargin, *Journal of Biological Chemistry* 283, 1189-1196
33. Jacob, M., Geeves, M., Holterman, G. & Schmid, F.X. (1999) Diffusional barrier crossing in a two-state protein folding reaction, *Nature Structural Biology* 6, 923-926
34. Jain, N.K. & Roy, I. (2009) Effect of trehalose on protein structure *Protein Science* 18, 24-36
35. Jensen, A.-M. L., Sørensen, T. L.-M., Olesen, C., Møller, J.V. & Nissen, P. (2006)

Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump, *The EMBO Journal* 25, 2305-2314

36. Juul, B., Turc, H., Durand, M.L., Gomez de Garcia, A., Denoroy, L., Møller, J.V., Champeil, P. & le Maire, M. (1995) Do transmembrane segments in proteolyzed sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase retain their functional Ca<sup>2+</sup> binding properties after removal of cytosolic fragments by proteinase K? *Journal of Biological Chemistry* 270 (34), 20123-20134
37. Karlisch, S.J.D. (1979) in: (Na, K) ATPase structure and kinetics (Skou, J.C. and Norby, J. eds.) *Academic Press*, New York, 115-128
38. Kibbe, W.A. (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator, *Nucleic Acid Research* 35, W43-W46
39. Kramers, H.A. (1940) Brownian motion in a field of force and the diffusion model of chemical reactions *Physica* 7 (4), 284-304
40. Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism on P-type ATPases, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5, 282-295
41. Kühlbrandt, W., Zeelen, J. & Dietrich, J. (2002) Structure, mechanism, and regulation of the *Neurospora crassa* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, *Science* 297, 1692-1696
42. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685
43. Lovell, S.C., Mullick, A.H. & Muirhead, H. (1998) Cooperativity in *Bacillus stearothermophilus* pyruvate kinase, *Journal of Molecular Biology* 276 (4), 839-851
44. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275
45. Lutsenko, S. & Kaplan, J.H. (1995) Organization of the P-type ATPases: significance of structural diversity, *Biochemistry* 34 (48), 15607-15613
46. MacLennan, D. H., Brandl, C. J., Korczak, B., and Green, N. M. (1985) Amino-acid sequence of a Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 316, 696-700
47. Matthews, I., Sharma, R.P., Lee, A.G. & East, J.M. (1990) Transmembranous organization of (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase from sarcoplasmic reticulum, *Journal of Biological Chemistry* 265 (31), 18737-18740

48. McFarland, B.H. & Inesi G. (1971) Solubilization of Sarcoplasmic Reticulum with Triton X-100, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 145, 456-464
49. Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G. & Toyoshima, C. (2005) Structural role of countertransport revealed in Ca (2+) pump crystal structure in the absence of Ca (2+), *PNAS USA* 102, 14489-14496
50. Olesen, C., Sørensen, T.L., Nielsen, R.C., Møller, J.V. & Nissen, P. (2004) Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion, *Science* 306, 2251-2255
51. Páez-Pérez, E.D. (2015) Caracterización estructural del dominio N de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de retículo sarcoplásmico de músculo de conejo, *Tesis*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí
52. Páez-Pérez, E.D., De la Cruz-Torres, V. & Sampedro, J.G. (2016) Nucleotide binding in an engineered recombinant Ca<sup>2+</sup>-ATPase N-domain, *Biochemistry* 55, 6751-6765
53. Palmgren, M.G. & Nissen, P (2011) P-type ATPases, *Annual Review of Biophysics* 40, 243-266
54. Paz-Alfaro, K.J. (2009) Inactivación térmica de la glucose oxidase de *Aspergillus niger* y su estabilización por trehalosa, *Tesis*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
55. Paz-Alfaro, K.J., Ruiz-Granados, Y.G., Uribe-Carvajal & Sampedro, J.G. (2009) Trehalose-mediated thermal stabilization of glucose oxidase from *Aspergillus niger*, *Journal of Biotechnology* 141, 130-136
56. Pedersen, B.P., Buch-Pedersen, M.J., Morth, J.P., Palmgren, M.G. & Nissen, P. (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* 450, 1111-1115
57. Pick, U. & Bassilian, S. (1981) Modification of the ATP binding site of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase from sarcoplasmic reticulum by fluorescein isothiocyanate, *FEBS Letters* 123 (1), 127-130
58. Pick, U. & Karlsh, S.J.D. (1980) Indications for an oligomeric structure and for conformational changes in sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase labelled selectively with fluorescein, *Biochimica et Biophysica Acta Protein Structure* 626 (1), 255-261
59. Rej, R. & Richards, A.H. (1974) Interference by tri buffer in the estimation of protein by the Lowry procedure, *Analytical Biochemistry* 62, 240-247
60. Robinson, J.L. & Rose, I.A. (1972) The proton transfer reactions of muscle pyruvate

- kinase, *Journal of Biological Chemistry* 247, 1096-1105
61. Sakai, H., Suzuki, K. & Imahori, K. (1986) Purification and properties of pyruvate kinase from *Bacillus stearothermophilus*, *Journal of Biochemistry* 99, 1157-1167
  62. Sampedro, J.G. & Uribe, S. (2004) Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity, *Molecular and Cellular Biochemistry* 256/257, 319-327
  63. Sampedro, J.G., Guerra, G., Pardo, J.P. & Uribe, S. (1998) Trehalose-mediate protection of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Kluyveromyces lactis* during freeze-drying and rehydration, *Cryobiology* 37, 131-138
  64. Sampedro, J.G., Muñoz-Clares, R.A. & Uribe, S. (2002) Trehalose-mediated inhibition of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: dependence on viscosity and temperature, *Journal of Bacteriology* 184 (16), 4384-4391
  65. Sampedro, J.G., Nájera, H., Uribe-Carvajal, S. & Ruiz-Granados, Y.G. (2014) Mapping the ATP binding site in the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Kluyveromyces lactis*, *Journal of Fluorescence* 24, 1849-1859
  66. Sampedro, J.G., Rivera-Moran M.A. & Uribe-Carvajal, S (2020) Kramers' theory and the dependence of enzyme dynamics on trehalose-mediated viscosity, *Catalysis* 10 (6), 659-677
  67. Sampedro, J.G., Ruiz-Granados, Y.G., Nájera, H., Téllez-Valencia, A. & Uribe, S. (2007) Fluorescence quenching by nucleotides of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase from *Kluyveromyces lactis*, *Biochemistry* 46, 5616-5622
  68. Scarborough, G.A. (1999) Structure and function of the P-type ATPases, *Current Opinion in Cell Biology* 11, 517-522
  69. Shivanna, B.D. & Rowe, E.S. (1997) Preservation of the Native Structure and Function of Ca<sup>2+</sup>-ATPase from Sarcoplasmic Reticulum: Solubilization and Reconstitution by New Short-Chain Phospholipid Detergent 1,2-diheptanoyl-sn-phosphatidylcholine, *Biochemistry Journal* 325, 533-542
  70. Sim, S.I. & Park, E. (2023) P5-ATPases: Structure, Substrate Specificities, and Transport Mechanisms *Current Opinion in Structural Biology* 79, 102531
  71. Slayman, C.L., Long, W.S. & Lu, C.Y.H. (1973) The relationship between ATP and an electrogenic pump in the plasma membrane of *Neurospora crassa*, *Journal of Membrane*

*Biology* 14, 305-338

72. Slayman, C.L., Lu, C.Y.H. & Shane, L. (1970) Correlated changes in membrane potential and ATP concentrations in *Neurospora*, *Nature* 226, 274-276
73. Sørensen, T.L., Møller, J.V. & Nissen, P (2004) Phosphoryl transfer and calcium ion occlusion in the calcium pump, *Science* 304, 1672-1675
74. Soulié, S., Møller, J.V., Falson, P. & le Maire, M. (1996) Urea reduces the aggregation of membrane proteins on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, *Analytical Biochemistry* 236, 363-364
75. Tang, M., Waring, A.J. & Hong, M. (2007) Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion *Journal of Magnetic Resonance* 184, 222-227
76. Tao, T., Snively, M.D., Farr, S.G. & Maguire, M.E. (1995) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: *mgtA* encodes a P-type ATPase and is regulated by Mg<sup>2+</sup> in a manner similar to that of the *mgtB* P-type ATPase, *Journal of Bacteriology* 177 (10): 2654-2662
77. Toyoshima, C. & Mizutani, T. (2004) Crystal structure of the calcium pump with a bound ATP analogue, *Nature* 430, 529-535
78. Toyoshima, C. & Nomura, H. (2002) Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium, *Nature* 418, 605-611
79. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. & Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution, *Nature* 405, 647-655
80. Winters, D.L., Autry, J.M., Svensson, B. & Thomas, D.D. (2008) Interdomain fluorescence resonance energy transfer in SERCA probed by cyan-fluorescent protein fused to the actuator domain, *Biochemistry* 47, 4246-4256

Article

---

# Isolation of the Sarcoplasmic Reticulum $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from Rabbit Fast-Twitch Muscle

---

Miguel A. Rivera-Morán and José G. Sampedro



<https://doi.org/10.3390/mps6050102>