

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Caracterización de AtHMA1 una putativa Calcio-Metal pesado-ATPasa de
*Arabidopsis thaliana***

Seminario de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Ignacio Andrés Moreno Pérez

**Noviembre 2008
Santiago - Chile**



**Director de Memoria de Título: Dr. Ariel Orellana López¹
Dra. Viviana Ordenes Ortiz**

UCH-FC
Biotecnología
M835
C.1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

“Caracterización de AtHMA1 una putativa Calcio-Metal pesado-ATPasa de Arabidopsis thaliana”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

IGNACIO ANDRÉS MORENO PÉREZ

Dr. Ariel Orellana López
Director Seminario de Título

Dra. Viviana Ordenes Ortiz
Co-Directora Seminario

Comisión de Evaluación

Dra. Claudia Stange
Presidente Comisión

Dra. Lorena Norambuena Morales
Correctora



Santiago de Chile, noviembre 2008



Biografía

Años atrás sueños y fantasías despertaron su curiosa naturaleza, pintura, música y tragedia como inspiración, apoyo, cariño, alegrías y amistades desinteresadas y una ingrata soledad constante en su mirada. De una humilde cuna al colegio, del cual vagos recuerdos persisten, luego y con suerte quizás divina, cae en un lugar lleno de locos de su misma línea, soñadores, obsesivos, leales y absolutamente particulares. Y si bien al fin encuentra empatía, lejos aún está de encauzar su vida, múltiples caminos se presentan y la verdadera aventura recién comienza.



“A mis padres y a mis hermanos de sangre, de sueños y de empeño”



Índice	
Biografía	II
Índice	III
Índice de tablas	IV
Índice de figuras	IV
Abreviaturas	V
Resumen	VI
Abstract	VII
Introducción	1
Materiales y métodos	6
Creación de los vectores de expresión en levaduras	6
Cultivo de cepas de levadura	7
Transformación de levaduras mutantes	8
Ensayos de complementación funcional	10
Ensayos de destinamiento de Carboxipeptidasa Y (CPY)	10
Fracciones microsomales de levadura para ensayos de transporte	11
Ensayo de transporte de calcio	12
Obtención de IC ₅₀ de AtHMA1 frente a tapsigargina	13
Obtención de la Km de AtHMA1	13
Fracciones microsomales de levadura para ensayos de actividad ATPásica	14
Ensayos Actividad ATPásica	14
Resultados	15
AtHMA1 es una Calcio-ATPasa inhibible por tapsigargina	15
AtHMA1 actúa como MetalPesado ATPasa de cadmio	24
AtHMA1 posee actividad Cu ²⁺ -ATPasa	33
Discusión	37
Conclusiones	40
Referencias	41

Índice de tablas

Tabla 1. Partidores utilizados	5
Tabla 2. Cepas silvestres de <i>S. cerevisiae</i>	6
Tabla 3. Cepas mutantes de <i>S. cerevisiae</i>	7
Tabla 4. Cepas transformantes de <i>S. cerevisiae</i>	9

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de AtHMA1	3
Figura 2. Homeostasis de Calcio en <i>S. cerevisiae</i>	16
Figura 3. AtHMA1 complementa funcionalmente a las cepas Δ pmr1 y K616	18
Figura 4. Actividad ATPásica dependiente de calcio	19
Figura 5 Captación de calcio inducido por ATP	21
Figura 6 Parámetros cinéticos asociados con el Transporte de Calcio	23
Figura 7 Tolerancia a metales pesados en <i>S. cerevisiae</i>	25
Figura 8 AtHMA1 complementa funcionalmente a la levadura mutante Δ ycf1	26
Figura 9 AtHMA1 confiere tolerancia a Cd^{2+} a levaduras sensibles	28
Figura 10 La Actividad ATPásica de AtHMA1 es inducida por Cd^{2+} .	30
Figura 11 La AtHMA1 aumenta la tolerancia a Cd^{2+} en levaduras parentales	32
Figura 12 Homeostasis de hierro y cobre en <i>S. cerevisiae</i>	34
Figura 13 AtHMA1 complementa funcionalmente a la cepa mutante Δ ccc2	36



Abreviaturas

T _m	Temperatura de desnaturalización térmica
ADN	ácido desoxirribonucleico
ATP	adenosina trifosfato
ATPasa	enzima que utiliza como fuente de energía ATP
Bomba ATPasa	Transportador activo que utiliza como fuente de energía ATP
SERCA-ATPasa	bomba calcio-ATPasa de reticulo sarco-endoplásmico
Tg	tapsigargina, inhibidor específico de bombas tipo SERCA-ATPasa
D.O. ₍₆₀₀₎	densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros
CPY	carboxipeptidasa Y
EGTA	ácido etilenglicol tetracético (agente quelante)
K _m	concentración con que se alcanza la mitad de la velocidad máxima
IC ₅₀	concentración de inhibidor con que disminuye a la mitad la actividad
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
ANOVA	análisis de varianza
Matx/a/alpha	tipo de apareamiento
ade2 x	mutación x en el gen ade2 involucrado en la síntesis de adenina
lys2 x	mutación x en el gen lys2 involucrado en la síntesis de lysina
his3 x	mutación x en el gen his3 involucrado en la síntesis de histidina
leu2 x	mutación x en el gen leu2 involucrado en la síntesis de leucina
trp1 x	mutación x en el gen trp1 involucrado en la síntesis de triptofano
ura3 x	mutación x en el gen ura3 involucrado en la síntesis de uracilo
YPD	medio completo para levadura
PEG	polietilén glicol
TE	tampón compuesto de Tris-HCl y EDTA
AcLi	acetato de litio
Ura ⁻	levadura mutante deficiente en la síntesis de uracilo
Leu ⁻	levadura mutante deficiente en la síntesis de leucina
DMSO	dimetil sulfóxido
FCCP	Carbonilcianida-4-(trifluorometoxy)-fenilhidrazona, protonóforo
BTP	bis tris propano
Pi	fosfato inorgánico

Resumen

AtHMA1, una posible bomba ATPasa de *Arabidopsis thaliana*, ha sido clasificada dentro del grupo de las metal pesado- ATPasas, las cuales tienen diferentes funciones como detoxificación o transporte de metales para su uso como cofactores. Sin embargo, estudios anteriores han indicado que también posee similitud con las bombas SERCA-ATPasas, cuyo transporte de calcio es específicamente inhibido por un fármaco llamado tapsigargina. Para determinar la especificidad de AtHMA1 a iones, realizamos la complementación funcional del ADNc de AtHMA1 en levaduras mutantes deficientes en el transporte de calcio, cobre y metales pesados. Adicionalmente, probamos la habilidad de AtHMA1 para conferir tolerancia a metales pesados a las levaduras parentales, y estudiamos la actividad de transporte de AtHMA1 para calcio y metales pesados. Nuestros resultados sugieren fuertemente que, AtHMA1 en este sistema heterólogo, funciona tanto como Calcio ATPasa, como Metal pesado ATPasa, y su actividad es inhibida por tapsigargina. Hasta ahora AtHMA1 es la primera bomba sensible a tapsigargina capaz de transportar calcio y metales pesados, y probablemente constituye un elemento clave para la homeostasis iónica dentro de la célula vegetal.

Abstract

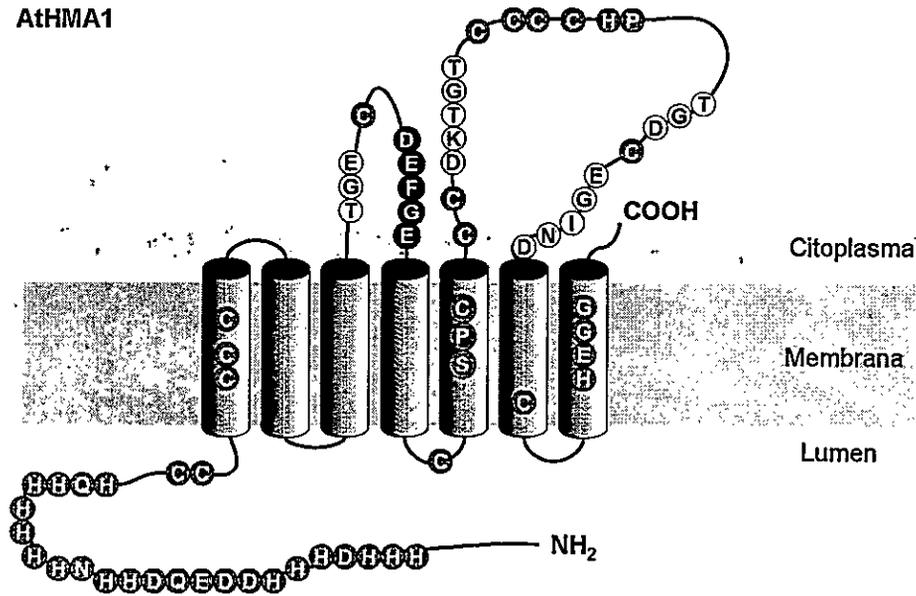
AtHMA1 is a putative ATPase from *Arabidopsis thaliana* classified into the group of the Heavy Metal-ATPases which have different functions like detoxification or metal transport for its use as cofactors. Nevertheless, previous studies have indicated that this pump shares similarities with SERCA type-ATPases, which calcium transport are specifically inhibited by a drug called thapsigargin. In order to determine the ion specificity of AtHMA1, we performed functional complementation assays using mutant yeast strains deficient in calcium, copper and heavy metal transport. Additionally we tested the ability of AtHMA1 to confer heavy-metal tolerance to parental yeast, and we studied AtHMA1-transport activities of calcium and heavy metals. Our results, strongly suggest that, AtHMA1 in this heterologous system, works as a calcium/Heavy metal ATPase and its activity is inhibited by thapsigargin. Until now AtHMA1 is the first thapsigargin-sensitive pump capable to transport calcium and heavy-metals and probably constitutes a key element for ionic homeostasis in plant cells.

Introducción

Un tema vital dentro del contexto celular es la homeostasis iónica, ya que se encuentra involucrada en los más diversos procesos, como señalización, manutención del volumen celular, actividad enzimática, entre muchos otros. Pero dadas las diferencias de potenciales electroquímicos entre los diferentes compartimentos u organelos de las células eucariontes, es necesaria la existencia de un transporte activo que permita el paso de los iones en contra de estos gradientes. Un ejemplo de estos mecanismos son las bombas ATPasas, particularmente las del tipo P, que durante el proceso de transporte del ión requiere fosforilarse mediante la hidrólisis de ATP. Durante mucho tiempo no se había descrito, en el aparato de Golgi de la célula vegetal, la presencia de bombas ATPasas para el transporte de calcio hacia este organelo, cuando es un hecho que en células animales, el aparato de Golgi posee diversos canales y bombas de calcio, transformandolo en elemento clave para la homeostasis de este catión (Pinton y col, 1998). El hallazgo de una actividad Calcio-ATPasa en el aparato de Golgi de la célula vegetal, que a su vez es inhibible por tapsigargina (Tg), un inhibidor específico de Calcio-ATPasas tipo SERCA (Ordenes y col 2002), condujo a la búsqueda de un posible gen responsable que cumpliera con estas características. Para ello, y tomando como organismo modelo a *Arabidopsis thaliana* cuyo genoma se encuentra completamente secuenciado, se realizó la búsqueda de una secuencia aminoacídica en particular, "DEFGE", la cual ha sido determinada como el segmento específico de unión a tapsigargina en las bombas tipo SERCA (Xu y col 2004) las cuales son bombas pertenecientes al retículo sarcoplásmico en las células del tejido muscular y se encuentran involucradas en los procesos de elongación y contracción muscular. Esta búsqueda arrojó tan sólo un resultado: AtHMA1 (*Arabidopsis thaliana* Heavy Metal ATPase 1), la cual ha sido

clasificada como una de las ocho integrantes de la familia de las Metal-pesado ATPasas de *Arabidopsis thaliana* (Axelsen & Palmgren 2001) ATPasas involucradas en homeostasis de metales pesados, particularmente en procesos de detoxificación como es el caso para cadmio o como transportadores de metales que son utilizados como cofactores para diferentes enzimas, como es el caso de cobre y zinc. Sin embargo, si bien posee ciertas características que la ligan muy directamente a las Metal-pesado ATPasas, como un motivo rico en múltiples residuos de histidina (poly-H), repeticiones de motivos cisteína-cisteína (CC), el dipéptido Histidina-Prolina (HP), y el sitio de unión a metal X-Prolina-Cisteína (xPC) (Williams & Mills 2005), presenta un gran parecido con SERCA1, Calcio-ATPasa de retículo sarco-endoplásmico, que posee este motivo "DEFGE" (Stokes & Green 2003) en un contexto espacial muy similar a AtHMA1 (Figura 1), de este modo la función de AtHMA1 en la célula vegetal queda en una tela de juicio, dado a estas evidencias parcialmente divergentes. Sin embargo, hasta ahora todas las funciones que se le atribuyen a AtHMA1 son basadas en análisis bioinformáticos de comparación de secuencias (Axelsen & Palmgren 2001). En este trabajo nos focalizamos en caracterizar funcionalmente a AtHMA1 expresando su ADNc en diferentes sistemas heterólogos.

AtHMA1



SERCA1

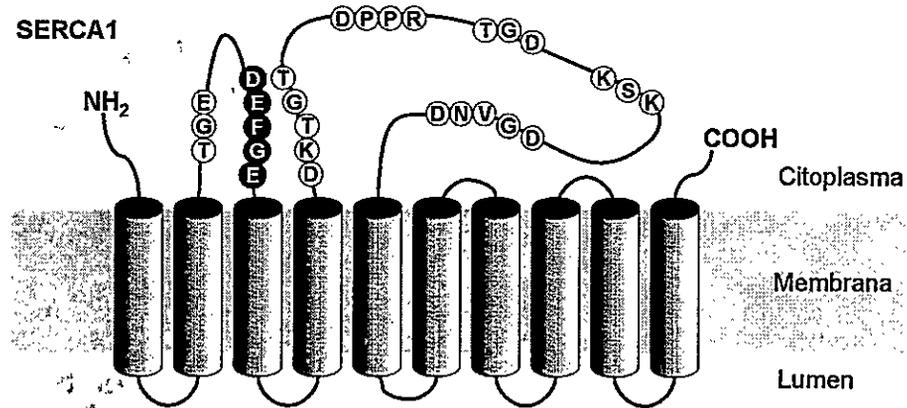


Figura 1. Esquema de AtHMA1 en comparación con SERCA1. Se han predicho siete dominios transmembrana (ARAMEMNON release 4.0 - June 14, 2006 - ©Flügge Group, Botanical Institute, University of Cologne), donde entre ellos se destaca la característica propia de las SERCA-ATPasas, el sitio de unión a taspigargina "DEFGE" (círculos negros). Además, se resaltan motivos propios de las bombas ATPasas, como el dominio de fosforilación (entre DKTGT y DPPR), dominio de transducción (TGE) (círculos blancos), y además, en el caso de AtHMA1, aparecen las características de metal-pesado ATPasa como lo es la "cola" de múltiples histidinas (H), el sitio de unión a metales "xPC", múltiples repeticiones de cisternas, "C" y "CC", el dipéptido HP y el motivo HEGG (círculos grises).

Hipótesis

AtHMA1 es una metal pesado-ATPasa involucrada en la homeostasis de calcio y es inhibible por tapsigargina.

Objetivo General

Caracterizar funcionalmente a la proteína AtHMA1, mediante ensayos de complementación funcional en levaduras mutantes y ensayos de transporte.

Objetivos específicos

- 1.-Complementar levaduras mutantes deficientes en el transporte de metales
- 2.-Medir actividad ATPasa dependiente de metales y transporte de radioisótopos
- 3.-Evaluar el efecto de tapsigargina y determinar las propiedades cinéticas asociadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Creación de los vectores de expresión en levaduras

El ADNc de AtHMA1 fue clonado desde un vector plasmidial obtenido desde el banco de clones RIKEN (Seki y col 2002; Seki y col 1998). Desde este plasmidio fue amplificado por PCR el ADNc de interés, utilizando un par de partidores que incluyeron los sitios de corte para enzimas de restricción *BglII* y *NotI* para su subclonamiento en el vector p426GPD, y los partidores *BglII* y exact (sin sitios de restricción) para su subclonamiento en el vector p425GPD (Tabla1). Ambos vectores fueron utilizados para la transformación en levadura y selección por auxotrofia. En el caso de p425GPD la selección fue en un medio pobre en leucina (selección Leu⁻) y para p426GPD en un medio mínimo pobre en uracilo (selección Ura⁻) (Mumberg y col 1995). Los vectores obtenidos fueron llamados AtHMA1gpd425, y AtHMA1gpd426, los cuales fueron utilizados en este trabajo.

Tabla 1. Partidores. Secuencia de partidores utilizados en la amplificación del ADNc de AtHMA1 y en el subclonamiento dentro de los vectores de expresión heteróloga en levaduras.

Partidor	Secuencia	Sitio de restricción	Otras características
<i>BglII</i>	5' - CgC TTg AgA TCT AAT TCg TCg ACC ATg gAA - 3'	<i>BglII</i> (AgATCT)	Partidor sentido
<i>NotI</i>	5' - AgA CAA gCg gCC gCA AgT TAC CCC CCC ATg - 3'	<i>NotI</i> (CggCCg)	Partidor antisentido
exact	5' CTA ATg TgC AgA gCT TAA ACT gTT gCT gCT gCT ACT-3'	no	Partidor antisentido

Cultivo de cepas

Las cepas silvestres de *S. cerevisiae* (Tabla 2) fueron cultivadas en medio completo YPD sólido (extracto de levadura 0.5%, Peptona 1%, Dextrosa 2%, agar-agar 2%) a 30°C. Las cepas mutantes de *S. cerevisiae* Δ pmr1 deficiente en el transporte de calcio, Δ ccc2, deficiente en transporte de cobre, y Δ ycf1, sensible a metales pesados (Tabla 3), fueron cultivados en medio completo YPD al igual que sus correspondientes cepas parentales. En el caso de la triple mutante K616, el medio YPD debió ser suplementado con CaCl_2 hasta una concentración final de 10mM, debido a su severo fenotipo deficiente en transporte de calcio.

Tabla 2. Cepas parentales de *S. cerevisiae*

Mutante	Genotipo	Donante
YR98	Mat x; ade2; lys2- Δ 201; his3- Δ 200; leu2-3,-112; trp1- Δ 90; ura3-52	Dr. Hans Rudolph University of Stuttgart, Germany
W303	Mat x; ade2-1; can1-100; his3- 11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1	Dr. Kyle Cunningham Johns Hopkins University
DTY165	Mat-alpha; lys2-801; suc2- Δ 9; his3- Δ 200; leu2-3,-112; trp1- Δ 901; ura3-52	Dr. Dennis Thiele Duke University, Medical Center

Cultivo de cepas

Las cepas silvestres de *S. cerevisiae* (Tabla 2) fueron cultivadas en medio completo YPD sólido (extracto de levadura 0.5%, Peptona 1%, Dextrosa 2%, agar-agar 2%) a 30°C. Las cepas mutantes de *S. cerevisiae* Δ pmr1 deficiente en el transporte de calcio, Δ ccc2 deficiente en transporte de cobre, y Δ ycf1, sensible a metales pesados (Tabla 3), fueron cultivados en medio completo YPD al igual que sus correspondientes cepas parentales. En el caso de la triple mutante K616, el medio YPD debió ser suplementado con CaCl_2 hasta una concentración final de 10mM, debido a su severo fenotipo deficiente en transporte de calcio.

Tabla 2. Cepas parentales de *S. cerevisiae*

Mutante	Genotipo	Donante
YR98	Mat x; ade2; lys2- Δ 201; his3- Δ 200; leu2-3,-112; trp1- Δ 90; ura3-52	Dr. Hans Rudolph University of Stuttgart, Germany
W303	Mat x; ade2-1; can1-100; his3- 11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1	Dr. Kyle Cunningham Johns Hopkins University
DTY165	Mat-alpha; lys2-801; suc2- Δ 9; his3- Δ 200; leu2-3,-112; trp1- Δ 901; ura3-52	Dr. Dennis Thiele Duke University, Medical Center

Transformación de levaduras mutantes

Fue utilizado el método del Acetato de Litio con ciertas modificaciones (Gietz y col 1992). A partir de un pre-inóculo de la levadura mutante en medio YPD de dos días de crecimiento a 30°C, fueron inoculados 300 mL de medio YPD, el cual fue llevado a una $D.O_{600} = 0,2-0,3$. Las células fueron sedimentadas por 10 minutos a 1000xg. El sedimento fue lavado dos veces con agua destilada estéril, y las células fueron resuspendidas en 1,5 mL de TEAcLi (Acetato de litio 100mM disuelto en Tris 10 mM y EDTA 1mM pH 7,5). Luego se mezclaron suavemente 0,1µg de ADN vectorial, 100µg de ADN desnaturado de espermio de salmón y 100 µL de la suspensión de células. Posteriormente, fueron agregados 600 µL de PEG AcLi (acetato de litio 100mM, PEG 25 % disueltos en TRIS-HCl 1mM pH 7,5 y EDTA 1mM), y fue agitado en un vortex, e incubado con agitación durante una hora a 30 °C. Posterior a esto, fueron agregados 70 µL de DMSO 100% y mezclados invirtiendo el tubo. Fue realizada una incubación en hielo por 10 minutos, y luego a 42°C por 15 minutos. Finalmente fue incubado nuevamente en hielo por 5 minutos. La muestra fue centrifugada por 5 segundos a 10.000xg, y fue descartado el sobrenadante. El sedimento fue resuspendido en 0,8 mL de medio mínimo (medio nitrogenado base para levadura 6,7 g/L, Dextrosa 2% y adenina 10mg/L, histidina 20mg/L, metionina 20mg/L, lysina 50mg/L, triptofano 50mg/L y para un medio mínimo "Ura" además leucina 100mg/L y para un medio mínimo "Leu" uracilo 20mg/L) y fue incubado toda la noche con agitación a 30°C. Finalmente, al día siguiente, los cultivos fueron inoculados en placas con el medio mínimo sólido correspondiente (el mismo medio mínimo más agar-agar 2%) y en dos días aparecieron colonias transformantes.

Tabla 4: Cepas transformantes de *S. cerevisiae*.

Cepa	Vector	Selección	Nombres usados para las cepas transformantes
<i>Δpmr1</i>	AtHMA1gpd426	Medio pobre en uracilo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Δpmr1</i>-AtHMA1
<i>Δpmr1</i>	p426GPD	Medio pobre en uracilo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Δpmr1</i>-vector vacío
K616	AtHMA1gpd426	Medio pobre en uracilo	<ul style="list-style-type: none"> • K616-AtHMA1
K616	p426GPD	Medio pobre en uracilo	<ul style="list-style-type: none"> • K616- vector vacío
<i>Δycf1</i> (DTY167)	AtHMA1gpd426	Medio pobre en uracilo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Δycf1</i>-AtHMA1
<i>Δycf1</i> (DTY167)	p426GPD	Medio pobre en uracilo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Δycf1</i>-vector vacío
<i>Δccc2</i>	AtHMA1gpd425	Medio pobre en leucina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Δccc2</i>-AtHMA1
<i>Δccc2</i>	p425GPD	Medio pobre en leucina	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Δccc2</i>- vector vacío
YR98 cepa parental de <i>Δpmr1</i>	p426GPD	Medio pobre en uracilo	<ul style="list-style-type: none"> • YR98-pGPD426
W303 cepa parental de K616	AtHMA1gpd426	Medio pobre en uracilo	<ul style="list-style-type: none"> • WT2+AtHMA1
W303 cepa parental de K616	p426GPD	Medio pobre en uracilo	<ul style="list-style-type: none"> • W303-pGPD426 • WT2 + vector vacío
W303 cepa parental de <i>Δccc2</i>	p425GPD	Medio pobre en leucina	<ul style="list-style-type: none"> • WT2 + vector vacío • (WT2+V.V.2)
DTY165 cepa parental de <i>Δycf1</i>	p426GPD	Medio pobre en uracilo	<ul style="list-style-type: none"> • WT3 • WT3+ vector vacío,

Ensayos de complementación funcional

Los ensayos de complementación se realizaron en medio mínimo Ura^r para el caso de K616, Δ pmr1 y Δ ycf1, transformados con AtHMA1gpd426 y pGPD426 vacío, y Leu^r para Δ ccc2 y W303 transformada con AtHMA1gpd425 y pGPD425 vacío.

Mediante la adición de EGTA hasta una concentración de 10mM en el medio para el ensayo de K616 y Δ pmr1, el calcio fue quelado. Al medio para Δ ycf1 se le agregó CdCl₂ hasta una concentración de 70 μ M para determinar la tolerancia a esta concentración, y el de Δ ccc2 fue quelado el hierro con la adición de ferrozina hasta una concentración de 2mM.

Además fueron realizados cultivos a diferentes concentraciones de CdCl₂ y de CuSO₄, a 30°C con agitación, y su densidad óptica a 600nm fue determinada cada tres horas durante 21 horas o una vez cada día durante 5 días.

Ensayo de destinación de Carboxipeptidasa Y (CPY)

A partir de cultivos de dos días de K616+pGPD426, K616+AtHMA1gpd426 y WT+pGPD426, se procedió a sedimentar las células, y a partir de 500 μ L del sobrenadante, fue realizado un dot-blot en un sistema de dot-blot (Bio-Rad). Luego fue revelado usando el anticuerpo monoclonal anti-CPY (Molecular probes) en una dilución 1:1000, y como anticuerpo secundario, un anticuerpo anti-ratón acoplado a Peroxidasa. Como control positivo fue utilizado una preparación de proteínas totales de levadura preparado en tampón SUMEB (SDS 1%, Urea 8M, Mops 10mM pH: 6,8, EDTA 10mM, azul de bromofenol 0,01%) (Zouhar y col 2004)

Fracciones microsomales para ensayos de transporte

Para preparar fracciones microsomales de levadura escogimos el protocolo utilizado en Liang y Sze (1998) con ciertas modificaciones. A partir de un preinóculo de 2 días fueron inoculados 300mL de medio mínimo correspondiente (en el caso de K616 el medio contenía una concentración de CaCl_2 10mM), el que fue llevado hasta una D.O._{600} entre 1,0 y 2,0. Luego fue centrifugado a 4.000xg por 5 minutos, y descartado el sobrenadante. El sedimento fue lavado con agua destilada y se procede a agregar un volumen de tampón GBB (sacarosa 10%; Hepes-BTP 25mM pH 7,5; MgCl_2 2mM; DTT 2mM; EGTA 1mM.) más un mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, leupeptina $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$, pepstatina $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y un mismo volumen de perlas de vidrio de 500 μm de diámetro. Fue agitado en un vortex por 30 segundos cuatro veces y centrifugado por 5 minutos a 5.000xg y 4°C. Fue rescatado el sobrenadante y vertido en los tubos de centrifuga para el rotor Sorvall T647,5. El volumen total de estos tubos fue completado con la solución GBB2 (sacarosa 10%; Hepes-BTP 20mM pH 7.0; DTT 1mM, PMSF 1mM, leupeptina $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$, pepstatina $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$), y fue centrifugado a 108.000xg por una hora. Luego fue descartado el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 200 μL de tampón de suspensión (sacarosa 10%; Hepes-BTP 20mM pH 7.0; DTT 1mM, PMSF 1mM, leupeptina $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$, pepstatina $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Finalmente fue alicuotado y almacenado a -80°C.

Ensayo de transporte de calcio (Ca^{2+})

El transporte de Ca^{2+} fue medido a través del método de filtración (Liang y Sze 1998). El calcio radioactivo ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) captado por las fracciones microsomales fue medido después de cada 0, 30, 60 y 180 segundos de incubación luego de iniciada la reacción al adicionar una solución de ATP 2,5 mM y MgCl_2 3,5mM a una solución de sacarosa 250mM, Hepes-BTP 25mM pH 7.0, KCl 20mM, FCCP 1 μM , NaN_3 0,4mM, EGTA 100 μM , $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 10 μM y con fracciones microsomales que contenían 50 μg de proteína, luego del tiempo transcurrido, las fracciones microsomales fueron atrapadas en un filtro de celulosa con poros de 0,45 μm de diámetro utilizando un sistema de filtración al vacío. Para detener la reacción después de transcurrido cada intervalo de tiempo, la solución fue filtrada al vacío y luego fueron agregados 4 mL de tampón "Stop" frío (sacarosa 250mM, Hepes-BTP 2,5mM pH 7,0 y CaCl_2 0,2mM), posteriormente los filtros son retirados y la radioactividad asociada a estos fue determinada mediante conteo con líquido de centelleo. La actividad se graficó en nmoles de $^{45}\text{Ca}^{2+}/\mu\text{g}$ de proteína en función del tiempo, el transporte activo se determinó comparando la actividad en presencia o ausencia de ATP. Para evaluar el efecto de tapsigargina, la mezcla de reacción se preincubó con una solución 1 μM de esta droga por 10 minutos.

Obtención de IC₅₀ de AtHMA1 en presencia de tapsigargina

Para la obtención de la concentración de inhibidor que disminuye a la mitad la actividad máxima (IC₅₀) de AtHMA1 en presencia de tapsigargina como inhibidor se utilizó el mismo protocolo mencionado anteriormente para el ensayo de transporte de Calcio, sólo que para cada punto se realizó una preparación incubada con una concentración de tapsigargina definida. Las concentraciones de tapsigargina usadas fueron 5nm, 10nm, 50nm, 100nm, 500nm, y 1µm, y cada reacción fue detenida al cabo de 60 segundos con el tampón "Stop" frío (sacarosa 250mM, Hepes-BTP 2,5mM pH 7,0 y CaCl₂ 0,2mM).

Obtención de la Km aparente de AtHMA1

Para obtener la Km aparente, fue determinado el transporte de calcio a un tiempo constante de 60 segundos, variando la concentración de calcio. Las concentraciones de calcio libre utilizadas en las soluciones de reacción fueron: pCa²⁺ 5,5; pCa²⁺ 6,0; pCa²⁺ 6,2; pCa²⁺ 6,4; pCa²⁺ 6,6; pCa²⁺ 6,8; pCa²⁺ 7,0; y pCa²⁺ 7,2.. Para obtener los valores exactos de calcio libre en solución, se utilizó el programa WinMax Chelator (Bers y col, 1994).

Fraciones microsomales para ensayos de actividad ATPásica

Para preparar vesículas de levadura escogimos el protocolo utilizado en Eren y Argüello (2004) con ciertas modificaciones. A partir de un pre-inóculo de 2 días fueron inoculados 300mL de medio mínimo correspondiente, éste fue llevado hasta una D.O.₆₀₀ entre 1,0 y 2,0. Luego se centrifugó a 4.000xg por 5 minutos, y fue descartado el sobrenadante. El sedimento fue lavado con agua destilada y posteriormente fue agregado un volumen de tampón (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, sacarosa 250 mM, ácido ascórbico 10 mM, además de una mezcla de inhibidores de proteasas (PMSF 1mM, leupeptina 1µg/µL, pepstatina 1µg/µL) y un volumen igual de perlas de vidrio de 500 µm de diámetro. La mezcla fue agitada en un vortex por 30 segundos cuatro veces y se centrifugó por 20 minutos a 10.000xg y 4°C. Fue rescatado el sobrenadante y centrifugado a 108.000xg por una hora usando el rotor Sorvall T647,5. Luego el sobrenadante fue descartado y el sedimento fue resuspendido en 200µL de tampón de suspensión (Tris-HCl 10 mM pH 7,4, sacarosa 250 mM, ácido ascórbico 0,2 mM más PMSF 1mM, leupeptina 1µg/µL, pepstatina 1µg/µL). Fue alicuotado y almacenado a -80°C.

Ensayos Actividad ATPásica

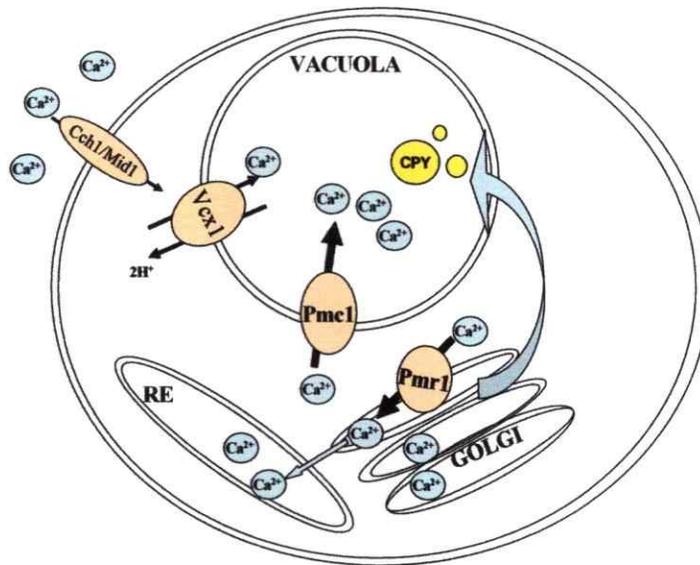
Se usó el protocolo descrito en Eren y Argüello (2004). Cada solución de ensayo estuvo compuesta por Tris-HCl 50mM pH 7,5, MgCl₂ 3mM, ATP 3mM, Cisteína 20 mM, DTT 1 mM, saponina 0,5 mg/mL, proteína obtenida desde las fracciones microsomales para ensayos de actividad ATPásica 50 µg/mL), y cada una con 1 µM de la sal del catión correspondiente (CdCl₂, CuCl₂, CaCl₂, CoCl₂ ó MnCl₂). Cada una de estas soluciones fueron incubadas durante 15 minutos a 30°C. El fosfato inorgánico liberado fue medido mediante la prueba de AMES descrito según Lanzetta y col 1979

RESULTADOS

AthMA1 es una Calcio-ATPasa inhibible por tapsigargina

La homeostasis de calcio en *S. cerevisiae* está controlada por canales de calcio en la membrana plasmática como Cch1p, por el contra transportador protón/calcio Vcx1p presente en vacuola y de dos Calcio-ATPasas, una de vacuola, Pmc1p y otra de aparato de Golgi, Pmr1p, esta última involucrada directamente en procesos de glicosilación, destinación celular y transporte de calcio hacia el retículo endoplásmico (Figura2A). Para determinar si AthMA1 es una Calcio-ATPasa, utilizamos la complementación funcional en las cepas de levaduras mutantes Apmr1 y K616 (Ton & Rao 2004; Durr y col. 1998; Liang y col. 1997) (Tabla 3). La estrategia consiste en transformar estas cepas mutantes con un vector de expresión en levaduras que posee el ADNc de la Calcio-ATPasa en cuestión, en nuestro caso AthMA1, y de esta manera recuperar la funcionalidad que se ve reflejada en la capacidad de crecer en un medio pobre en calcio (Durr y col. 1998; Liang y col. 1997). Otra característica fenotípica de las mutantes deficientes en el transporte de calcio en el aparato de Golgi, es la deficiente destinación de la carboxipeptidasa Y (CPY) hacia el medio extracelular cuando normalmente tiene una destinación vacuolar (Durr y col. 1998) (Figura 2B)

A



B

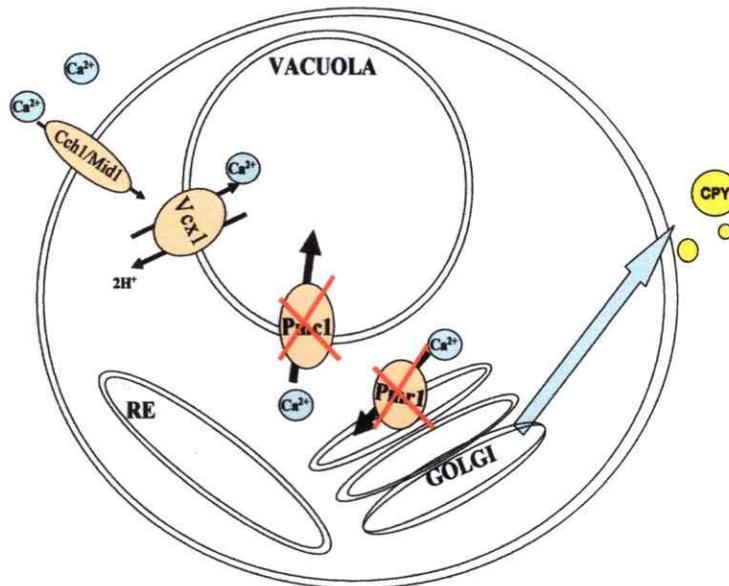


Figura 2. Homeostasis de Calcio en *S.cerevisiae*. A) Este sistema que incluye canales de calcio en la membrana plasmática como Cch1p (calcium channel 1), un contrantransportador Calcio-protón, Vcx1p en vacuola. Consta de sólo dos Ca^{2+} -ATPasas: Pmc1p de vacuola y Pmr1p de aparato de Golgi, esta última, además está involucrada directamente en el transporte de calcio hacia el retículo endoplásmico (RE), y en la destinación vacuolar de carboxipeptidasa Y (círculos amarillos) B) La cepa mutante no posee dichas bombas Ca^{2+} -ATPasas y presenta fenotipos característicos como la localización extracelular de CPY y de su incapacidad de crecer en medios con concentraciones de calcio estándar, los cuales deben ser suplementados con calcio adicional.

Transformamos el vector que contiene el ADNc de AtHMA1 en las levaduras mutantes Δ pmr1 y K616. Como resultado obtuvimos que la mutante que posee el ADNc de AtHMA1 es capaz de crecer en un medio empobrecido en calcio mediante la adición de 10mM EGTA, sin embargo, la cepa mutante que porta el vector vacío no es capaz de crecer en este medio pobre en calcio, y como control de que las características del medio sólo afectan a las cepas mutantes Δ pmr1 y K616, observamos que la cepa parental que porta el vector vacío también es capaz de crecer en este medio. (figura 3A). Este resultado sugiere que AtHMA1 complementa la función calcio-ATPasa en las levaduras mutantes.

Además, pudimos observar que, la mutante transformada con el vector vacío presentó deficiencias en la destinación de la carboxipeptidasa Y, ya que se pudo detectar mediante dot-blot la presencia de CPY en el medio de cultivo. En cambio, en la levadura mutante que posee el vector que porta a AtHMA1 no encontramos CPY en el medio (figura 3B); todas las muestras poseen CPY en el lisado del sedimento celular. Lo que nos entrega una segunda evidencia de que AtHMA1 se encuentra funcionando como Calcio-ATPasa.

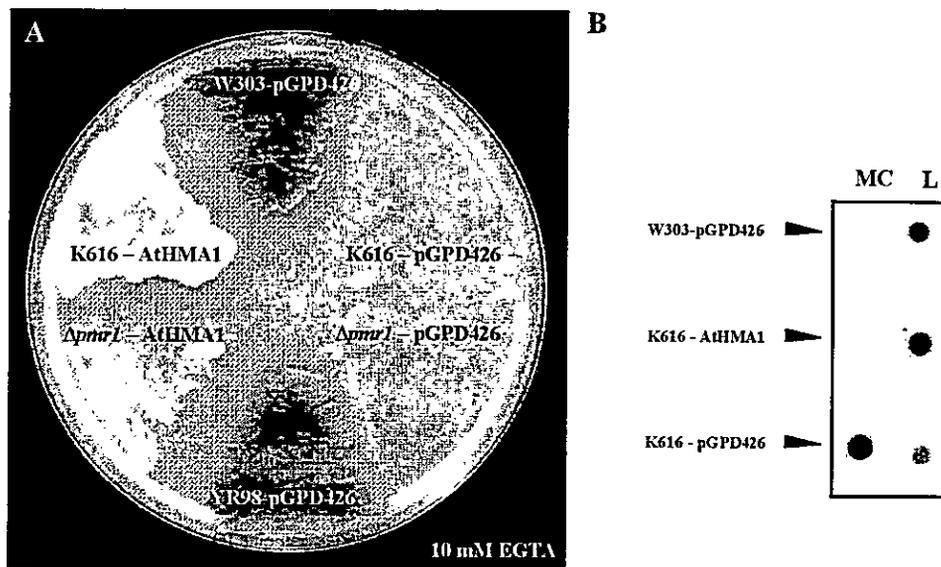


Figura 3. AtHMA1 complementa funcionalmente a las cepas $\Delta pmr1$ y K616. (A) $\Delta pmr1$ + AtHMA1 y K616+ AtHMA1, $\Delta pmr1$ -pGPD426 y K616-pGPD426 y sus parentales Y98 y W303 respectivamente transformados con el vector pGPD426 vacío, fueron cultivadas en una placa de medio mínimo Ura⁺, empobrecida de calcio con 10mM EGTA durante dos días a 30°C. (B) Dot-blot que indica la presencia de carboxipeptidasa Y (CPY) en el medio de cultivo líquido (MC) de K616+ AtHMA1, K616-pGPD426 y W303-pGPD426 y de un lisado de células de estos mismos cultivos (L)

Los ensayos de complementación funcional nos dan una buena aproximación del papel que realiza AtHMA1 en el sistema heterólogo, pero para verificar que AtHMA1 es capaz de transportar calcio, realizamos ensayos de actividad ATPásica y de transporte de Ca^{2+} . Para el ensayo de actividad ATPásica en fracciones microsomales, medimos el fosfato inorgánico liberado en respuesta a la inducción con algún metal para tener una aproximación de la actividad, ya que el transporte a través de bombas ATPasas está ligado con la hidrólisis de ATP. En este caso utilizamos la cepa Δpmr1 inducida por $1\mu\text{M}$ CaCl_2 , y observamos como dicha actividad claramente se incrementa con respecto al control Δpmr1 transformado con el vector vacío. Por otro lado, en presencia de $1\mu\text{M}$ de tapsigargina, no se ve este aumento, alcanzando niveles muy similares a la de la levadura portadora del vector vacío (Figura 4).

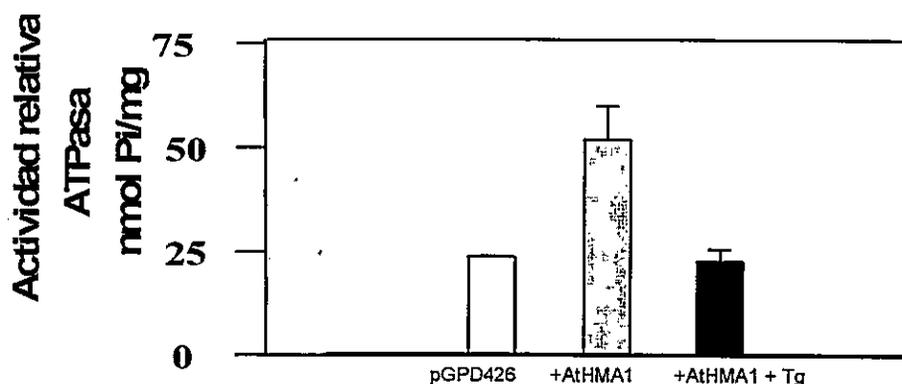


Figura 4. Actividad ATPásica dependiente de calcio. Se midió la actividad ATPásica dependiente de calcio en las cepas mutantes Δpmr1 -pGPD426 ("vector vacío", barra blanca), Δpmr1 -AtHMA1 (barra gris) y Δpmr1 -AtHMA1 en presencia de $1\mu\text{M}$ de tapsigargina (Tg), barra negra.

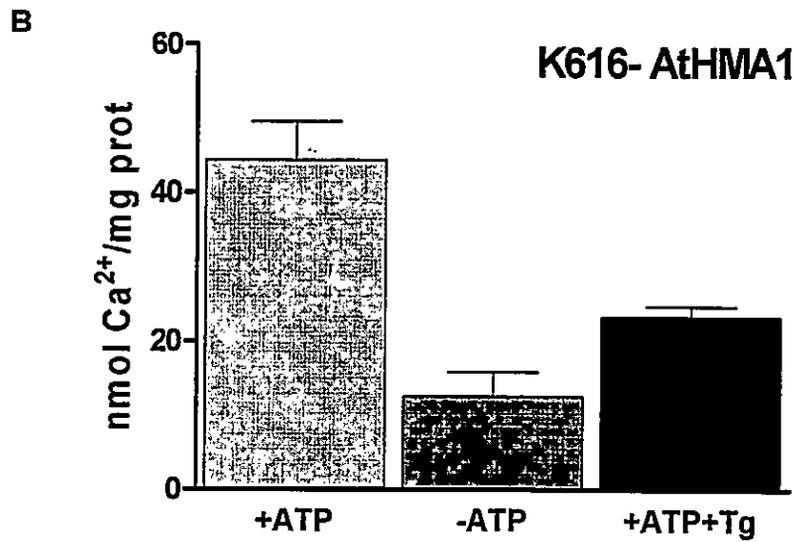
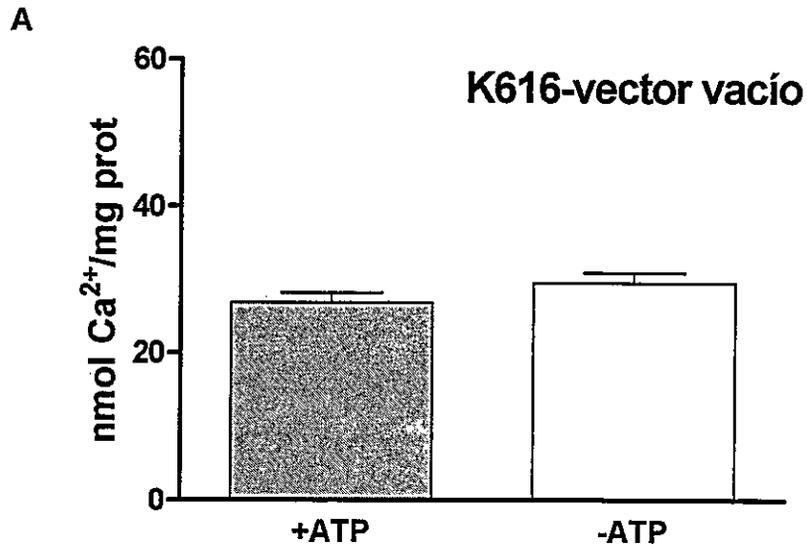


Figura 5. Captación de calcio inducido por ATP. (A), Captación realizada en fracciones microsómicas de la cepa de levadura mutante K616- vector vacío en presencia y ausencia de ATP. **(B)** Captación de calcio en fracciones microsómicas de la cepa de levadura mutante K616-AtHMA1 en presencia y ausencia de ATP y en presencia de ATP y 1 μ M tapsigargina (Tg)

Luego de determinar que AtHMA1 en efecto posee una actividad Ca^{2+} -ATPasa, continuamos con la determinación de las propiedades cinéticas asociadas al transporte. Para ello determinamos la K_m y el valor de IC_{50} para la inhibición por tapsigargina. Para la determinación de la K_m , que es la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, y en este caso la mitad de la velocidad máxima de transporte, realizamos la medición de transporte a un mismo tiempo y a diferentes concentraciones de calcio obteniendo un valor de $0,37\mu\text{M}$ ($3,7 \cdot 10^{-7}$) (Figura 6A).

Para determinar la especificidad de la inhibición del transporte provocado por tapsigargina, es decir, el valor de IC_{50} , que es la concentración de inhibidor necesaria para disminuir a la mitad la actividad de AtHMA1, nos arrojó como resultado una IC_{50} de $16,74 \text{ nM}$ al ir variando la concentración del inhibidor. (Figura 6B)

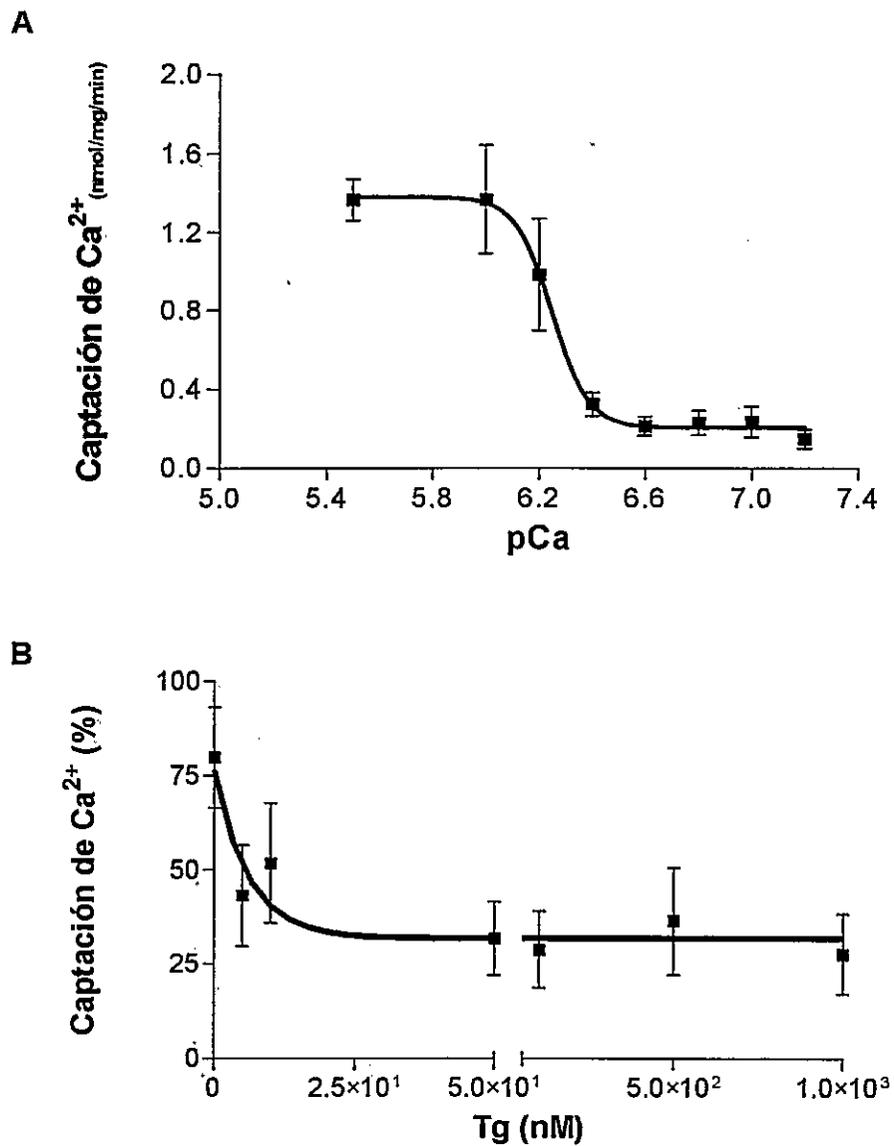


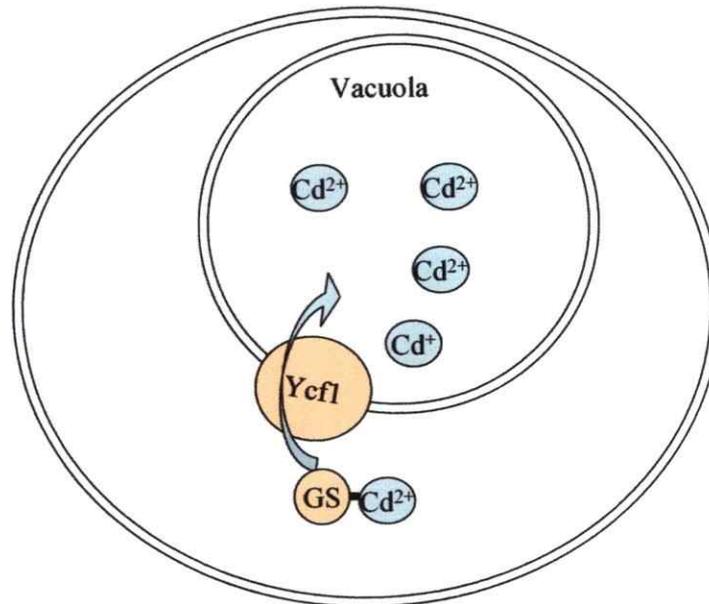
Figura 6. Parámetros cinéticos asociados con el Transporte de Calcio.

(A) Curva para determinar la concentración de calcio con la que se obtiene la mitad de la velocidad máxima (K_m) de AtHMA1 en fracciones microsomales de levadura K616-AtHMA1. **(B)**, Curva de inhibición por Tg en fracciones microsomales de levadura K616-AtHMA1

AtHMA1 actúa como MetalPesado ATPasa de cadmio

Por otro lado, y dado que AtHMA1 ha sido clasificado dentro de las metal-pesado ATPasas, se ha propuesto que AtHMA1 sería una cadmio ATPasa dado su similitud de secuencia con Cadmio/Zinc-ATPasas (Axelsen & Palmgren 2001), por ende estaría involucrada en la tolerancia a dicho metal. Para corroborar esto, volvemos a recurrir al ensayo de complementación funcional, pero en este caso utilizamos la levadura mutante $\Delta ycf1$ (Tabla 3) la cual es sensible a altas concentraciones de metales pesados. El gen mutado en estas levaduras codifica para Ycf1p (yeast cadmium factor 1) y es la principal vía de destoxificación que posee la levadura para tolerar el estrés causado por metales divalentes (Li y col 1997; Li y col 1996) (Figura 7). De esta manera el ensayo de complementación consiste en recuperar la tolerancia a altas concentraciones de metales en el medio, en este caso cadmio, mediante la transformación de la cepa mutante $\Delta ycf1$ con el ADNc de AtHMA1. (Gravot y col 2004)

A



B

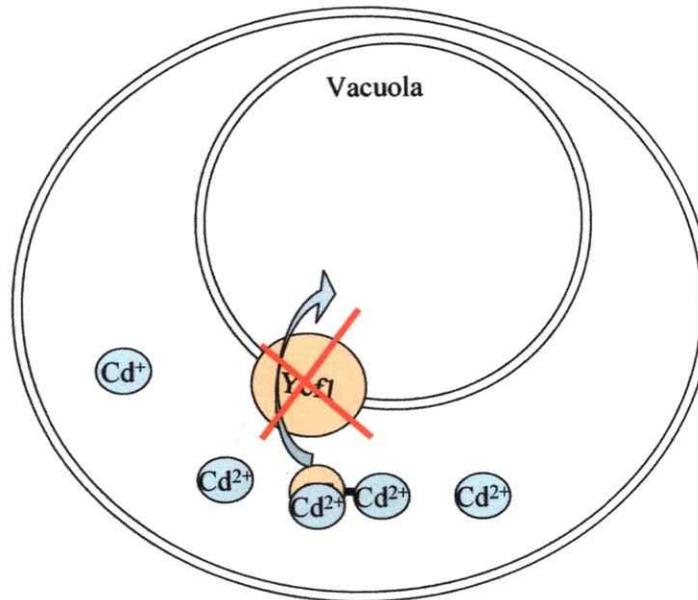


Figura 7. Tolerancia a metales pesados en *S.cerevisiae*. (A)Ycf1p, (Yeast Cadmium Factor 1) es un transportador del tipo ABC, que transporta metales divalentes conjugados con glutatión (GS) al interior de la vacuola, como es el caso de cadmio, donde son acumulados. **(B)** La cepa mutante $\Delta ycf1$, no posee este transportador, lo que se manifiesta en un fenotipo hipersensible a metales pesados.

En el experimento de complementación funcional en la cepa de levadura $\Delta ycf1$ (mutante sensible a altas concentraciones de metales) observamos que en un medio con alta concentración de Cd^{2+} ($70\mu M$) podemos ver que la mutante sensible que porta al vector vacío es incapaz de crecer, en cambio la levadura mutante complementada con AtHMA1 es capaz de crecer en este medio al igual que la levadura silvestre (Figura 8). Este resultado nos indica que AtHMA1 complementa funcionalmente el papel que cumple Ycf1p en la tolerancia a cadmio, lo que nos lleva a sugerir que AtHMA1 estaría funcionando como una Cd^{2+} -ATPasa.

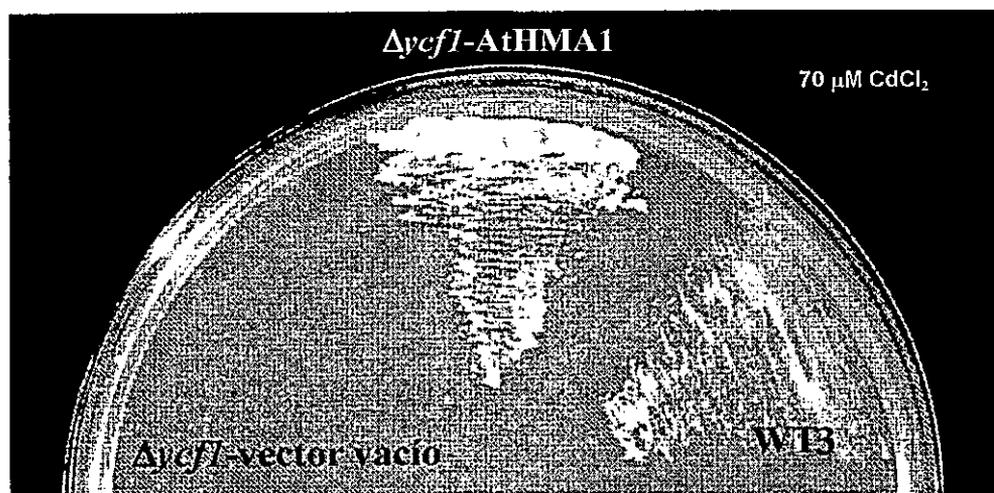


Figura 8. Complementación funcional de AtHMA1 en $\Delta ycf1$. Las cepas transformantes $\Delta ycf1$ + AtHMA1, $\Delta ycf1$ -vector vacío, y la cepa parental con el vector vacío (WT3) fueron cultivadas en una placa de medio mínimo Ura^r, suplementado con CdCl₂ 70 μM durante dos días a 30°C.

Además del cultivo en placas, se observó el crecimiento en cultivo líquido de medio mínimo con agitación a 30° durante 21 horas para cada caso, a diferentes concentraciones de CdCl₂. Aquí pudimos observar claramente como la mutante Δ ycf1-vector vacío es sensible a concentraciones por sobre CdCl₂ 70μM, la levadura silvestre disminuye su crecimiento a medida que aumenta la concentración del metal, aparentemente deteniéndose a CdCl₂ 100μM, en cambio la mutante transformada con AtHMA1, presenta un crecimiento lento pero constante e invariable sin influir la concentración del metal en el medio. (Figura 9)

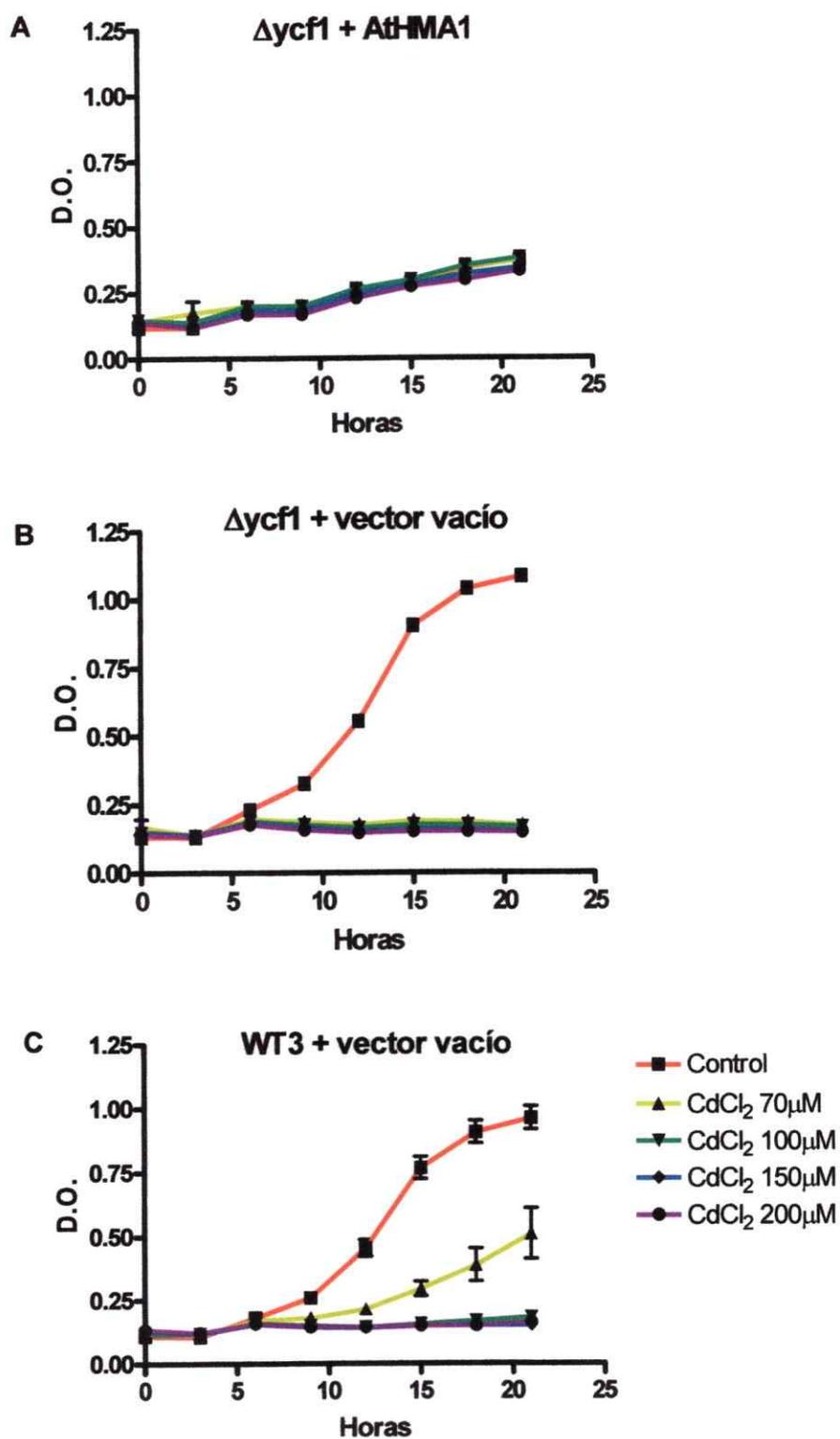


Figura 9. AtHMA1 confiere tolerancia a cadmio en levaduras mutantes sensibles. Curvas de crecimiento de $\Delta ycf1 + AtHMA1$ (A) $\Delta ycf1 + vector$ vacío (B) y DTY165 + p426GPD (WT3 + vector vacío) (C) a diferentes concentraciones de $CdCl_2$. Los datos fueron registrados durante lapsos de 3 horas durante 21 horas.

Previamente fue demostrado como tapsigargina inhibe el transporte de calcio atribuido a AtHMA1 en fracciones microsomales de levadura, dado esto y si la acción de tapsigargina es específica para AtHMA1 procedimos a probar si el transporte de cadmio, también atribuido a AtHMA1, es inhibido por tapsigargina. El experimento fue realizado en fracciones microsomales obtenidas desde las diferentes cepas de $\Delta ycf1$ transformadas, luego procedimos a medir la actividad ATPásica (liberación de fosfato inorgánico) dependiente de diferentes cationes, tales como: Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} . El resultado fue que sólo hubo diferencias para el caso de la inducción con Cadmio, donde la diferencia en actividad ATPásica entre $\Delta ycf1 + AtHMA1$ es significativamente diferente a las actividades de $\Delta ycf1$ -vector vacío y de $\Delta ycf1-AtHMA1$ en presencia de $1\mu M$ tapsigargina, y estas últimas resultaron no ser significativamente diferentes entre ellas (Figura 10). Este resultado da cuenta que la actividad ATPásica en cepas $\Delta ycf1$ transformantes es inducida por cadmio, y esta inducción es inhibida por tapsigargina, lo que nos sugiere que AtHMA1 posee actividad Cadmio-ATPasa y que esta actividad es inhibible por tapsigargina.

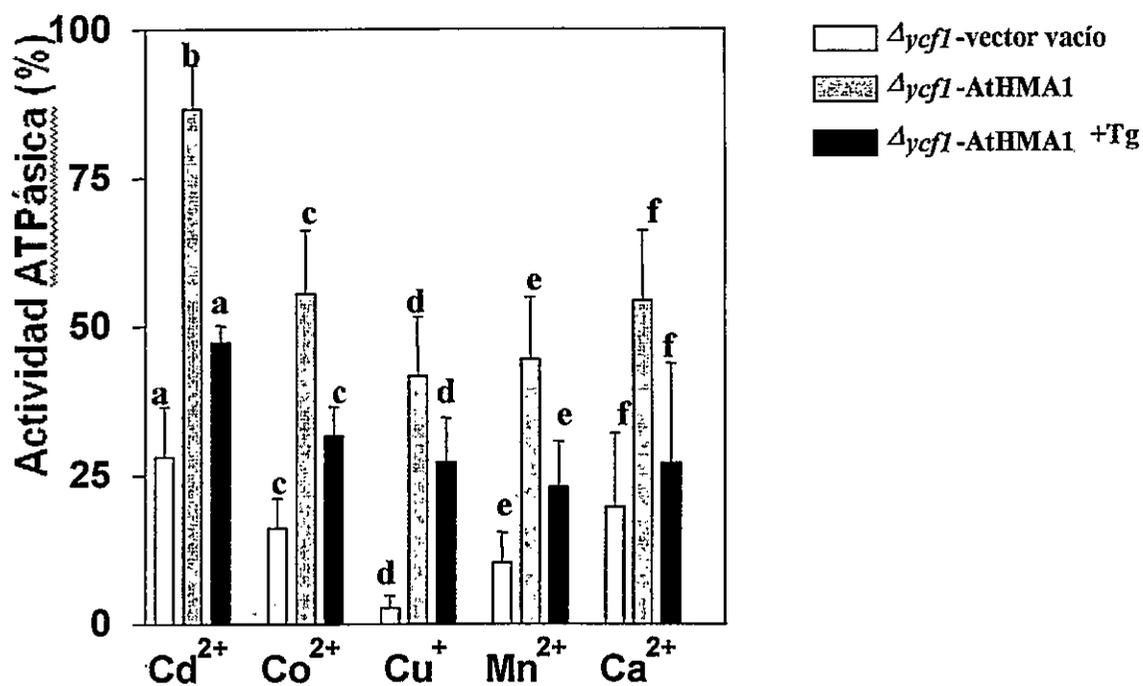
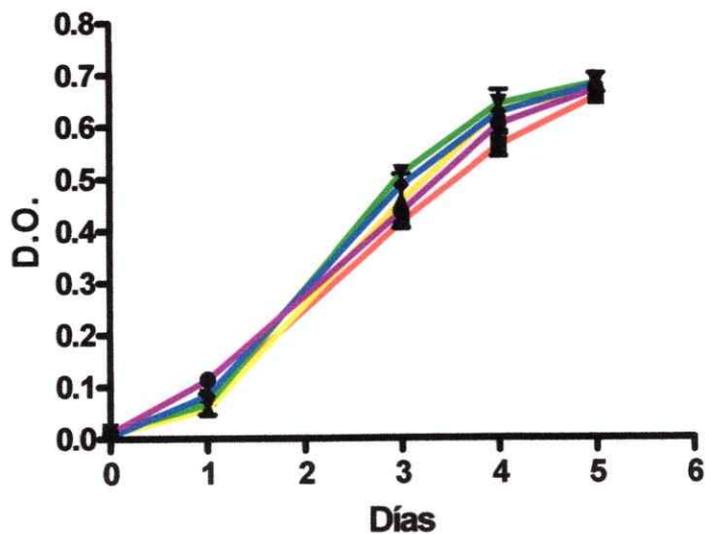


Figura 10. La Actividad ATPásica de AtHMA1 se ve inducida por Cd^{2+} . Actividad ATPásica en fracciones microsomales de $\Delta ycf1$ -vector vacío, $\Delta ycf1$ -AtHMA1 y $\Delta ycf1$ -AtHMA1 + tapsigargina (Tg) inducida por diferentes cationes. Las barras indican el error estándar. Letras indican diferencias significativas entre grupos inducidos por un mismo catión ($p < 0,05$; $n=9$). A todos los casos se les aplicó un test de análisis de varianza (ANOVA) de una vía usando el programa Instat3.

Dado que observamos que AtHMA1 confería resistencia a cadmio en la cepa mutante $\Delta ycf1$, transformamos cepas de levadura parentales (W303) con el vector vacío y con el que porta a AtHMA1, con el fin de saber si AtHMA1 es capaz de conferir esta resistencia a cadmio sin necesidad de estar complementando una función en una cepa de levadura mutante. Los cultivos en medio mínimo fueron sometidos a diferentes concentraciones de $CdCl_2$ con agitación y a $30^\circ C$, y observamos que, si bien el crecimiento de la levadura que porta a AtHMA1 es mucho más lento, no presenta diferencias frente a las diferentes concentraciones de metal en el medio (Figura 11A). Por el contrario, en la levadura silvestre se observa como disminuye su crecimiento conforme aumenta la concentración de metal en el medio (Figura 12B). Este resultado demuestra que AtHMA1 es un factor capaz de conferir tolerancia a metales pesados a levaduras

A

WT2 + AtHMA1



B

WT2 + vector vacío

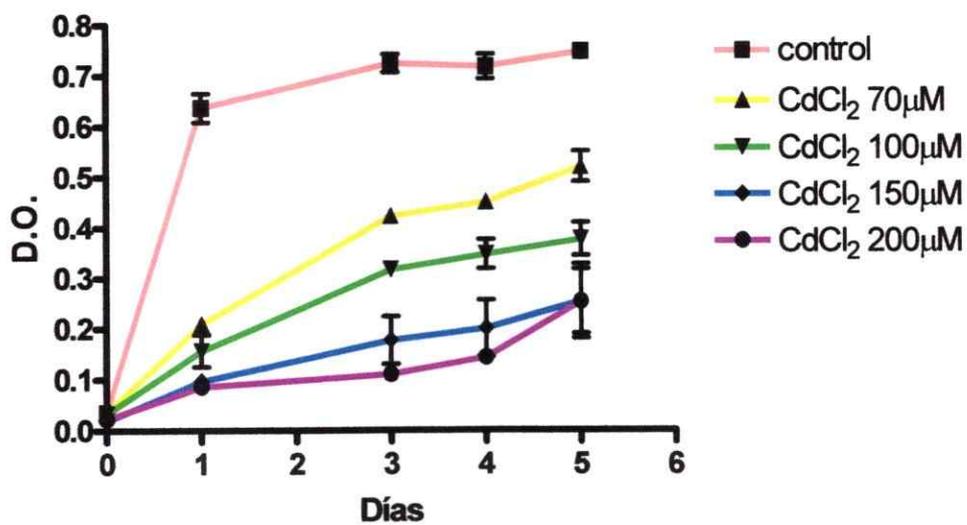


Figura 11. AtHMA1 aumenta la tolerancia a Cd²⁺ en levaduras parentales. (A) Curvas de crecimiento de W303 (cepa de levadura silvestre) transformado con AtHMA1 (WT2+ AtHMA1) frente a diferentes concentraciones de cloruro de cadmio. (B) Curvas de crecimiento de W303+vector vacío (WT2+ vector vacío) frente a diferentes concentraciones de cloruro de cadmio.

AtHMA1 posee actividad Cu^{2+} -ATPasa

Continuando con la caracterización de AtHMA1 como una Metal pesado-ATPasa, nos enfocamos en determinar si también posee actividad Cobre-ATPasa. Para ello utilizamos el ensayo de complementación de la mutante Δccc2 (Tabla 3). En la homeostasis de cobre y hierro en *S. cerevisiae* el cobre entra por el transportador Ctr1p (Dancis y col 1994), y luego rápidamente es secuestrado por chaperonas como Atx1p, ya que el cobre, si bien es vital, en grandes cantidades es letal para la célula. Ya dentro de la célula el cobre es transportado vía Ccc2p, una Cobre-ATPasa, hacia el interior del aparato de Golgi para ser usado como cofactor para Fet3p (una cobre oxidasa) que en conjunto con Fet1p forman un complejo que trasloca hacia la membrana plasmática y permite la entrada de hierro con alta afinidad a la célula. Además de este transportador existe Fet4p que es un transportador de hierro de baja afinidad, ambos son las piezas encargadas de la entrada de hierro a la célula. Una levadura mutante deficiente en Ccc2p es incapaz de formar el transportador de alta afinidad por hierro Fet1p-Fet3p, y éste sólo es capaz de entrar a la célula con baja afinidad vía Fet4p, entonces el ensayo consiste en que si el medio es pobre en hierro, éste no será capaz de entrar en cantidades suficientes a la célula provocando su muerte, a menos que AtHMA1 sea capaz de complementar la función de Ccc2p que es transportar cobre al interior del aparato de Golgi. (Southon y col 2004) (Figura 12).

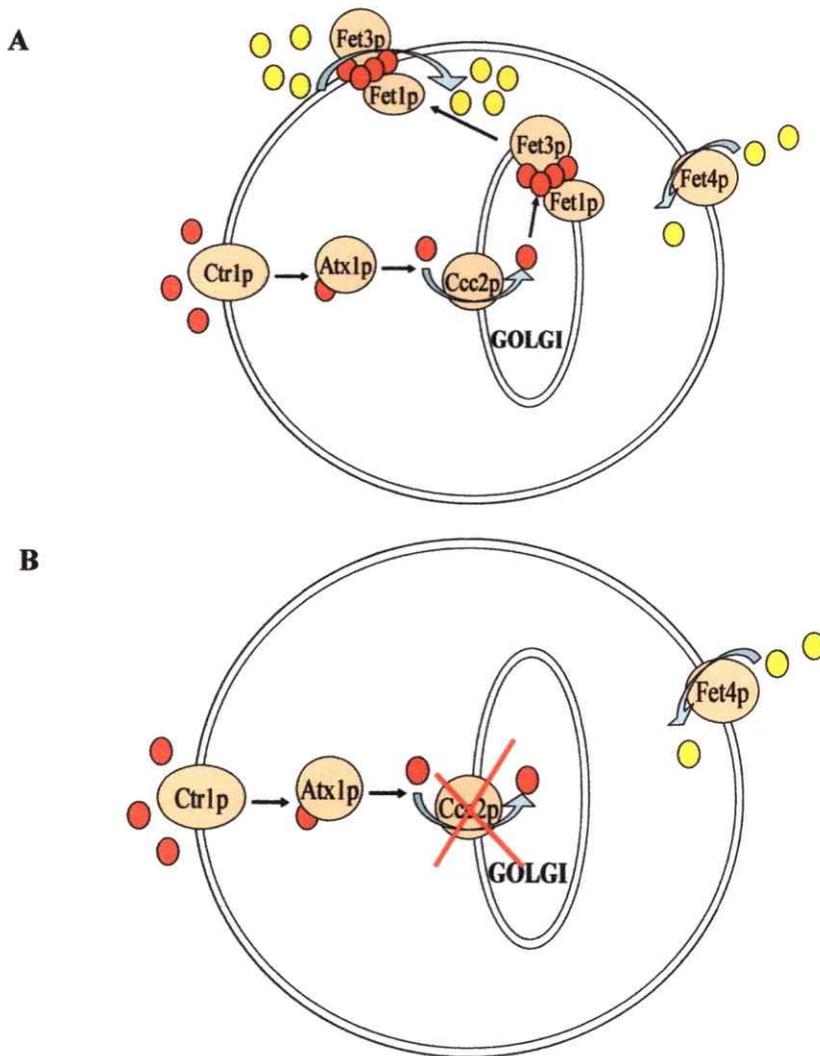


Figura 12. Homeostasis de hierro y cobre en *S. cerevisiae*. (A) El cobre entra a la célula mediante Ctr1p y es secuestrado por chaperonas tales como Atx1p. Ccc2p es una Cu²⁺-ATPasa que transporta cobre dentro del aparato de Golgi el cual actúa como cofactor para la formación del complejo Fet1p- Fet3p, un transportador de hierro de alta afinidad, que transloca hacia la membrana plasmática, incrementando el transporte de hierro hacia la célula que también se encuentra regulado por el transportador de hierro de baja afinidad Fet4p que se encuentra presente en forma constitutiva. B) En la mutante $\Delta ccc2$, no hay transporte de cobre hacia el aparato de Golgi para la formación del complejo Fet1p-Fet3p lo que provoca una disminución de la entrada de hierro a la célula, ya que su ingreso es mediado solamente por el transportador de baja afinidad Fet4p. Esto hace a esta mutante sensible a medios de crecimiento empobrecidos en hierro. Círculos rojos representan cobre, círculos amarillos representan hierro.

El ensayo de complementación se realiza en un medio empobrecido de hierro mediante la adición de 2mM ferrozina. En estas condiciones, Δ ccc2-AtHMA1 crece a niveles incluso mayores que en el caso de la cepa parental con el vector vacío, y que la cepa Δ ccc2-vector vacío, la cual creció aún menos luego de 21 horas de cultivo (Figura 13A). Estas diferencias nos sugieren que AtHMA1 también complementa funcionalmente a una cepa mutante que no posee la cobre-ATPasa Ccc2p.

Además, las mutantes Δ ccc2 complementadas con AtHMA1 mostraron una mayor tolerancia a diferentes concentraciones de cobre con respecto a la cepa de levadura mutante transformada con el vector vacío (Figura 13B). Esto refuerza el hecho de que AtHMA1 funciona como una cobre-ATPasa, sin embargo en este caso su forma de acción es más similar al de detoxificación relacionado con los transportadores de vacuola que con las bombas de aparato de Golgi.

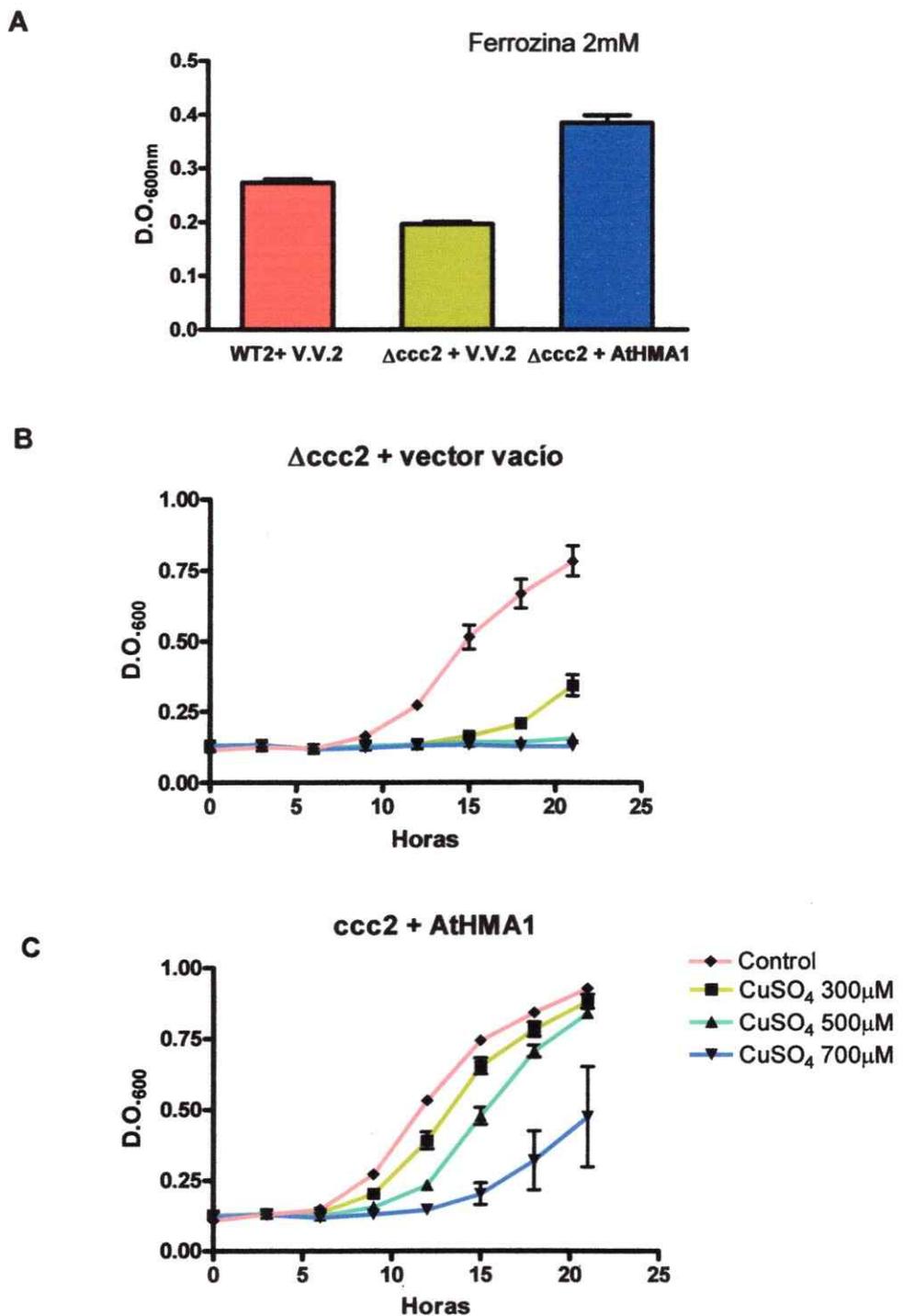


Figura 13. AtHMA1 complementa funcionalmente a la cepa mutante Δ ccc2. (A) Medición de D.O. ₍₆₀₀₎ a las 21 horas, en cultivos con limitación de hierro disponible mediante la adición de Ferrozina 2mM, levadura parental (WT2+vector vacío) en rojo, Δ ccc2+ Vector vacío en verde y Δ ccc2+ AtHMA1 en azul (B) Curvas de crecimiento de Δ ccc2+ Vector vacío a diferentes concentraciones de CuSO₄ (C) de Δ ccc2+ AtHMA1 a diferentes concentraciones de CuSO₄. Los datos fueron registrados durante lapsos de 3 horas durante 21 horas.

Discusión

AtHMA1 ha sido clasificada dentro de las Metal Pesado ATPasas (Axelsen & Palmgren 2001). Sin embargo, nuestros resultados de complementación funcional y de transporte, nos indican que además de comportarse como una metal pesado ATPasa al complementar las cepas de levadura mutante $\Delta ycf1$ (Figura 8) y la cepa $\Delta ccc2$ (Figura 13) lo hace también como una calcio ATPasa al complementar funcionalmente a las levaduras deficientes en este transporte (Figura 3), y a su vez al demostrar su similitud con SERCA1 que va más allá del parecido en la secuencia (Figura 1), ya que también es específicamente inhibida por el fármaco tapsigargina (Figuras 5 y 6). El transporte Calcio-Cadmio, ya se ha visto en un transportador de trigo, LCT1, lo que nos entrega una prueba de que existe la posibilidad que un mismo transportador pueda ser capaz de transportar calcio y cadmio (Clemens y col 1998) tal como nosotros proponemos. Además si bien es consistente con los resultados publicados acerca de AtHMA1 que la clasificarían como una cobre-ATPasa (Seigneurin-Berny y col 2005), en este trabajo utilizan una expresión heteróloga de una versión trunca de AtHMA1 en una cepa de parental de levadura, ya que no logran obtener levaduras transformantes con la versión completa del ADNc de AtHMA1

Trabajos previos utilizando herramientas bioinformáticas y proteómica demuestran que AtHMA1 estaría localizada en la membrana que envuelve el cloroplasto en la célula vegetal (Anderson y Sandelius 2004). Nuestros experimentos si bien sugieren que AtHMA1 estaría localizada en aparato de Golgi y/o la vacuola de levadura, su localización subcelular no necesariamente es la misma que en planta (Sassham y Raikhel 2000). Además, la expresión heteróloga de un producto génico que muy posiblemente posea una señal de destinación a cloroplasto no tendría una destinación clara en un sistema que no posea cloroplastos, por lo que análisis de la localización subcelular se hacen necesarios,

ya que no podemos predecir si se encuentra en uno o varios organelos y si esa localización es dependiente de alguna condición en especial como deficiencia de calcio en el aparato de Golgi o alta concentración de cadmio en el medio. Por el momento, la correcta localización subcelular de AtHMA1 en la planta sigue sin ser completamente clara.

AtHMA1, una calcio-metal pesado ATPasa puede presentar una actividad más específica, es decir, que se favorezca el transporte de calcio, o de metales pesados según cual sea el contexto, un ejemplo es que la actividad inducida por calcio en fracciones de $\Delta ycf1$ no mostró diferencias entre la mutante silvestre portadora del vector vacío y la que porta el ADNc de AtHMA1, seguramente debido a la existencia de las calcio-ATPasas endógenas que enmascararon la actividad de AtHMA1 como calcio-ATPasa y que AtHMA1 estaría supliendo mayoritariamente las necesidades de la mutante en cuanto a transporte de metales al interior de la vacuola. Es más, las características que le confiere resistencia a metales pesados muy por sobre de las cepas no portadoras de AtHMA1, nos habla de la posible compartimentalización del metal dentro de la vacuola u otros reservorios intracelulares. Sin embargo, observamos que las tasas de crecimiento son mucho más bajas (Figuras 9 y 11), lo cual puede explicarse por el efecto de esta ATPasa que no tan sólo requiere energía para su formación sino que también exigiría más ATP a la célula para poder llevar a cabo el proceso de transporte. Sin embargo, las cualidades que manifiesta AtHMA1 en este sistema heterólogo podría llevarla a ser un posible candidato para un elemento que tenga el fin de conferir las características de resistencia y compartimentalización de metales pesados. Esta característica podría ser aprovechada y aplicada a procesos con fines de bioremediación o recaptación de estos para su reincorporación en el proceso productivo metalúrgico. Si bien por un lado, AtHMA1 se convierte en la mejor candidata para ser la Calcio-Metal pesado ATPasa de aparato de Golgi descrita en la literatura, la evidencia que indica que

ésta se localizaría en cloroplasto nos lleva a proponer a AtHMA1 como un posible elemento clave para sobrellevar la carencia de iones al interior del organelo, o bien como una herramienta para la detoxificación y la posible adaptación de *Arabidopsis thaliana* a un medio adverso.

Conclusiones

- AtHMA1, complementa funcionalmente levaduras mutantes en el transporte de calcio, por lo que AtHMA1 funciona como una Ca^{2+} ATPasa en este sistema.
- AtHMA1, también complementa funcionalmente levaduras mutantes sensibles a altas concentraciones de cadmio, por lo que AtHMA1 funciona como una Cd^{2+} ATPasa en este sistema.
- AtHMA1, complementa funcionalmente levaduras mutantes en el transporte de cobre hacia el aparato de Golgi, por lo que AtHMA1 funciona como una Cu^{2+} ATPasa en este sistema.
- Además, el transporte de calcio y cadmio asociado a AtHMA1 en fracciones microsomaes, es inhibido por thapsigargina.
- En levaduras parentales auxótrofas, AtHMA1 induce un fenotipo de resistencia a altas concentraciones de cadmio y cobre,
- Por lo tanto, dados los resultados obtenidos de la complementación funcional de AtHMA1 en sistemas heterólogos de levaduras mutantes podemos concluir que: "AtHMA1 actúa como una Calcio-Cadmio-Cobre ATPasa, y que su actividad es inhibida por thapsigargina en fracciones microsomaes de levadura".
- Este trabajo ha sido publicado en The Journal of Biological Chemistry con el título de "AtHMA1 is a thapsigargin-sensitive Ca^{2+} /heavy metal pump" 2008 Apr 11;283(15):9633-41.

Referencias

Andersson M., Sandellius A.S. (2004) **A chloroplast-localized vesicular transport system: a bio-informatics approach** BMC Genomics, 5:40

Axelsen K.B., Palmgren M.G. (2001) **Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in Arabidopsis**. Plant Physiol. Jun;126(2):696-706

Bers, D.M., Patton, C.W., and Nuccitelli, R. (1994) **A practical guide to the preparation of Ca²⁺ buffers** Methods Cell Biol. 40:3-29.

Clemens S., Antosiwicz D., Ward J., Schachtman D., Schroeder J. (1998) **The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast** Proc. Natl. Acad. Sc. USA 95:12043-12048.

Cunningham K., Fink G. (1994) **Ca²⁺ Transport in Saccharomyces cerevisiae** J. Exp. Biol., 196: 157-166.

Dancis A., Haile D., Yuan D.S., Klausner R.D.(1994) **The Saccharomyces cerevisiae copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake** J. Biol. Chem. 269:25660-7

Durr G., Strayle J., Plemper R., Elbs S., Klee S.K., Catty P., Wolf D.H., Rudolph H.K. (1998) The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca^{2+} and Mn^{2+} required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation Mol. Biol. Cell. 9:1149-62.

Eren E., Argüello J.M. (2004) Arabidopsis HMA2, a Divalent HeavyMetal-Transporting PIB-Type ATPase, Is Involved in Cytoplasmic Zn^{2+} Homeostasis Plant Physiology 136:3712-3723

Gietz D., St Jean, A., Woods, R.A., Schiestl, R.H. (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. Nucleic Acids Res. 20:1425.

Gravot A., Liéutaud A., Verret F., Auroy P., Vavasseur A., Richaüd P. (2004) AtHMA3, a plant P1B-ATPase, functions as a Cd/Pb transporter in yeast FEBS Lett. 561:22-8.

Lanzetta P.A., Alvarez L.J., Reinach P.S., Candia O.A. (1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate Anal. Biochem. 100: 95-97.

Li Z., Lu Y., Zhen R.G., Szczypka M., Thiele D.J., Rea P.A. (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in Saccharomyces cerevisiae: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:42-7.

Li Z., Szczypka M., Lu Y., Thiele D.J., Rea P.A. (1996) The Yeast Cadmium Factor Protein (YCF1) Is a Vacuolar Glutathione S-Conjugate Pump J. Biol. Chem. 271:6509-6517.

Liang F., Sze H. (1998) A High-Affinity Ca^{2+} Pump, ECA1, from the Endoplasmic Reticulum Is Inhibited by Cyclopiazonic Acid but Not by Thapsigargin Plant Physiol. 118: 817-825.

Liang F., Cunningham K.W., Harper J.F., Sze H. (1997) ECA1 complements yeast mutants defective in Ca^{2+} pumps and encodes an endoplasmic reticulum-type Ca^{2+} -ATPase in *Arabidopsis thaliana* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 8579-8584.

Mumberg D., Muller R., Funk M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds Gene. 156:119-22.

Ordenes V.R., Reyes F.C., Wolff D., Orellana A. (2002) A thapsigargin-sensitive $\text{Ca}^{(2+)}$ pump is present in the pea Golgi apparatus membrane Plant Physiol. 129:1820-8.

Pinton, P., Pozzant, T. and Rizzuto, R. (1998) The Golgi Apparatus is an inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive calcium store with functional properties distinct from those of the ER. EMBO J. 17 5298-5308.

Sassham D., Ralkhel N.V. (2000) Plant Cells Are Not Just Green Yeast Plant Physiol. 122:999-1001.

Seigneurin-Berny D., Gravot A., Rolland N. (2005) **HMA1, a new Cu-ATPase of the chloroplast envelope, is essential for growth under adverse light conditions** *J Biol Chem* 281:2882-2892

Seki, M., Carnicini, P., Nishiyama, Y., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K. (1998) **High-efficiency cloning of Arabidopsis full-length cDNA by biotinylated CAP trapper** *Plant Journal* 15:707-720.

Seki, M., Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Oono, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Carnicini, P., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Shibata, K., Shinagawa, A., Shinozaki, K. (2002). **Functional Annotation of a Full-Length Arabidopsis cDNA Collection** *Science* 296:141-145.

Southon J.L., Basu U., Taylor G.J. (2004) **Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* ccc2 mutant by a putative P1B-ATPase from *Brassica napus* supports a copper-transporting function** *FEBS Lett.* 566: 218-22.

Stokes D., Green N.M. (2003) **Structure and Function of the Calcium Pump** *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32:445-68.

Ton V., Rao R. (2004) **Functional expression of heterologous proteins in yeast: insights into Ca^{2+} signaling and Ca^{2+} -transporting ATPases** *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287:580-C589.

Williams L., Mills R. (2005) **P_{1B}-ATPases – an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants** *TRENDS in Plant Sci* 10:1360-1385.