

00581

152E2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA.

MODULACION DE LA 2-OXOGLUTARATO  
DESHIDROGENASA Y LA FOSFORILACION  
OXIDATIVA POR  $Mg^{2+}$  Y  $P_i$  EN MITOCONDRIAS  
DE CORAZON.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

(ESPECIALIDAD BIOQUIMICA)

P R E S E N T A :

M. en C. JOSE SALUD RODRIGUEZ ZAVALA



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

272170



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

A mis padres Ismael Rodríguez Torres y María Elena Zavala Luna, y a mi hermana Teresa Rodríguez Zavala, quienes me han brindado siempre su apoyo incondicional.

A mi esposa Maribel Hernández Montes de Oca y a mi hijo Ismael Alexis Rodríguez Hernández, quienes me cedieron su tiempo para el desarrollo de este trabajo y con su amor me han impulsado siempre a seguir adelante.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera especial a los sinodales quienes aportaron correcciones y sugerencias muy importantes para mejorar la calidad de esta tesis.

Dr. Armando Gómez Puyou. (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez. (Facultad de Medicina, UNAM).

Dra. Rosario A. Muñoz Clares. (Facultad de Química, UNAM).

Dr. Edgardo Escamilla Marván. (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

Dra. Marina Gavilanes Ruíz. (Facultad de Química, UNAM).

Dr. Mario Calcagno Montans. (Facultad de Medicina, UNAM).

Dr. Salvador Uribe Carvajal. (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

Agradezco especialmente al Dr. Armando Gómez Puyou, por su apoyo para la realización de los experimentos de síntesis de ATP y por la revisión crítica de los dos manuscritos contenidos en esta tesis.

Agradezco a las siguientes instituciones por su apoyo:

- Al CONACyT por la beca que me otorgó durante la realización de mi trabajo de doctorado y por el financiamiento parcial de este trabajo por los donativos CONACyT 2169-M9304 y CONACyT F-554.

- Al programa PADEP de la UACPyP de la UNAM, por el otorgamiento de las becas PADEP-05354 y PADEP-05345.

## MODULATION OF 2-OXOGLUTARATE DEHYDROGENASE AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION BY $Mg^{2+}$ AND $P_i$ IN HEART MITOCHONDRIA.

José Salud Rodríguez Zavala.

Studies published in the decade of '90 using NMR or fluorescent dyes in cells and mitochondria of different tissues, showed variations in the intracellular  $Mg^{2+}$  concentration in response to different hormones or agonists. All of these reports suggest that  $Mg^{2+}$  might be a second messenger in the cell. However, most of these reports need to be confirmed. These reports prompted us to evaluate the mechanisms of control of the oxidative phosphorylation and the 2-OGDH by  $Mg^{2+}$  and its interplay with other effectors.

The effect of  $Mg^{2+}$  on the oxidative phosphorylation using 2-OG or succinate (plus rotenone) as substrates was assayed. The sensitivity of oxidative phosphorylation to  $Mg^{2+}$  was different when 2-OG or succinate (plus rotenone) were used; the  $K_{0.5}$  for  $Mg^{2+}$  was lower with succinate. The difference in sensitivity to  $Mg^{2+}$  indicated the existence of at least two sites of  $Mg^{2+}$  modulation in the metabolic pathway. The first site at the level of the 2-OGDH and the second localized at the phosphorylating system level (the ATP synthase or the translocator of adenine-nucleotides). It was observed that the increment of  $Mg^{2+}$  activated the  $A_s$ -ADP synthesis, indicating that the  $Mg^{2+}$  activation site in the phosphorylating system was the ATP synthase.

The increment in  $[Mg^{2+}]_m$  increased the membrane potential with 2-OG but not with succinate as substrate. This observation indicated that  $Mg^{2+}$  modulation was accomplished in a site before the site II of the respiratory chain. Thus, the effect of  $Mg^{2+}$  on the 2-OGDH was explored, measuring the pyridine-nucleotides reduction. It was shown that one site of  $Mg^{2+}$  activation was the 2-OGDH. It was also determined that  $P_i$  potentiated the activation of the 2-OGDH by  $Mg^{2+}$ . The effect of  $P_i$  was through the lowering of the  $K_{0.5}$  of the 2-OGDH for  $Mg^{2+}$  and the increment in the  $V_m$ .

The effect of  $P_i$  on the  $Mg^{2+}$  modulation of 2-OGDH in intact mitochondria could be explained by the following possibilities: a) Increments in the external  $P_i$  concentration, elevate the intramitochondrial 2-OG concentration, as a consequence of its exchange with internal  $P_i$ . Thus, the 2-OGDH activity increases with the increment of one of the substrates of the reaction; b) That the increment of external  $P_i$  modifies the intramitochondrial pH value by the activity of the  $P_i/H^+$  simport, and the intramitochondrial pH increment would induce 2-OGDH activation; c) Finally, a direct interaction of  $P_i$  with 2-OGDH in a specific site. To examine these possibilities the use of the isolated 2-OGDH was necessary.

Experiments with the isolated 2-OGDH showed that the activation of 2-OGDH by  $P_i$  is direct. It was determined that this activation was apparent at physiological concentrations of  $P_i$  (< 5 mM), although this activation also occurred at  $P_i$  concentrations higher than 10 mM.

It was also showed that  $Mg^{2+}$ ,  $P_i$ , ADP or ATP modulated the 2-OGDH but the complexes formed by  $Mg^{2+}$  were more potent effectors. The mechanism of activation by  $P_i$ , ADP,  $Mg$ - $P_i$  and  $Mg$ -ADP was by increasing the affinity of 2-OGDH for its substrate and the  $V_m$ . On the other hand, ATP inhibited the 2-OGDH by chelating the free  $Mg^{2+}$  and diminishing the  $V_m$ . It was established the following order of potency:  $Mg$ -ADP >  $Mg$ - $P_i$  > ADP >  $P_i$  >  $Mg^{2+}$ .

Vo. Bo. Tutor

  
Dr. Rafael Moreno Sánchez

## MODULACION DE LA 2-OXOGLUTARATO DESHIDROGENASA Y LA FOSFORILACION OXIDATIVA POR $Mg^{2+}$ Y $P_i$ EN MITOCÓNDRIAS DE CORAZON.

José Salud Rodríguez Zavala

Diversos estudios realizados a partir de la década de los '90 utilizando NMR o indicadores fluorescentes en células y mitocondrias de diferentes tejidos, mostraron que ocurren variaciones en la concentración intracelular de  $Mg^{2+}$  en respuesta a diferentes hormonas y agonistas. Todos estos reportes sugieren que el  $Mg^{2+}$  puede ser un segundo mensajero en la célula. Sin embargo, muchos de estos reportes deben todavía ser confirmados. Estas observaciones nos condujeron a evaluar los mecanismos de control de la fosforilación oxidativa y la 2-OGDH por el  $Mg^{2+}$  y su interrelación con otros efectores.

Se exploró el efecto del  $Mg^{2+}$  sobre la fosforilación oxidativa utilizando 2-OG o succinato (+ rotenona) como sustratos. La sensibilidad a  $Mg^{2+}$  de la fosforilación oxidativa fue diferente al utilizar 2-OG o succinato (+ rotenona) como sustratos, siendo la  $K_{0.5}$  por  $Mg^{2+}$  menor en presencia de succinato. Esta diferencia en sensibilidad al  $Mg^{2+}$  nos sugirió la existencia de por lo menos 2 sitios de modulación por  $Mg^{2+}$  en la vía metabólica. El primero a nivel de la 2-OGDH y el segundo localizado a nivel del sistema fosforilante (la ATP sintetasa o la translocasa de adenin-nucleótidos). Se observó que al incrementar el  $Mg^{2+}$  se activaba la síntesis de ADP-As, indicando que el sitio de activación por  $Mg^{2+}$  es la ATP sintetasa.

El incremento en la  $[Mg^{2+}]_m$  promovió el aumento del potencial transmembranal con 2-OG, pero no con succinato como sustrato. Esta observación nos indicó que la modulación por  $Mg^{2+}$  se realiza en algún sitio antes del complejo II de la cadena respiratoria. Por lo anterior se exploró el efecto del  $Mg^{2+}$  sobre la 2-OGDH, midiendo la reducción de piridin-nucleótidos. En estos experimentos se determinó que un sitio de activación por  $Mg^{2+}$  era la 2-OGDH. Se determinó además que el  $P_i$  potencia la activación de la 2-OGDH por  $Mg^{2+}$ , mediante la disminución de la  $K_{0.5}$  por el catión y el incremento de la velocidad máxima de la reacción.

Para explicar el efecto del  $P_i$  sobre la activación por  $Mg^{2+}$  de la 2-OGDH en las mitocondrias intactas surgieron las siguientes posibilidades: a). Que al incrementar la concentración de  $P_i$  externo, se aumente también la concentración de 2-OG intramitocondrial, como consecuencia de su intercambio con  $P_i$  interno. De esta forma, se incrementa la actividad de la enzima al incrementarse la concentración de uno de los sustratos de la reacción; b). Que al incrementar el  $P_i$  externo, el pH intramitocondrial se modifica por la actividad del simportador  $P_i/H^+$ , y el aumento en el pH intramitocondrial sea el responsable de la activación de la enzima; c). Por último, una interacción directa del  $P_i$  con la 2-OGDH en un sitio específico para su activación. Para examinar estas posibilidades se hizo necesaria la utilización de la 2-OGDH aislada.

Al trabajar con la enzima aislada, se determinó que el  $P_i$  activa a la 2-OGDH mediante una interacción directa. Se determinó además, que esta activación ocurre a concentraciones fisiológicas de fosfato ( $< 5$  mM), aunque también puede ocurrir a concentraciones de  $P_i$  mayores a 10 mM. Se demostró que el  $Mg^{2+}$ , el  $P_i$ , el ADP o el ATP libres modulan la actividad de la 2-OGDH pero que los complejos formados con  $Mg^{2+}$  (Mg- $P_i$ , Mg-ADP, Mg-ATP), son efectores mas potentes. El mecanismo para la activación por el  $P_i$ , el ADP, el Mg- $P_i$  y el Mg-ADP fue mediante el incremento de la afinidad de la 2-OGDH por su sustrato y de la  $V_m$ . Por otro lado, el ATP inhibió a la 2-OGDH secuestrando al  $Mg^{2+}$  libre y disminuyendo la  $V_m$ . Se estableció el siguiente orden de potencia Mg-ADP > Mg- $P_i$  > ADP >  $P_i$  >  $Mg^{2+}$ .

Quisiera expresar mi mas sincero agradecimiento al Dr. Rafael Moreno Sánchez por todo su apoyo, la confianza, la honestidad, la amistad, y sobre todo, por los conocimientos que adquirí desde mi primer día en el departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología.

Este trabajo consta de una revisión bibliográfica publicada en una revista nacional, la participación en otra revisión publicada en una revista nacional, de un trabajo publicado en una revista internacional y de un manuscrito enviado para su publicación a una revista internacional. Dichos trabajos se realizaron en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", bajo la Asesoría del Dr. Rafael Moreno Sánchez.

**Jurado:**

Presidente	Dr. Armando Gómez Puyou
Vocal	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
Vocal	Dra. Rosario A. Muñoz Clares
Vocal	Dr. Edgardo Escamilla Marván
Secretario	Dra. Marina Gavilanes Ruíz
Suplente	Dr. Mario Calcagno Montans
Suplente	Dr. Salvador Uribe Carvajal



## ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de Adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
CoA	Coenzima A
$[Ca^{2+}]$	Concentración de $Ca^{2+}$
$[Ca^{2+}]_c$	Calcio libre citosólico
$[Ca^{2+}]_m$	Calcio libre intramitocondrial
$\Delta\psi$	Potencial transmembranal
$\Delta\mu H^+$	Gradiente electroquímico de protones
$K_{0.5}$	Concentración de activador a la cual una enzima alcanza la mitad de la activación máxima.
$K_m$	Concentración de sustrato a la cual una enzima michaeliana alcanza la mitad de la velocidad máxima.
$[Mg^{2+}]$	Concentración de $Mg^{2+}$
$[Mg^{2+}]_c$	Magnesio libre citosólico
$[Mg^{2+}]_{ex}$	Magnesio extracelular
$[Mg^{2+}]_m$	Magnesio libre intramitocondrial
MESI	Microelectrodos selectivos para iones
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NMR	Resonancia magnética nuclear
2-OG	2-Oxoglutarato
2-OGDH	2-Oxoglutarato deshidrogenasa

$^{31}\text{P}$ -RMN	Resonancia magnética nuclear de fósforo 31
P <sub>i</sub>	Fosfato Inorgánico
TPP	Tiamina pirofosfato.
TPP <sup>+</sup>	Tetrafenil fosfonio
V <sub>m</sub>	Velocidad máxima

## INDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
a). Bioquímica y fisiología del $Mg^{2+}$ en el corazón y en otros órganos. José Salud Rodríguez-Zavala (1998) Arch. Inst. Cardiol. Méx. 68: 262-272.	3
b). Control fisiológico de la fosforilación oxidativa. Avances recientes. Rafael Moreno-Sánchez, José S. Rodríguez-Zavala, Alicia Castillo, Sara Rodríguez y Concepción Bravo. (1997) Mensaje Bioquímico XXI: 45-109 (Resumen).	13
2 HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVOS	20
4. MATERIALES Y METODOS	22
(Ver esta sección en los artículos)	
5. RESULTADOS Y CONCLUSIONES	25
a). Modulation of oxidative phosphorylation by $Mg^{2+}$ in rat heart mitochondria. José Salud Rodríguez-Zavala and Rafael Moreno-Sánchez (1998) J. Biol. Chem. 273: 7850-7855.	29
b). Modulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase by $P_i$ , $Mg^{2+}$ and other effectors. José Salud Rodríguez-Zavala y Rafael Moreno-Sánchez (1999) Enviado para su publicación a la revista Biochemistry.	37
6. DISCUSIÓN GENERAL	65
7. PERSPECTIVAS	70

# 1. INTRODUCCION

## a). MOVIMIENTOS INTRACELULARES DE $Mg^{2+}$ .

Esta bien establecido que el  $Mg^{2+}$  es un cofactor esencial para la actividad de muchas enzimas; sin embargo, debido a que hasta hace poco tiempo prevalecía el dogma de que el  $Mg^{2+}$  permanecía constante en una concentración alrededor de 1 mM en el citosol de las células, parecía improbable visualizar al  $Mg^{2+}$  como un activador enzimático, que pudiera actuar como segundo mensajero intracelular como lo hace el  $Ca^{2+}$ . Además, la sobreestimación de la concentración de  $Mg^{2+}$  libre en el espacio intracelular fue consecuencia de la poca sensibilidad y especificidad de los métodos disponibles en la época, haciendo pensar que el  $Mg^{2+}$  se encontraba siempre presente en concentraciones saturantes para las enzimas susceptibles de ser activadas.

A fines de los años '80 y principio de los '90 se logró el diseño de nuevas técnicas que hicieron posible la medición de la concentración intracelular del  $Mg^{2+}$  (principalmente la utilización de la resonancia magnética nuclear y el diseño de indicadores fluorescentes específicos). Una vez que se pudo medir con certeza la concentración de  $Mg^{2+}$  intracelular, comenzaron a aparecer en la literatura reportes demostrando las variaciones de las concentraciones citosólica y mitocondrial de  $Mg^{2+}$  en respuesta a estímulos hormonales, la modulación de procesos metabólicos por estas variaciones, y la vinculación de la disminución en la concentración de  $Mg^{2+}$  con diferentes padecimientos cardíacos humanos.

A la fecha, se trata de asignar al  $Mg^{2+}$  un papel de segundo mensajero intracelular, similar al que se ha demostrado para el  $Ca^{2+}$  en diversos tipos de células. La siguiente revisión trata de cubrir algunos de los aspectos involucrados en la

sobreestimación del  $Mg^{2+}$  así como de las metodologías comúnmente utilizadas para la medición del  $Mg^{2+}$  intracelular y la demostración de la variación del  $Mg^{2+}$  en diferentes tipos de células.

José Salud Rodríguez-Zavala

**Palabras clave:** Magnesio. Mag-fura-2. Corazón.  
**Key words:** Magnesium. Mag-fura-2. Heart.

## INTRODUCCIÓN

El  $Mg^{2+}$  es un constituyente importante de las células y es un cofactor necesario para una gran variedad de enzimas especialmente aquellas involucradas en la transferencia de grupos fosfato. El magnesio es el segundo o tercer catión intracelular más abundante, después del  $K^+$  y el  $Ca^{2+}$ . Cerca del 95% del contenido de  $Mg^{2+}$  en los órganos está localizado en algún compartimiento intracelular. El efecto biológico del  $Mg^{2+}$  reside en su habilidad para formar quelatos y en la competencia que establece con el  $Ca^{2+}$  por unirse a los mismos sitios y moléculas. El  $Mg^{2+}$  puede unirse a substratos, enzimas y compuestos estructurales de la célula como son proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos.<sup>1</sup>

## TRANSPORTE

La química del  $Mg^{2+}$  ofrece problemas inusuales para los sistemas de transporte. Por ejemplo, el átomo de  $Mg^{2+}$  puede acomodar 6 moléculas de agua para formar el hidrato  $Mg(H_2O)_6^{2+}$  y la velocidad de intercambio de las moléculas de agua en la capa de hidratación interna es aproximadamente  $10^4$  veces más lenta para  $Mg^{2+}$  ( $\sim 10^5$  moléculas/sec) que para  $Na^+$ ,  $K^+$  o  $Ca^{2+}$  ( $\sim 10^8$ - $10^9$  moléculas/sec)<sup>2</sup>. Esta lentitud para liberar el agua debe influenciar la forma en que el  $Mg^{2+}$  se acerca y se une a los sitios de transporte. El ion hidratado puede imaginarse muy grande, mientras que el ion deshidratado es muy pequeño y altamente cargado. El  $Mg^{2+}$  hidratado (la forma disponible para los sistemas de transporte de la membrana) tiene de 350 a 400 veces el volumen de la forma no hidratada, caso totalmente opuesto si se comparan los valores de incremento en el volumen, de 5 a 35 veces para las formas hidratadas comparadas con las formas deshidratadas del  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ .<sup>3</sup> Debido a que la diferencia del potencial eléctrico transmembranal en la mayoría de las células animales es de 60-90 mV, la concentración de  $Mg^{2+}$  intracelu-

lar debería ser  $10^2$ - $10^3$  veces mayor que la extracelular. Sin embargo la concentración de  $Mg^{2+}$  libre citosólico ( $[Mg^{2+}]_c$ ), alcanza solamente concentraciones de 0.5 a 1.0 mM comparada con la concentración de  $Mg^{2+}$  extracelular ( $[Mg^{2+}]_{ex}$ ) de 0.5-1 mM. Por lo anterior se sospecha que en células con un alto potencial transmembranal debe de existir difusión (mediada por un acarreador) hacia el interior de la célula y un transporte activo de  $Mg^{2+}$  hacia el exterior de la célula, que ayuden a mantener la  $[Mg^{2+}]_c$  por abajo de su gradiente electroquímico.<sup>1</sup>

Los primeros experimentos de transporte de  $Mg^{2+}$  demostraron que es difícil cambiar el contenido de  $Mg^{2+}$  de la célula. En diferentes tipos de células se observó que el  $^{28}Mg^{2+}$  se equilibra muy lentamente, sugiriendo que las membranas tienen baja permeabilidad al  $Mg^{2+}$ , por lo que se pensó que no existían sistemas de transporte para este catión. Las técnicas nuevas para medir  $Mg^{2+}$  han permitido un análisis más detallado de la homeostasis del  $Mg^{2+}$  y proveen clara evidencia de la existencia de sistemas de transporte específicos para el ion. El transporte de  $Mg^{2+}$  se ha demostrado en una amplia variedad de tejidos. Trabajos con axón de calamar, músculo de lapa, sinaptosomas y eritrocitos de diferentes especies indican que el principal mecanismo para mantener al  $[Mg^{2+}]_c$  por abajo de su equilibrio electroquímico es la salida de  $Mg^{2+}$  dependiente de sodio. El transporte en estos tejidos comparte muchas características, lo cual sugiere que, en lugar de muchos sistemas de transporte específicos de tejido, existe un sistema común ampliamente distribuido. Otro mecanismo propuesto es la entrada de  $Mg^{2+}$  a manera de simportador o cotransportador acompañado por un  $Na^+$ . Aunque no es claro si existen dos transportadores (un intercambiador  $Na^+/Mg^{2+}$  y un simportador  $Mg^{2+}-Na^+$ ) o si la dirección del intercambiador  $Na^+/Mg^{2+}$  se invierte a bajas concentraciones de sodio externo ( $[Na^+]_{ex}$ ). Existen también transportadores de  $Mg^{2+}$  independientes de  $Na^+$ , pero todavía no existe suficiente información para tener

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". (INCICH. Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, 14080 México, D.F.).

Recepción: 10 de diciembre de 1997.

Aceptado: 21 de enero de 1998.

un esquema completo de estos sistemas de transporte. Un antiportador H<sup>+</sup>/Mg<sup>2+</sup> y un uniportador de Mg<sup>2+</sup> parecen estar involucrados en la regulación de los niveles de Mg<sup>2+</sup> mitocondrial, y estos deben también estar presentes en otras membranas.<sup>4</sup>

Se ha demostrado que mitocondrias aisladas pueden acumular y expulsar Mg<sup>2+</sup> por procesos que son dependientes de la respiración y sensibles a desacoplantes.<sup>5</sup> Debido a que ni el rojo de rutenio (inhibidor del acarreador electroforético de Ca<sup>2+</sup>) ni el diltiazem (inhibidor del intercambiador Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup>) afectan el influjo o el eflujo de Mg<sup>2+</sup>, se propone que el transporte de Mg<sup>2+</sup> por la mitocondria es diferente del transporte de Ca<sup>2+</sup>. El transporte de Mg<sup>2+</sup> de la mitocondria se inhibe por K<sup>+</sup>, ATP y ADP; por lo tanto este transporte en condiciones *in situ* debe ser muy lento.<sup>6</sup>

### MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Existen alrededor de 300 enzimas descritas que son activadas por el Mg<sup>2+</sup> entre las que tenemos a la 2-oxoglutarato deshidrogenasa, hexocinasa, fosfoglicerato cinasa, enolasa, piruvato cinasa, pirofosfatasa y las ATPasas entre otras. En general, el efecto del Mg<sup>2+</sup> sobre la actividad enzimática muestra una cinética de campana, en analogía al efecto del pH (Figura 1).

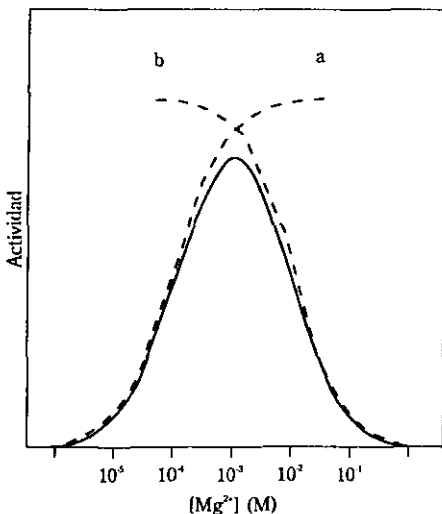


Fig. 1: Efecto del Mg<sup>2+</sup> sobre la actividad enzimática. (Modificado de [1]).

Esta cinética de campana consiste de dos curvas sigmoidales: (a) activación y (b) inhibición, alcanzando un valor de transición alrededor de 1 mM. La activación por Mg<sup>2+</sup> puede provenir de su unión a un sustrato (S): el Mg<sup>2+</sup> se une al sustrato reduciendo la carga negativa y permitiéndole el acceso al sitio catalítico de la enzima. Otro mecanismo es la unión del Mg<sup>2+</sup> a la enzima, estabilizando su conformación activa. El Mg<sup>2+</sup> puede además unirse a ambos, sustrato y enzima ejerciendo a la vez los dos efectos. La inhibición se origina por la unión inespecífica del Mg<sup>2+</sup> a la enzima (especialmente a residuos tiosilo, aspartilo y glutamilo) y esto ocurre generalmente a altas concentraciones de Mg<sup>2+</sup>, de manera similar a lo que ocurre en la unión del Mg<sup>2+</sup> a la albúmina del suero. Por otro lado, el Mg<sup>2+</sup> a altas concentraciones compete con el complejo magnesio-sustrato (Mg-S) por el centro activo de la enzima o pueden formarse complejos del sustrato con más de un Mg<sup>2+</sup>, los cuales son enzimáticamente inactivos. Para que el Mg<sup>2+</sup> pueda actuar como regulador de la actividad enzimática, se requiere que su concentración varíe en el ambiente intracelular de la enzima, el cual puede ser: el citosol, la mitocondria, el núcleo o cualquier otro compartimento intracelular.

Se ha determinado que la concentración total de Mg<sup>2+</sup> en el suero humano es de 0.89 mM. Debido a que parte de éste se encuentra unido a la albúmina y a otros componentes del suero, la concentración de Mg<sup>2+</sup> libre extracelular es sólo de 0.5 mM.

El contenido de Mg<sup>2+</sup> celular es de 3-9 mmol/kg de peso húmedo dependiendo del tipo de célula. La mayor parte de este Mg<sup>2+</sup> se localiza en los microsomas (derivados del retículo endoplásmico rugoso) y en las mitocondrias. Los microsomas contienen una alta cantidad de ribosomas en los cuales se encuentran sitios de unión de alta afinidad por el Mg<sup>2+</sup>, lo cual explica la alta concentración del catión en estos cuerpos. En mitocondrias de hígado alrededor del 40% del Mg<sup>2+</sup> se encuentra en el espacio intermembranal y el 50% en la matriz. Las membranas externa e interna contienen cada una sólo alrededor del 5% del Mg<sup>2+</sup> mitocondrial total. El alto contenido de Mg<sup>2+</sup> en la matriz mitocondrial se explica por la alta cantidad de volumen existente en este compartimento, aproximadamente el 55%; también por el alto contenido de ATP y fosfato inorgánico en el organelo y el pH relativamente alcalino. A pesar del alto contenido de Mg<sup>2+</sup> total en la mitocondria, su concentración libre en la matriz mitocondrial es muy baja, una concentración muy similar a la determinada en el citosol. La utilización del microanálisis de rayos X en la microscopía electrónica ha permitido medir el contenido total de Mg<sup>2+</sup> en las mitocondrias *in situ* de varias preparaciones cardíacas y se han determinado valores de 22 a 56 mM Mg<sup>2+</sup>.<sup>6</sup>

Antiguamente se pensaba que el Mg<sup>2+</sup> intracelular no variaba y que su concentración permanecía

constante por arriba de 1 mM, como lo muestran los datos de  $[Mg^{2+}]_c$  determinado antes de 1980 (Tabla I), en donde puede observarse que, exceptuado los valores encontrados en eritrocitos, el rango de  $[Mg^{2+}]_c$  determinado en diferentes tipos de tejidos va desde 0.9 hasta 2.4 mM. Ahora se sabe que estos valores son altos. La sobreestimación de las  $[Mg^{2+}]_c$ , se debió a la poca disponibilidad de métodos para medir  $Mg^{2+}$  y la baja sensibilidad que mostraban los pocos métodos existentes en la época. La noción de que la  $[Mg^{2+}]_c$  se mantenía en un valor constante, alrededor de 1 mM en diferentes condiciones, ha cambiado en los últimos años. Mediante el diseño de nuevas resinas para microelectrodos selectivos para iones (MESD), la utilización de la resonancia magnética nuclear y mediante el uso de indicadores fluorescentes permeables a membranas biológicas, se ha determinado que la  $[Mg^{2+}]_c$  se encuentra en el rango de 0.4-0.8 mM, dependiendo del tejido en estudio (Tabla II<sup>27</sup>).

#### Determinación de la concentración intracelular de $Mg^{2+}$ libre

**Técnica del punto nulo:** Las primeras mediciones citosólicas e intramitocondriales de  $Mg^{2+}$  libre se realizaron de manera indirecta, mediante la utilización de la técnica del punto nulo. Esta técnica involucra la resuspensión de células o mitocondrias desenergizadas, en un medio que contiene un indicador sensible a  $Mg^{2+}$  impermeable a la membrana (como el antipirilaso III) o un electrodo sensible a  $Mg^{2+}$ , y la variación de la  $[Mg^{2+}]_c$  en el medio de resuspensión. La concentración de  $Mg^{2+}$  a la cual no ocurre cambio en la señal después de la adición del ionoforo para cationes divalentes A23187 es el llamado punto nulo (Figura 2). En este punto, se relaciona la  $[Mg^{2+}]_{ex}$  con la concentración de  $Mg^{2+}$  libre intramitocondrial ( $[Mg^{2+}]_m$ ) como sigue:  $[Mg^{2+}]_{ex}/[Mg^{2+}]_m = 10^{(2\Delta pH)}$ . De aquí puede ser luego determinada la  $[Mg^{2+}]_m$  si se conoce el gradiente transmembranal de protones, ya que el transporte de  $Mg^{2+}$  por el A23187 involucra el intercambio por  $2H^+$ .<sup>24,28</sup> Recientemente se demostró que el A23187 no es capaz de equilibrar totalmente los gradientes de  $Mg^{2+}$  en la mitocondria,<sup>21</sup> como se puede observar en la figura 6B,<sup>26</sup> lo que aumenta las concentraciones de  $Mg^{2+}$  determinadas por esta técnica.

**Resonancia magnética nuclear.** En la determinación de las concentraciones de  $Mg^{2+}$  calculadas por resonancia magnética nuclear (NMR) mostradas en la tabla 2, se utilizó el método convencional para hacer el análisis. Este método consiste en aprovechar el desplazamiento químico que tiene la señal del fosfato  $\beta$  del ATP en el espectro de NMR, relativa a la resonancia del fosfato  $\alpha$ , cuando el  $Mg^{2+}$  se une al ATP (la unión del  $Mg^{2+}$  al ATP es a los fosfatos  $\beta$  y  $\gamma$  pero no al  $\alpha$  como se muestra en la (Figura 3), por

lo que la señal de este fosfato no sufre desplazamiento químico). La  $K_d$  para el complejo ATP-Mg a pH 7.0 es de 38-78  $\mu M$ .<sup>29,30</sup> En el músculo cardíaco este valor es un orden de magnitud por abajo de la concentración de  $Mg^{2+}$  libre. En estas condiciones, el complejo ATP-Mg esta cerca de la saturación, por tanto el desplazamiento químico de los fosfatos  $\beta$  o  $\gamma$  del ATP es relativamente insensible a variaciones en la  $[Mg^{2+}]_c$ .<sup>6</sup> Por lo tanto, para poder apreciar cambios en la concentración de  $Mg^{2+}$  por este método se requiere de que las variaciones en la  $[Mg^{2+}]_c$  sean muy grandes. Por lo anterior, las  $[Mg^{2+}]_c$  determinadas por este método no son del todo confiables.

Los datos de concentración de  $Mg^{2+}$  más confiables, obtenidos por NMR, son aquellos que se basan en la utilización de compuestos con una  $K_d$  por  $Mg^{2+}$  por arriba de la del ATP (generalmente son compuestos sintéticos como los derivados del *o*-aminofenol triacetato (APTRA) que presentan valores de  $K_d$  para  $Mg^{2+}$  en el rango de 0.6-3 mM y que se pueden internalizar a la célula mediante sus derivados acetoximetil ester), lo cual permite que el sistema no se sature con  $Mg^{2+}$  y los cambios en la concentración intracelular de este sean aparentes.<sup>31</sup> Clarke et al<sup>32</sup> desarrollaron recientemente una nueva forma de determinar la  $[Mg^{2+}]_c$  a partir del espectro de <sup>31</sup>P-NMR del ATP, la cual consiste en utilizar el cambio en la altura de las señales de los fosfatos  $\beta$  o  $\gamma$  cuando el ATP une  $Mg^{2+}$  y relacionándola con la altura de la señal del fosfato  $\alpha$ , la cual no cambia con la unión del  $Mg^{2+}$  (Figura 4). El incremento en la altura de estas señales de resonancia al adicionar  $Mg^{2+}$  es hasta de 2.5 veces, lo cual provee de una mayor sensibilidad del espectro de <sup>31</sup>P-NMR del ATP a cambios en la  $[Mg^{2+}]_c$  y, por lo tanto, una mayor exactitud y confiabilidad en los cálculos de  $[Mg^{2+}]_c$  que de ellos se derive.

**Utilización de indicadores fluorescentes:** Los indicadores fluorescentes han evolucionado a pasos agigantados desde el Quin-2 que fue el primer indicador fluorescente diseñado para medir  $Ca^{2+}$ ,<sup>33</sup> y la introducción de las formas de acetoximetil ester de los indicadores,<sup>34</sup> pasando por el diseño del Indo-1 y el fura-2 con mayor sensibilidad a cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ ,<sup>35</sup> la utilización de los indicadores con longitudes de onda de excitación en el rango visible como el Fluo-3 o el Rhod-1,<sup>36</sup> hasta el diseño de los indicadores fluorescentes para medir  $Mg^{2+}$  como son el Fura-2, el Mag-Indo-1,<sup>37</sup> Magnesium-Green<sup>37</sup> (Figura 5) y los derivados de dextran de los indicadores.<sup>37</sup> En la (Tabla III), se muestran los valores de  $K_d$  del complejo Indicador-Mg determinados en diferentes tejidos a diferentes valores de pH y temperatura.

La estrategia de enmascarar los carboxilos de los indicadores con grupos ésteres permite que el compuesto sea permeable a la membrana, una vez en el citosol o en la matriz mitocondrial los grupos ésteres son hidrolizados por esterases inespecifi-



Tabla I  
Concentraciones de Mg<sup>2+</sup> libre ([Mg<sup>2+</sup>])  
(determinadas hasta 1980)

Tipo de Célula	Especie	[Mg <sup>2+</sup> ] mM	Observaciones	Método	Referencia	
eritrocitos	humanos	0.25	aeróbico	<sup>31</sup> P NMR	a	
		0.45	aeróbico	intercambio de cationes	b	
		0.67	anaeróbico	<sup>31</sup> P NMR	a	
		0.57	anaeróbico	intercambio	b	
		0.5		glicólisis	c	
		0.4		A23187	d	
cerebro	rata	1		Sitio de Unión de Mg <sup>2+</sup>	e	
		1.5		Aconitato Hidratasa	e	
riñón	rata	2.2		Sitio de Unión de Mg <sup>2+</sup>	e	
		1.0	actividad*	electrodo	f	
higado	rata	1.5		Sitio de Unión a Mg <sup>2+</sup>	e	
		1		Aconitato Hidratasa	e	
		0.9	actividad*	electrodo	f	
		1.6		enzimático	c	
mitocondrias de higado	rata	1.6		enzimático	c	
músculo	rata	1	actividad*	Electrodo	f	
		2.8		enzimático	c	
		0.6		<sup>31</sup> P NRM	g	
		rana	4.4		<sup>31</sup> P NRM	h
			0.44		<sup>31</sup> P NRM	i
	células tumorales	ratón	1.6		enzimático	c
0.8			actividad*	electrodo	f	

\*valores expresados como actividad [a], debido al desconocimiento del coeficiente de actividad [γ] en el fluido intracelular.

a-γ: c donde γ=coeficiente de actividad, c=concentración, γ ≥ 0.5.

a. Gupta, R. K., Benovic, J. L., Rose, Z. B. (1978) J.B.C., 254, 6172-6176; b. Achilles, W., Klinger, R., Scheidt, B., Frunder, H. (1978) Acta biol. med. germ. 37, 1167-1166; c. Günther, T. (1967) Z. Naturforsch. 22b, 149-154; d. Flatman, P., Lew, V., L. (1977) Nature, 267, 360-362; e. Veloso, D., Guynn, R. W., Oskarsson, M., Veech, R. L. (1973) J.B.C. 248, 4811-4819; f. Günther, T., Dom, F. (1971) Z. Naturforsch. 26b, 176-177; g. Gupta, R. K., Moore, R. D. (1980) J.B.C. 255, 3987-3993; h. Cohen, S. M., Burt, C. T. (1977) Proc. Nat. Acad. Sci. 74, 4271-4275; i. Gupta, R. K., Yushok, W. D. (1980) Proc. Nat. Acad. Sci. 77, 2487-2491.

Modificada de Günter 1981.

**Tabla II**  
**Valores de  $[Mg^{2+}]$  en diferentes tejidos**  
**(determinados de 1988 hasta 1997)**

$Mg^{2+}$ (mM)	Tejido	Método	Referencia
0.5	corazón de rata	$^{31}P$ -NMR	Borchgrevink et al (1989) <sup>7</sup>
0.6	corazón de rata	$^{31}P$ -NMR	Kirkels et al (1989) <sup>8</sup>
0.7	corazón de rata	$^{31}P$ -NMR	Headrick & Willis (1989) <sup>9</sup>
0.4	corazón de hurón	MESI (ETH)	Blatter & McGuigan (1988) <sup>10</sup>
0.85	músculo esquelético de rana	MESI (ETH 5214)	Blatter et al (1990) <sup>11</sup>
1.2	corazón de hurón	$^{19}F$ NMR (fluorocitrate)	Kirschenlohr et al (1988) <sup>12</sup>
0.85	corazón de rata	$^{19}F$ NMR (F APTRA)	Murphy et al (1989) <sup>13</sup>
0.5	células de corazón de pollo en cultivo	Fluorescencia (Furaptra)	Murphy et al (1989) <sup>14</sup>
0.48	mitocondrias de corazón de res	fluorescencia (Furaptra)	Jung et al (1990) <sup>5</sup>
0.2	Eritrocitos humanos (oxigenados)	$^{31}P$ -NMR	Laughlin and Thompson (1996) <sup>15</sup>
0.6	Eritrocitos humanos (desoxigenados)		
0.82	células acinares de páncreas de rata	fluorescencia (Furaptra)	Singh y Wisdom (1995) <sup>16</sup>
0.31	células de músculo liso vascular	fluorescencia (Furaptra)	Okada et al (1992) <sup>17</sup>
1.1	hepatocitos de rata en cultivo	fluorescencia (Furaptra)	Harman et al (1990) <sup>18</sup>
0.36	acino de mucosa sublingual de rata	fluorescencia (Furaptra)	Zhang y Melvin (1994) <sup>19</sup>
0.63	cardiomiocitos aislados de rata	fluorescencia (Furaptra)	Li y Quamme (1994) <sup>20</sup>
0.5	mitocondrias de corazón de res	fluorescencia (Furaptra)	Jung et al (1996) <sup>21</sup>
0.67	corazón de res	fluorescencia (Furaptra)	Jung et al (1997) <sup>22</sup>
0.51	células de ascitis de Ehrlich	fluorescencia (Furaptra)	Wolf et al (1996) <sup>23</sup>
0.42	mitocondrias de corazón de rata	fluorescencia (Furaptra y Mag-Indo-1)	Rutter et al (1990) <sup>24</sup>
0.8-1	Células de ascitis AS-30D	Mag-Indo-1	Rodríguez-Enríquez et al (1997) <sup>25</sup>
0.54	mitocondrias de corazón de rata	fluorescencia (Furaptra)	Rodríguez-Zavala and Moreno-Sánchez (1997) <sup>26</sup>
0.59	hepatocitos de rata	furaptra	Raju et al (1989) <sup>27</sup>

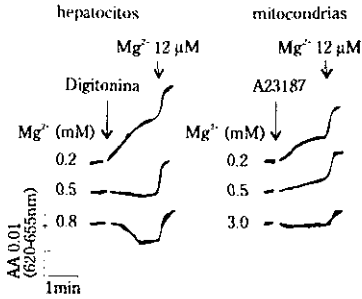


FIG. 2: Técnica del punto nulo para la determinación de la [Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> y [Mg<sup>2+</sup>]<sub>m</sub>. (Modificado de [28]).

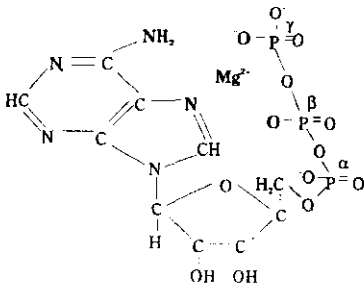


FIG. 3: Estabilización de un átomo de Mg<sup>2+</sup> por el ATP. (en negrilla se muestran los átomos que participan en la estabilización) (Modificado de [32]).

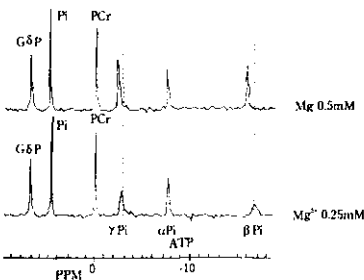


FIG. 4: Espectros de resonancia magnética nuclear del ATP a diferentes concentraciones de Mg<sup>2+</sup>. G6P, glucosa 6 fosfato; Pi, fosfato; PCr, creatina fosfato; γPi, fosfato γ del ATP; αPi, fosfato α del ATP; βPi, fosfato β del ATP (Modificado de [32]).

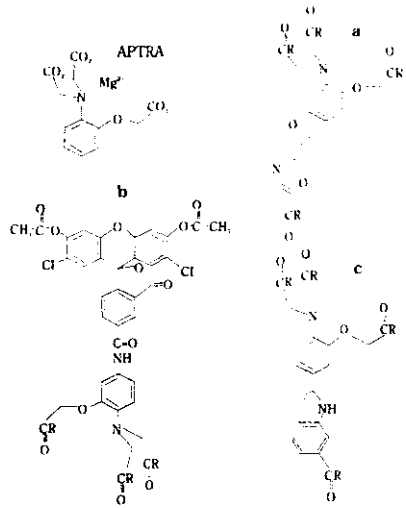


FIG. 5: Estructura química de algunos indicadores fluorescentes selectivos para Mg<sup>2+</sup>.

R - -OK': a). mag-fura-2, b). Magnesium Green y c). mag-indo-1. R - -OCH<sub>2</sub>OCCH<sub>3</sub>: a). mag-fura-2/AM, b). Magnesium Green/AM y c). mag-indo-1/AM.

cas, generando la forma cargada del indicador, permitiendo que este quede atrapado en el compartimiento, listo para fluorescer al unir al ion. Una vez internalizado, es necesario evaluar la concentración interna de indicador (el cual debe de estar por abajo de 200-300 μM), para evitar interferencias del indicador con la homeostasis normal del catión; otro de los posibles inconvenientes de la acumulación excesiva de indicador es que al hidrolizarse los residuos ésteres de los indicadores, se generan los ácidos acético y fórmico, los cuales pueden alterar de manera importante el pH interno. Esta técnica permite además la medición citosólica e intramitocondrial de iones sin comprometer la integridad de la membrana, en células y mitocondrias intactas y totalmente acopladas.

El indicador de Mg<sup>2+</sup> más utilizado es el Mag-Fura-2 o Fura-2. En la Figura 6 se muestran los espectros de excitación del indicador en solución acuosa y en la matriz de mitocondrias de corazón de rata, a diferentes concentraciones de Mg<sup>2+</sup>. La utilización de este indicador para medir la [Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, involucra su internalización en la célula o la mitocondria y la correcta calibración de la señal fluorescente. Inicialmente para medir Mg<sup>2+</sup> con este indicador se utilizaba el método del "cociente",<sup>35</sup> el cual involucra la utilización de dos longitudes de

Tabla III  
Valores de Kd para Mg<sup>2+</sup> de algunos indicadores en diferentes condiciones

Indicador	Kd	pH	T °C	Tejido	Referencia
mag-fura-2	1.9	5.5-7.4	22-27	sln. acuosa	37
mag-indo-1	2.7	5.5-7.4	22-25	sln. acuosa	37
mag-fura-5	2.3	5.5-7.4	22-25	sln. acuosa	37
magnesium-green	1.0	—	—	sln. acuosa	37
magnesium-orange	3.9	—	22	sln. acuosa	37
mag-fura-red	2.5	—	22	sln. acuosa	37
mag-fura-2	1.5	—	—	corazón de pollo	16
mag-fura-2	1.5	8.5	37	células de músculo liso vascular	19
mag-fura-2	1.0	—	37	hepatocitos de rata	20
mag-fura-2	1.5	7.4	23	acino de mucosa sublingual de rata	21
mag-fura-2	1.45	7.4	23	cardiomiocitos aislados de rata	22
mag-fura-2	2.1	7.3	25	mitocondrias de corazón de res	23
mag-fura-2	2.1	7.3	25	corazón de res	23a
mag-fura-2	1.45	7.4	37	células de ascitis de Ehrlich	24
mag-fura-2	2.3	7.3	30	mitocondrias de corazón de rata	26
mag-fura-2	1.52	7.2	30	mitocondrias de corazón de rata	28
mag-fura-2	1.5	7.05	37	solución acuosa	27
mag-fura-2	1.5	7.4	20-25	neuronas en cultivo	38
mag-fura-2	2.25	7.05	37	acinos pancreáticos	39
mag-indo-1	3.7	7.3	30	mitocondrias de corazón de rata	26
mag-indo-1	2.7	7.2	37	miocitos aislados de rata	40
magnesium-green	0.9	7.4	10-22	cardiomiocitos de rata	41
mag-indo-1	2.97	7.4	30?	células de ascitis AS-30D	27

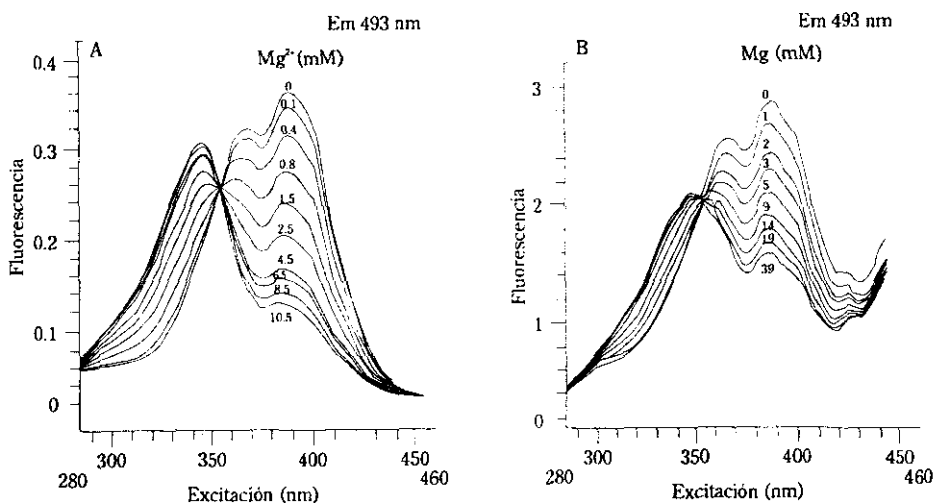


FIG. 6: Espectros de excitación del indicador mag-fura-2 a diferentes concentraciones de Mg<sup>2+</sup> en solución acuosa (A) o en la matriz de mitocondrias de corazón de rata en presencia de A23187 (B).

onda de excitación (340 y 375 nm) y una de emisión (485) en el caso particular de este indicador. Para la determinación de la  $[Mg^{2+}]$  por este método se requiere de la obtención de una  $R_{min}$  (fluorescencia del indicador en ausencia total de  $Mg^{2+}$ ), una  $R_{max}$  (fluorescencia del indicador en condiciones de concentración saturante de  $Mg^{2+}$ ),  $S_f$  y  $S_b$  que son las intensidades de fluorescencia a 375 nm para fura-2 a cero  $Mg^{2+}$  y concentración saturante de  $Mg^{2+}$  respectivamente. La  $R_{min}$  y  $S_f$  son generadas por la adición de 4-BrA23187 y suficiente EDTA/TRIS, pH 8 para quelar todo el  $Mg^{2+}$  presente, mientras que la  $R_{max}$  y  $S_b$  se obtienen por la adición de  $MgCl_2$  50 mM. La concentración de  $Mg^{2+}$  se obtiene de la señal R utilizando la siguiente ecuación:<sup>31</sup>

$$[Mg^{2+}] = K_{dMg^{2+}} \left( \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{S_f}{S_b} \right)$$

En esta ecuación la constante de disociación del complejo indicador-Mg ( $K_{dMg^{2+}}$ ) en la matriz mitocondrial debe calcularse para cada condición experimental.

Jung et al.<sup>21</sup> observaron que el A23187 no es un buen ionóforo para  $Mg^{2+}$  y que el espectro de excitación del Mag-Fura-2 en la región de 335-345 responde anómalamente al incrementar la concentración de  $Mg^{2+}$ ; estas observaciones fueron también corroboradas en este laboratorio como se muestra en la figura 6. En la figura 6A se puede observar que el indicador en solución acuosa, llega a la saturación cuando la  $[Mg^{2+}]$  es 10.5 mM mientras que el indicador intramitocondrial requiere más de 50 mM de  $[Mg^{2+}]_{ex}$  para alcanzar la saturación (Figura 6B), lo cual demuestra que el ionóforo no es capaz de equilibrar por completo los gradientes de  $Mg^{2+}$ . En esta figura se puede observar además la atenuación de la señal fluorescente descrita por Jung et al.,<sup>21</sup> la cual es más aparente en la región de 335-345. Los cambios de fluorescencia en la región de 375-385 se recuperan al agregar tritón X-100 0.005% (v/v) para permitir el completo equilibrio de los gradientes de  $Mg^{2+}$  pero en la región de 335-345 la atenuación persiste (datos no mostrados), por lo que se sospecha que este efecto es debido a la unión de proteínas al complejo mag-fura-2-Mg.<sup>42</sup> Estos resultados llevaron a Jung et al.<sup>21</sup> a proponer modificaciones en el protocolo de calibración: para la adquisición de la señal se debe utilizar la longitud de onda de excitación de 375 nm (esta región del espectro no es alterada por la unión a proteínas), colectando la emisión a 485 nm. Para la calibración de la señal se debe de utilizar 4-BrA23187 (nosotros recomendamos sustituir el ionóforo con Tritón X-100 a una concentración final en la cuveta de 0.005%), para

permeabilizar a las mitocondrias sin cambiar el ambiente intramitocondrial del indicador, evitando lissarlas totalmente, lo cual ocasiona cambios artefactuosos en la señal fluorescente debidos a alteraciones de turbidez, fuerza iónica y viscosidad. Se requiere además de la determinación de la  $F_{min}$  (fluorescencia del indicador en ausencia total de  $Mg^{2+}$ ) y  $F_{max}$  (fluorescencia del indicador a concentración saturante de  $Mg^{2+}$ ) como se mencionó arriba. La concentración de  $Mg^{2+}$  se determina luego mediante la utilización de la siguiente ecuación:<sup>21</sup>

$$[Mg^{2+}] = K_{dMg^{2+}} \left( \frac{F_{min} - F}{F - F_{max}} \right)$$

La  $K_{dMg}$  utilizada en esta ecuación para el complejo Mag-Fura-2-Mg, puede ser aquella determinada en solución acuosa, ya que el comportamiento del indicador es similar al observado en la célula o mitocondria cuando se usa el espectro de excitación en la región de 360-380 nm, reflejando la respuesta del indicador libre a cambios en la concentración de  $Mg^{2+}$ .

#### VARIACIÓN FISIOLÓGICA DE LA $[Mg^{2+}]$

Diversos estudios realizados a partir de 1989 utilizando NMR o indicadores fluorescentes han demostrado que ocurren variaciones en la concentración de  $Mg^{2+}$  en respuesta a diferentes hormonas y agonistas. Por ejemplo, la norepinefrina induce una liberación neta del  $Mg^{2+}$  celular,<sup>43</sup> mientras que la vasopresina induce la acumulación de  $Mg^{2+}$  en hepatocitos aislados.<sup>44</sup> El flujo de  $Mg^{2+}$  promueve respectivamente una pérdida o una ganancia del 10% del cation, además este cambio en la concentración de  $Mg^{2+}$  es rápidamente reversible. Para que estos efectos sean evidentes se requiere de la presencia de concentraciones fisiológicas de  $NaCl$  y  $Ca^{2+}$  extracelulares, lo cual indica la dependencia de los flujos de  $Mg^{2+}$  por estos cationes. La adición de tapsigargina inhibe completamente la entrada de  $Mg^{2+}$  pero no su salida, sugiriendo que la movilización del cation es hacia el retículo endoplásmico en intercambio por el  $Ca^{2+}$  liberado. De manera similar, en este tipo de células se ha determinado un incremento en la  $[Mg^{2+}]_c$  del 50% con un  $t_{1/2} < 20$  s, después de la estimulación con el agonista muscarínico carbacol; la magnitud y duración de estos cambios no se alteró en un medio carente de  $Mg^{2+}$ , indicando que el incremento en la  $[Mg^{2+}]_c$  se debe a la liberación de  $Mg^{2+}$  de un almacén intracelular. Forskolina, el cual incrementa el contenido de  $AMP_c$  intracelular al estimular a la adenilato ciclasa, también promueve un incremento del 10% en la  $[Mg^{2+}]_c$ , después de su adición en acinos de mucosa sublingual de rata.<sup>45</sup> En este último trabajo se demuestra

que el incremento en la concentración de  $Mg^{2+}$  dirigido por estos agonistas es mediante el incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  intracelular.

En células pancreáticas acinares aisladas, la adición de acetilcolina o colecistimina-octapéptido promueve una significativa disminución en la  $[Mg^{2+}]_c$ , la cual se acompaña de la disminución en la entrada de  $^{45}Ca^{2+}$  y el incremento de la  $[Ca^{2+}]_c$  libre, promoviendo un incremento en la secreción de amilasa. En estas células, el  $Mg^{2+}$  se libera de manera dependiente del tiempo y esta liberación es sensible a sodio, amilorida extracelular (1 mM), dinitrofenol (10 mM) y lidocaina (1 mM).<sup>16</sup> Las adiciones de Arginina-vasopresina y endotelina-1 inducen un incremento en la  $[Mg^{2+}]_c$  en células musculares aisladas, en tanto que la estimulación de la producción de GMP<sub>c</sub> o AMP<sub>c</sub> no alteraron la  $[Mg^{2+}]_c$ . El mecanismo de esta movilización de  $Mg^{2+}$  es probablemente a través de un incremento de la  $[Ca^{2+}]_c$  y además es independiente de la  $[Mg^{2+}]$  externo.<sup>17</sup>

La depleción de los almacenes de  $Ca^{2+}$  sensibles a  $IP_3$ , inducido por agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, promueve una disminución de la  $[Mg^{2+}]_c$ . La utilización de 8-(Diethylamino)octyl 3,4,5-trimethoxybenzoate, un inhibidor de la vía de liberación de  $Ca^{2+}$  sensible a  $IP_3$ , bloquea completamente la disminución de la  $[Mg^{2+}]_c$  inducida por carbacol, mientras que taspigargina, un inhibidor de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa, el cual vacía los almacenes de  $Ca^{2+}$  sensibles a  $IP_3$ , estimula la disminución en la  $[Mg^{2+}]_c$ , lo cual hace pensar que esta disminución se debe a la movilización del  $Mg^{2+}$  hacia los almacenes intracelulares de  $Ca^{2+}$  sensibles a  $IP_3$ , cuando estos se depletan.<sup>19</sup>

El ATP extracelular estimula la liberación del 40% del  $Mg^{2+}$  celular en células de ascitis y se propone que esta liberación de  $Mg^{2+}$  promueve el AMP<sub>c</sub> sintetizado por la adenilato ciclasa, la cual es activada a su vez por los productos de la ciclooxigenasa.<sup>23</sup> En células de ascitis la adición de análogos de AMP<sub>c</sub> y de bajas concentraciones de prostaglandinas (PGE1 y PGE2, las cuales incrementan la síntesis de AMP<sub>c</sub>) promueven una salida significativa de  $Mg^{2+}$ . A este respecto, se ha propuesto que el AMP<sub>c</sub> promueve la liberación de  $Mg^{2+}$  a través de la estimulación directa del antiportador  $Na^+/Mg^{2+}$  de la membrana plasmática en células tumorales, en lugar de promover la liberación de  $Mg^{2+}$  de la mitocondria como se ha reportado para otros tipos de células.<sup>46</sup>

Existe un reporte indicando que la adición de AMP<sub>c</sub> también induce una liberación neta del 20 al 25% del  $Mg^{2+}$  total en células y mitocondrias de hígado de rata, en ausencia de  $[Mg^{2+}]_{ex}$ ,<sup>47</sup> sin embargo esto no fue confirmado cuando se adiciona  $Mg^{2+}$  en el medio de incubación, lo cual sugiere que la salida de  $Mg^{2+}$  observada pudo deberse a la pérdida de viabilidad de las células y mitocondrias en estas condiciones.<sup>48</sup> En mitocondrias aisladas de corazón, la transición del estado basal (estado 4) al estado

activo (estado 3) de la respiración lleva a una pequeña pero significativa elevación en la  $[Mg^{2+}]_m$  de 0.48 mM a 0.6-0.7 mM. Este incremento en la concentración de  $Mg^{2+}$  libre en la matriz mitocondrial ( $[Mg^{2+}]_m$ ) persiste durante la síntesis de ATP hasta que el ADP adicionado se agota y entonces la  $[Mg^{2+}]_m$  regresa a su nivel basal; la variación en la  $[Mg^{2+}]_m$  se inhibe con oligomicina,<sup>5</sup> un inhibidor de la ATP sintetasa mitocondrial. Una elevación en la  $[Mg^{2+}]_m$  de 44  $\mu$ M a 1.69 mM también induce una estimulación en la velocidad de síntesis de citrulina en mitocondrias de hígado de rata.<sup>49</sup> Se ha observado también la modulación de la glutaminasa mitocondrial por 0.2 mM de  $Mg^{2+}$ .<sup>50</sup>

Todos estos reportes que describen un movimiento activo de  $Mg^{2+}$  en células y mitocondrias de diferentes tejidos y en respuesta a diferentes agonistas, sugieren que el  $Mg^{2+}$  puede jugar un papel de segundo mensajero en la célula. Sin embargo, muchos de estos reportes deben todavía ser confirmados, por lo que queda todavía mucho por estudiar acerca de las variaciones fisiológicas de la concentración de  $Mg^{2+}$  y sus efectos fisiológicos. La variación en la  $[Mg^{2+}]_c$  y la  $[Mg^{2+}]_m$  podría modular la actividad de varias enzimas regulatorias de la glicolisis (hexocinasa, PFK-1, PFK-2, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, piruvato cinasa), glucogenesis (fosforilasa cinasa), gluconeogenesis (fosfoenol piruvato carboxicinas), síntesis de ácidos grasos (citrato liasa), degradación de ácidos grasos (acil-CoA sintetasa), ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa (2-oxoglutarato deshidrogenasa y ATP sintetasa), síntesis de urea (posiblemente a nivel de la carbamil fosfato sintetasa y la N-acetil glutamato sintetasa) y la síntesis de purinas y pirimidinas (aspartato transcarbamilasa).

## IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LA HOMEOSTASIS CELULAR DEL $Mg^{2+}$

Numerosas enfermedades cardiovasculares, tales como el infarto al miocardio, y la fibrilación ventricular están asociadas con la hipomagnesemia.<sup>6</sup> La hipomagnesemia causa una marcada disminución en el contenido total de  $Mg^{2+}$  en los huesos y en el músculo esquelético. En contraste, la hipomagnesemia no parece tener un gran efecto en el contenido total de  $Mg^{2+}$  del corazón. Debido a que la mayor parte del  $Mg^{2+}$  celular se encuentra principalmente unido o secuestrado, podrían ocurrir cambios importantes en el  $Mg^{2+}$  libre, sin que ocurran cambios significativos en el  $Mg^{2+}$  total.<sup>6</sup>

Se ha encontrado hipomagnesemia y una probable deficiencia de  $Mg^{2+}$  en un 7-10% de los pacientes hospitalizados, pero estos raramente suelen estar acompañados de síntomas clínicos relevantes. La causa de la hipomagnesemia en cardiología está frecuentemente asociada a prolongadas terapias diuréticas y aldosteronismo secundario.<sup>51,52</sup> Los "Torsades

de pointes", así denominados por Dessertenne en 1966, representan una clase de taquicardia ventricular polimorfa y no sostenida, identificada por el aspecto morfológico ondulatorio de la línea isoelectrica. Hoy en día se utiliza la inyección intravenosa de una sal de Mg<sup>2+</sup> en el tratamiento de torsades de pointes.<sup>53</sup> Se utilizan las sales de sulfato o cloruro de Mg<sup>2+</sup>. Se administra un bolo de 2 gr en inyección intravenosa lenta constante a una perfusión continua de 3 a 20 mg/min. El efecto es generalmente espectacular, se detienen los torsades de pointes o se reduce la duración y la frecuencia de sus reincidencias. Esta adición se acompaña habitualmente de potasio. La rapidez del efecto indica que se trata de un mecanismo farmacodinámico extracelular directo, en lugar de un mecanismo metabólico intracelular. El acompañamiento de una adición de carbonato de potasio intravenoso es una acción complementaria favorable.

En estudios con animales, se ha demostrado que el magnesio tiene propiedades cardioprotectivas y de inhibidor de la agregación plaquetaria. La única indicación verificada para el Mg<sup>2+</sup> intravenoso es el tratamiento inicial de "torsade de pointes" y, en pacientes selectos, la taquicardia ventricular monomórfica.<sup>51,52</sup> El Mg<sup>2+</sup> puede suprimir las taquiarritmias inducidas por digitalis y convertir la taquicardia supraventricular ponoxística y la taquicardia ventricular monomórfica en ritmo sinusal. Además, la administración de Mg<sup>2+</sup> detiene la fibrilación ventricular pero el efecto es transitorio.<sup>54,55</sup> No obstante lo anterior, el papel del Mg<sup>2+</sup> en el tratamiento del infarto agudo del miocardio y de las arritmias ventriculares en la insuficiencia cardíaca<sup>52</sup> no es muy claro.

**Agradecimientos:** Este trabajo fue parcialmente apoyado por las becas PADEP/UNAM-05354 y PADEP/UNAM-05345.

## REFERENCIAS

- GÜNTHER T: *Biochemistry and pathobiochemistry of magnesium*. Magnesium Bulletin 1981; 1a:91-101.
- DIEBLER H, EIGEN M, ILGENFRITZ G, MAAß G AND WINKLER R: *Kinetics and mechanism of reactions of main group metal ions with biological carriers*. Pure Appl Chem 1969; 20:93-115.
- JUNG DW, BRIERLEY G P: *Magnesium transport by mitochondria*. Bioenerg Biomech 1994; 26:527-535.
- FLATMAN WF: *Mechanisms of magnesium transport* Annu Rev Physiol 1991; 53:259-71.
- JUNG DW, APEL L, BRIERLEY GP: *Matrix free Mg<sup>2+</sup> changes with metabolic state in isolated heart mitochondria*. Biochemistry 1990; 29:4121-4128.
- MURPHY E, FREUDENRICH CC, LIEBERMAN M: *Cellular magnesium and Na/Mg exchange in heart cells*. Annu Rev Physiol 1991; 53:273-87.
- BORCHGREVINK PC, BERGEN AS, BAKOV OE, JINGE P: *Magnesium and reperfusion of ischemic rat heart as assessed by <sup>32</sup>P NMR*. Am J Physiol 1989; 256:H195-H204.
- KIRKELS JH, VAN ECHELD CJA, RUIGROK TJC: *Intracellular magnesium during myocardial ischemia and reperfusion: possible consequences for postischemic recovery*. J Mol Cell Cardiol 1989; 21:1209-18.
- HEADRICK JP, WILLIS R: *Effect of inotropic stimulation on cytosolic Mg in isolated rat heart: A <sup>31</sup>P magnetic resonance study*. J Mag Res Med 1989; 12:328-38.
- BLATTER LA, MCGUIGAN JAS: *Free intracellular magnesium concentration in ferret ventricular muscle measured with ion selective microelectrodes*. J Exp Physiol 1986; 71:467-78.
- BLATTER LA, BURI A, MCGUIGAN JAS: *Free intracellular magnesium concentration in isolated ferret ventricular muscle and in frog skeletal muscle: measured with ion selective microelectrodes containing the new magnesium sensor ETH 5214*. J Physiol 1989; 418:154P.
- KIRSCHENLOHR HL, MELCALFE JC, MORRIS PG, RODRIGO GC, SMITH GA: *Ca<sup>2+</sup> transient, Mg<sup>2+</sup>, and pH measurements in the cardiac cycle by <sup>19</sup>F NMR*. Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85:9017-21.
- MURPHY E, STEENBERGEN C, LEVY LA, RAJU B, LONDON RE: *Cytosolic free magnesium levels in ischemic rat heart*. J Biol Chem 1989; 264:5622-27.
- MURPHY E, FREUDENRICH C, LEVY LA, LONDON RE, LIEBERMAN M: *Monitoring cytosolic free magnesium in cultured chicken heart cells by use of the fluorescent indicator fura-2*. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:2981-84.
- LAUGHLIN MR, THOMPSON D: *The regulatory role for magnesium in glycolytic flux of the human erythrocyte*. J Biol Chem 1996; 15:28977-28983.
- SINGH J AND WISDOM DM: *Second messenger role for magnesium in pancreatic acinar cells of the rat*. Mol Cell Biochem 1995; 149/150:175-182.
- OKADA K, SANE Y, TOSHIKAZU S: *Cellular mechanisms of vasopressin and endothelin to mobilize [Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in vascular smooth muscle cells*. Am J Physiol 1992; 263:C837-C878.
- HARMAN AW, NIEMINEN AL, LEMASTERS JJ, HERMAN B: *Cytosolic free magnesium, ATP, and blebbing during chemical hypoxia in cultured rat hepatocytes*. Biochem Biophys Res Commun 1990; 170:477-483.
- ZHANG GH, MELVIN JE: *Intracellular Mg<sup>2+</sup> movement during muscarinic stimulation, Mg<sup>2+</sup> uptake by the intracellular Ca<sup>2+</sup> store in rat sublingual mucous acini*. J Biol Chem 1994; 269:10352-10356.
- LI H, QUAMEN GA: *Effect of pH on intracellular free Mg<sup>2+</sup> in isolated adult rat cardiomyocytes*. Biochim Biophys Acta 1994; 1222:164-170.

21. JUNG DW, CARPMAN CJ, BAYSAL K, PFEIFFER DR, BRIGLEY GP: *On the use of fluorescent probes to estimate free Mg<sup>2+</sup> in the matrix of heart mitochondria*. Arch Biochem Biophys 1996; 332:19-29.
22. JUNG DW, PANZETER E, BAYSAL K, BRIGLEY GP: *On the relationship between matrix free Mg<sup>2+</sup> concentration and total Mg<sup>2+</sup> in heart mitochondria*. Biochim Biophys Acta 1997; 1320:310-320.
23. WOLF FI, DI FRANCESCO A, COVACCI V, CORDA D, CITTADINI A: *Regulation of intracellular magnesium in ascites cells: involvement of different regulatory pathways*. Arch Biochem Biophys 1996; 331:194-200.
24. RUTTER GA, OSBALDESTON NJ, MCCORMACK JG, DENTON RM: *Measurement of matrix free Mg<sup>2+</sup> concentration in rat heart mitochondria by using entrapped fluorescent probes*. Biochem J 1990; 271:627-634.
25. RODRIGUEZ-ENRIQUEZ S, RODRIGUEZ-ZAVALA JS, MORENO-SANCHEZ R: *Measurement of [Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in AS-30D tumoral cells using two different fluorescent indicators*. Bol Educ Bioq 1997; 16:119.
26. RODRIGUEZ-ZAVALA, MORENO-SANCHEZ: *Modulation of oxidative phosphorylation by Mg<sup>2+</sup> in rat heart mitochondria*. J Biol Chem. 1998; 273:7850-7855.
27. RAJU B, MURPHY E, LEVY LA, HALL RD, LONDON RE: *A fluorescent indicator for measuring cytosolic free magnesium*. Am J Physiol 1989; 256:C540-48.
28. CORKEY BE, DUZYNSKI J, RICH TL, MATSCHINSKY B, WILLIAMSON JR: *Regulation of free and bound magnesium in rat hepatocytes and isolated mitochondria*. J Biol Chem 1986; 261:2567-2574.
29. GUPTA R, GUPTA P, MOORE R: *NMR studies of intracellular metal ions in intact cells and tissues*. Annu Rev Biophys Bioeng 1984; 13:221-246.
30. KUSHMERICK M, DILLON P, MEYER R, BROWN T, KRISANDA J, SWEENEY H: *<sup>31</sup>P-NMR spectroscopy, chemical analysis and free Mg<sup>2+</sup> of rabbit bladder and uterine smooth muscle*. J Biol Chem 1986; 261:14420-14429.
31. LONDON RE: *Methods for measurement of intracellular magnesium: NMR and fluorescence*. Annu Rev Physiol 1991; 53:241-258.
32. CLARKE K, KASHIWAYA Y, KING M, GATES D, KEON C, CROSS H: *The β/α ratio of ATP. A measure of free [Mg<sup>2+</sup>] using <sup>31</sup>P NMR*. J Biol Chem 1996; 271:21142-21150.
33. TSIEN RY: *Intracellular measurement of ion activities*. Annu Rev Biophys Bioeng 1983; 12:91-116.
34. TSIEN RY: *A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells*. Nature 1981; 290:527-528.
35. GRINNKEWICZ G, POENJE M, TSIEN RY: *A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties*. J Biol Chem 1985; 260:3440-3450.
36. MINTA A, KAO JP, TSIEN RY: *Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescent chromophores*. J Biol Chem 1989; 264:8171-8178.
37. HAUGLAND RP: *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*. Sexta edición Eugene, OR: Molecular Probes 1997; 527-531.
38. STOUT AK, LI-SMERIN Y, JOHNSON JW, REYNOLDS YJ: *Mechanisms of glutamate-stimulated Mg<sup>2+</sup> influx and subsequent Mg<sup>2+</sup> efflux in rat forebrain neurons in culture*. J Physiol 1996; 492 (3):641-657.
39. HURLEY TW, RYAN MP, BRINCK RW: *Changes of cytosolic Ca<sup>2+</sup> interfere with measurements of cytosolic Mg<sup>2+</sup> using mag-fura-2*. Am J Physiol 1992; 263. (Cell Physiol 32) C300-C307.
40. SILVERMAN HS, DI LISA F, HUI RC, MIYATA H, SOLLOTT SJ, HANSFORD RG, ETAL: *Regulation of intracellular free Mg<sup>2+</sup> and concentration in single adult mammalian cardiac myocytes*. Am J Physiol 1994; 266 (Cell Physiol. 35):C222-C233.
41. LEYSSENS A, NOWICKY AV, PATTERSON L, CROMPTON M, DUCHEN MR: *The relationship between mitochondrial state, ATP hydrolysis, [Mg<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> studied in isolated rat cardiomyocytes*. J Physiol 1996; 496 (1):111-128.
42. MATSUDA S, KUSUAKA H, HASHIMOTO K, TSUJIMI RA E, NISHIMURA T: *The effects of proteins on [Ca<sup>2+</sup>] measurement and NMR methods*. Cell Calcium 1996; 20 (5):425-430.
43. ROMANI A, SCARPA A: *Norepinephrine evokes a marked Mg<sup>2+</sup> efflux from liver cells*. FEBS Lett 1990; 269:37-40.
44. ROMANI A, MARFELLA C, SCARPA A: *Hormonal stimulation of Mg<sup>2+</sup> uptake in hepatocytes. Regulation by plasma membrane and intracellular organelles*. J Biol Chem 1993; 268:15489-15495.
45. ZHANG GH, MELVIN JE: *Serretagogue-induce mobilization of an intracellular Mg<sup>2+</sup> pool in rat sublingual mucous acini*. J Biol Chem 1992; 267:20721-20727.
46. WOLF FI, DI FRANCESCO A, COVACCI V, CITTADINI A: *CAMP activates magnesium efflux via the Na/Mg antiporter in ascites cells*. Biochem Biophys Res Commun 1994; 202:1209-1214.
47. ROMANI A, DOWELL E, SCARPA A: *Cyclic AMP-induced Mg<sup>2+</sup> release from rat liver hepatocytes, permeabilized hepatocytes, and isolated mitochondria*. J Biol Chem 1991; 36:24376-24384.
48. ALTSCHULD RA, JUNG DW, PHILLIPS RM, NARAYAN P, CASTILLO LC, WHITAKER TE, ETAL: *Evidence against norepinephrine-stimulated efflux of mitochondrial Mg<sup>2+</sup> from intact cardiac myocytes*. Am J Physiol 1994; 266:H1103-H1111.
49. RODRIGUEZ-ZAVALA JS, SAAVEDRA-MOLINA A, MORENO-SANCHEZ R: *Effect of intramitochondrial Mg<sup>2+</sup> on citrulline synthesis in rat liver mitochondria*. Biochem Mol Biol Inter 1997; 411:179-188.
50. KOVACEVIC Z, DAY SH, COLLETT V, BROSNAN JT, BROSNAN ME: *Activation of hepatic glutaminase by spermine*. Biochem J 1995; 305:837-841.
51. WEISS M: *Magnesium in cardiology*. Schweizerische Rundschau für Medizin Praxis 1995; 84 (18):526-32.
52. LUDERITZ B, MANZ M: *The value in magnesium in intensive care medicine*. Z Kardiol 1994; 83 (Suppl 6):121-6.
53. GUIZE L, LHOUC MC, BAYET G, LAVERGNE T, LE HEUZEY JY: *Les torsades de pointes*. Arch Mal Coeur 1993; 86:769-776.
54. DE MICHELI A, MEDRANO GA, TESTELLI M, SODI PALLARES O: *L'azione de certaines substances chimiques sur l'électrogramme, l'électrocardiogramme et la courbe de tension artérielle chez le chien*. Mal Cardiovas 1963; 4:607-649.
55. DE MICHELI A, MEDRANO GA, SODI PALLARES D: *Efectos de algunas soluciones electrolíticas sobre la evolución electrocardiográfica del infarto experimental agudo del miocardio*. Arch Inst Cardiol Mex 1963; 33:567-580.



## b). FOSFORILACION OXIDATIVA.\*

La fosforilación oxidativa es el proceso mediante el cual se sintetiza ATP, impulsado por la energía libre liberada durante la respiración mitocondrial y en el que participan enzimas localizadas en la membrana interna y en la matriz mitocondrial. La fosforilación oxidativa está formada por dos componentes acoplados por el gradiente electroquímico de protones ( $\Delta\mu_{H^+}$ ): un sistema oxidativo y un sistema fosforilante. El sistema oxidativo está constituido por los transportadores de sustratos, las enzimas del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria. El sistema fosforilante está formado por el translocador de ATP/ADP, el acarreador de fosfatos y la ATP sintetasa.

### **PARTICIPACIÓN DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA AL APORTE DE ATP CELULAR**

El contenido de mitocondrias por célula varía de tejido a tejido. En las células cardíacas, por ejemplo, las mitocondrias ocupan hasta un 40% del volumen total, mientras que en las fibras esqueléticas tipo I, las mitocondrias sólo representan el 1-2% del volumen total celular. Además, el número de mitocondrias por célula y la actividad específica de las enzimas respiratorias se puede incrementar con el ejercicio. Por lo tanto, cabe esperar diferencias de tejido a tejido en la actividad de la fosforilación oxidativa.

El suministro de ATP en los dos órganos más especializados de los mamíferos: el corazón y el cerebro, esta proporcionado exclusivamente por la fosforilación

---

\* Resumen del trabajo publicado en Mensaje Bioquímico XXI: 45-109 (1997).

oxidativa. En éstos, los substratos principales son los ácidos grasos y la glucosa respectivamente. La glicólisis no tiene la capacidad para proveer el ATP requerido para mantener la elevada actividad celular de estos órganos. Liu y cols [1] determinaron recientemente que la glicólisis contribuye con el 6.7% del ATP utilizado en la función contráctil del corazón de una rata normal y con el 8.9% en el corazón sometido a un período de isquemia (30 min) y reperfusión. Los corazones postisquémicos sólo recuperan en un 26% el desarrollo de presión sistólica, mientras que la producción de ATP alcanza hasta un 72% de su valor original (100%, preisquemia). Como la glicólisis no se afectó por la isquemia, entonces parece existir un desacoplamiento entre el trabajo cardíaco y la fosforilación oxidativa. Aún así, la fosforilación oxidativa continúa proveyendo el ATP requerido en el trabajo cardíaco de corazones que han experimentado episodios semejantes al de un infarto [1].

Otros órganos como el hígado, riñón y páncreas también dependen predominantemente de la fosforilación oxidativa, aunque en estos casos la glicólisis ya tiene una participación significativa en el aporte de ATP. Estas observaciones sobre la contribución de la fosforilación oxidativa se han realizado en un grupo reducido de especies, principalmente rata y perro. Por tanto, no es recomendable generalizar la conclusión de que la fosforilación oxidativa es la única fuente de ATP en corazón y cerebro, hasta que se determine en otros órganos y en otras especies.

A pesar de que no se ha considerado al páncreas como un órgano completamente dependiente de la fosforilación oxidativa, Ashcroft y cols [2] han encontrado que cuando se inhibe la cadena respiratoria (y la fosforilación oxidativa) con rotenona, se induce una activación de los canales de  $K^+$  sensibles a ATP presentes en las células  $\beta$ ; el aumento en la actividad de los canales de  $K^+$ -ATP, provocado por la

disminución del ATP, resulta en una hiperpolarización de la membrana plasmática, lo cual a su vez mantiene cerrados, por más tiempo, a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, tiene como consecuencia un bloqueo de la secreción de insulina [2,3]. Por tanto, la glicólisis no parece tener un aporte significativo al suministro de ATP en las células  $\beta$  del páncreas, pues no puede mantener un nivel alto de ATP que promueva la secreción de insulina.

### **MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ATPsintetasa / ATPasa**

Se ha establecido un modelo general de la estructura de la ATP sintetasa a partir de estudios principalmente de las enzimas de *E. coli*, de cloroplastos de espinaca y de las mitocondrias de corazón de bovino. Esta enzima es una de las más complejas encontradas en los seres vivos, pues está constituida por al menos 8 (o 13 en mitocondrias de mamífero) subunidades diferentes, organizadas en una porción hidrosoluble (donde encontramos a las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $F_6$  y la OSCP, que es la subunidad que confiere la sensibilidad a la oligomicina) y otra hidrofóbica (que comprende a las subunidades a, b y c), inmersa en la bicapa fosfolipídica [4,5].

Un aspecto fundamental de la modulación cinética de la ATP sintetasa es la localización física de los sitios de unión a adenín-nucleótidos (ADP y ATP), a  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{P}_i$  y  $\text{IF}_1$  (péptido inhibidor). En la ATPsintetasa de cloroplastos se han determinado 6 sitios de unión a nucleótidos; dos de ellos de alta afinidad ( $K_d = 1-5 \mu\text{M}$ ), otro con un ADP no intercambiable y los 3 sitios restantes de baja afinidad ( $K_d = 15-20 \mu\text{M}$ ). Al parecer, los 3 sitios de baja afinidad son los sitios catalíticos [6]. La ATPsintetasa de mitocondrias también tiene 3 sitios de alta afinidad para nucleótidos ( $K_d = 18 \text{ nM}$ ) y 3 de baja afinidad

( $K_d = 1 \mu\text{M}$ ) [7]. El sitio al cual el ADP no intercambiabile se encuentra unido, aunque catalítico, tiene una función reguladora [8].

También existen 6 sitios de unión a cationes divalentes en la enzima [9], de los cuales sólo uno mantiene al  $\text{Mg}^{2+}$  fuertemente unido en un medio con EDTA (quelante potente de  $\text{Mg}^{2+}$ ) y sulfato de amonio por más de 50 horas [10]. Este sitio es responsable de la inactivación de la enzima por  $\text{Mg}^{2+}$  libre, lo cual se acompaña de la disociación de la  $F_1$  [11]; la disociación involucra a las subunidades  $\alpha$  y parte de la  $\gamma$  [12]. La inactivación de la enzima por  $\text{Mg}^{2+}$  es lenta y requiere del ADP unido con alta afinidad; así, es posible que la especie que inactiva a la enzima sea el  $\text{Mg-ADP}$ . La inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$  no se previene con ATP, GTP o ITP, ni tampoco con agentes tiorreductores, mientras que la reasociación de la  $F_1$  a la  $F_0$  sí protege [12]. En resumen la  $F_1$  contiene 3 sitios de alta afinidad para el  $\text{Mg}^{2+}$  que promueven la catálisis y otros 3 sitios de baja afinidad que tienen una función reguladora [12].

Además, la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  modula la actividad de la enzima mediante su unión al ATP o al ADP. Así, a altas concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  la relación hidrólisis/recambio (síntesis) disminuye [13], lo cual significa que el aumento en el  $\text{Mg}^{2+}$  favorece la síntesis y la disminución en el  $\text{Mg}^{2+}$  favorece la hidrólisis. Estas observaciones son consistentes con la idea de que el  $\text{Mg-ATP}$  es el verdadero sustrato para la hidrólisis y que el  $\text{Mg}^{2+}$  libre en exceso es, por tanto, un inhibidor de la actividad hidrolítica. Para la síntesis de ATP, se observa una activación con  $\text{P}_i$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , a partir del ADP fuertemente unido. En este caso, el  $\text{Mg-ADP}$ , el  $\text{Mg-GDP}$  o el  $\text{Mg-UDP}$  son los verdaderos sustratos, mientras que la afinidad de la enzima por el  $\text{P}_i$  es independiente de la concentración del  $\text{Mg}^{2+}$ .

## CONTROL DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA POR $Mg^{2+}$ .

Ya que el verdadero substrato de la ATP sintetasa es el Mg-ADP [14], debe esperarse que una elevación en el  $Mg^{2+}$  intramitocondrial promueva el incremento de la concentración del Mg-ADP disponible y, por lo tanto, se incremente la actividad de la ATP sintetasa. Otro posible nivel de regulación de la fosforilación oxidativa por  $Mg^{2+}$  es el translocador de adenín-nucleótidos. Este transportador sólo puede acarrear a las especies libres de ATP y ADP, pero como estos dos compuestos tienen gran afinidad por el  $Mg^{2+}$ , al incrementarse la  $[Mg^{2+}]_c$ , la disponibilidad de ATP y ADP libres disminuye; en consecuencia, la actividad del translocador se inhibe, lo cual puede disminuir también la actividad de la ATP sintetasa por limitación de uno de los substratos de la reacción. Por lo tanto, es difícil predecir el efecto final de la variación en el  $Mg^{2+}$  sobre la velocidad de síntesis de ATP. Esto tiene que ser determinado experimentalmente.

## CONTROL DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA POR $Ca^{2+}$

Se ha argumentado que la elevación en la  $[Ca^{2+}]_c$  es la señal utilizada por las células para incrementar el flujo de la fosforilación a través de la activación de las deshidrogenasas de la matriz mitocondrial sensibles a  $Ca^{2+}$  (la piruvato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa). Las hormonas como la vasopresina, la angiotensina y los agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos incrementan, además de la actividad celular, la concentración citosólica (ya sea por salida del retículo sarcoplásmico o por entrada extracelular) y mitocondrial de  $Ca^{2+}$  [15,16-19].

## BIBLIOGRAFÍA

1. Liu, B., El Alaoui-Talibi, Z., Clanachan, A.S., Schulz, R. y Lopaschuk G.D. (1996) Uncoupling of contractile function from mitochondrial TCA cycle activity and  $MV_{O_2}$  during reperfusion of ischemic hearts. *Am J. Physiol.* **270**, H72-H80.
2. Ashcroft, F. y Rorsman, P. (1989) Electrophysiology of the pancreatic  $\beta$ -cell. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **54**, 87-143.
3. Duchen, M., Smith, P. y Ashcroft, F. (1993) Substrate-dependent changes in mitochondrial function, intracellular free calcium concentration and membrane channels in pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem. J.* **294**, 35-42.
4. Pedersen, P. y Amzel, M. (1993) ATP synthases. Structure, reaction center, mechanism and regulation of one of nature's most unique machines. *J. Biol. Chem.* **268**, 9937-9940.
5. Pedersen, P. (1996) Frontiers in ATP synthase research: understanding the relationship between subunit movements and ATP synthesis. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 389-395.
6. Girault, G., Berger, G., Galmiche, J.M. y Andre, F. (1989) Characterization of six nucleotide-binding sites on chloroplast coupling factor 1 and one site on its purified  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.* **263**, 14690-14695.
7. Cross, R. y Nalin, C. (1982) Adenine nucleotide binding sites on beef heart  $F_1$ -ATPase. Evidence for three exchangeable sites that are distinct from three noncatalytic sites. *J. Biol. Chem.* **257**, 2474-2881.
8. Wu, D. y Boyer, P. (1986) Bound adenosine 5'-triphosphate formation, bound adenosine 5'-diphosphate and inorganic phosphate retention, and inorganic phosphate oxygen exchange by chloroplast adenosinetriphosphatase in the presence of  $Ca^{2+}$  or  $Mg^{2+}$ . *Biochemistry.* **25**, 3390-3396.
9. Hiller, R. y Carmeli, Ch. (1985) Cooperativity among manganese-binding sites in the  $H^+$ -ATPase of chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **260**, 1614-1617.
10. Houseman, A., Morgan, L., LoBrutto, R. y Frasch, W. (1994) Characterization of ligands of a high-affinity metal-binding site in the latent chloroplast  $F_1$ -ATPase by EPR spectroscopy of bound  $VO^{2+}$ . *Biochemistry.* **33**, 4910-4917.
11. Bulygin, V. y Vinogradov, A. (1991) Interaction of  $Mg^{2+}$  with  $F_0F_1$  mitochondrial ATPase as related to its slow active / inactive transition. *Biochem. J.* **276**, 149-156.
12. Pedersen, P., Williams, N. y Hullihen, J. (1987) Mitochondrial ATP synthase: dramatic  $Mg^{2+}$ -induced alterations in the structure and function of the  $F_1$ -ATPase moiety. *Biochemistry.* **26**, 8631-8637.

13. Gómez-Puyou, A., Ayala, G., Muller, U. y Tuena de Gómez-Puyou, M. (1983) Regulation of the synthesis and hydrolysis of ATP by mitochondrial ATPase. Role of  $Mg^{2+}$ . *J. Biol. Chem.* **258**, 13673-13679.
14. Kozlov, I. y Skulachev, V.P. (1977)  $H^+$ -Adenosine triphosphatase and membrane energy coupling. *Biochim. Biophys. Acta.* **463**, 29-89.
15. Assimacopoulos-Jeannet, F., McCormack, J. y Jeanrenaud, B. (1986) Vasopressin and/or glucagon rapidly increases mitochondrial calcium and oxidative enzyme activities in the perfused rat liver. *J. Biol. Chem.* **261**, 8799-8804.
16. Berthon, B., Binet, A., Mauger, J.P. y Claret, M. (1984) Cytosolic free  $Ca^{2+}$  in isolated rat hepatocytes as measured by quin2. Effects of noradrenaline and vasopressin. *FEBS Lett.* **167**, 19-24.
17. Reinhart, P., Taylor, W. y Bygrave, F. (1984) The contribution of both extracellular and intracellular calcium to the action of  $\alpha$ -adrenergic agonists in perfused rat liver. *Biochem. J.* **220**, 35-42.
18. Altin, J. y Bygrave, F. (1985) The  $Ca^{2+}$ -mobilizing actions of vasopressin and angiotensin differ from those of the  $\alpha$ -adrenergic agonist phenylephrine in the perfused rat liver. *Biochem. J.* **232**, 911-917.
19. Mauger, J., Poggioli, J., Guesdon, F. y Claret, M. (1984) Noradrenaline, vasopressin and angiotensin increase  $Ca^{2+}$  influx by opening a common pool of  $Ca^{2+}$  channels in isolated rat liver cells. *Biochem. J.* **221**, 121-127.

## 2. HIPOTESIS

Puesto que se ha demostrado un aumento del  $Mg^{2+}$  intracelular en respuesta a estímulos con diferentes hormonas o agonistas, se puede esperar que el  $Mg^{2+}$  module la fosforilación oxidativa a través de los siguientes mecanismos: a) directamente, por un aumento en la concentración del sustrato disponible para la ATP sintetasa (Mg-ADP); b) indirectamente a través del translocador de adenin-nucleótidos, mediante la disminución del ATP libre requerido para el intercambio con ADP externo (necesario para la reacción de síntesis de ATP); c) también podría actuar indirectamente modulando la actividad de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs que son dependientes de  $Ca^{2+}$  tales como la piruvato deshidrogenasa, la isocitrato deshidrogenasa y la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (ejerciendo un efecto antagónico sobre la activación por calcio como se ha reportado para otros procesos metabólicos) o mediante su interacción con las enzimas, ya que se ha reportado que tanto la piruvato deshidrogenasa como la 2-oxoglutarato deshidrogenasa son dependientes de  $Mg^{2+}$ .

## 3. OBJETIVOS

### Objetivo General.

Determinar los mecanismos de control de la fosforilación oxidativa y la 2-OGDH por  $Mg^{2+}$ , y otros efectores.

### Objetivos Particulares.

1.- Evaluar el efecto del  $Mg^{2+}$  libre y el Pi sobre la velocidad de fosforilación oxidativa al utilizar 2-oxoglutarato y succinato (en presencia de rotenona) como sustratos.



Algunos de estos objetivos cambiaron a raíz de los datos obtenidos en nuestro primer trabajo, en donde se demostró la estimulación de la 2-OGDH por  $Mg^{2+}$  y  $P_i$ , y se generaron los objetivos siguientes:

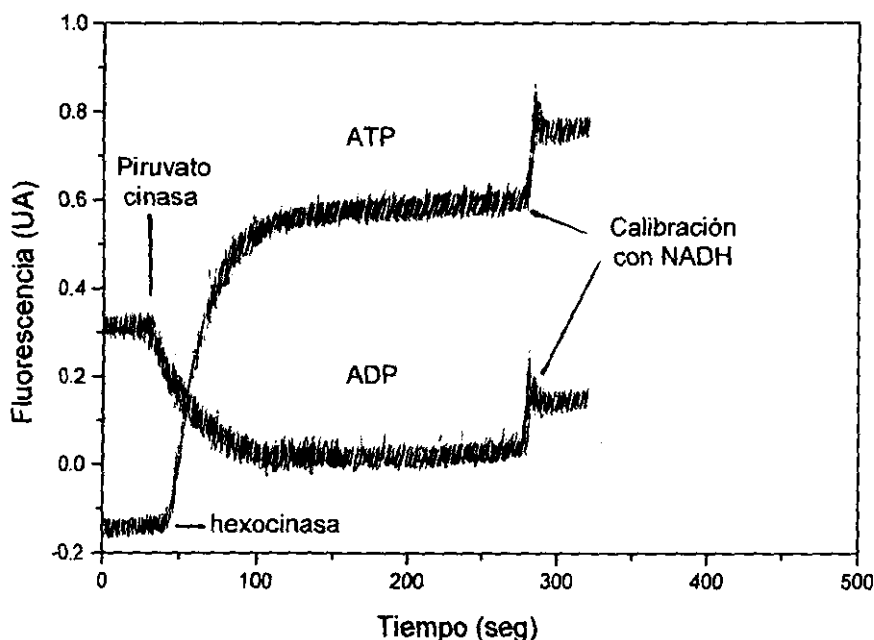
- 2.- Determinar el efecto del  $Mg^{2+}$  y el  $P_i$  sobre la 2-OGDH aislada y en extractos de mitocondrias de corazón de rata.
- 3.- Determinar el mecanismo de activación de la enzima por  $P_i$ .
- 4.- Medir el efecto del  $Mg^{2+}$  y el  $P_i$  sobre la activación por  $Ca^{2+}$  de la 2-OGDH aislada y en el extracto mitocondrial.
- 5.- Reevaluar el efecto del ADP y ATP sobre la 2-OGDH aislada y el extracto mitocondrial, en presencia y en ausencia de  $Mg^{2+}$  y  $P_i$ .
- 6.- Describir condiciones experimentales en las cuales la modulación de la 2-OGDH por  $Mg^{2+}$  y  $P_i$  afecte la velocidad de fosforilación oxidativa.
- 7.- Identificar factores de relevancia fisiológica que modifiquen la concentración de  $Mg^{2+}$  intramitocondrial.

#### 4. MATERIALES Y METODOS

- a). Aislamiento de las mitocondrias (ver trabajo 1, en la sección Materials and Methods).
- b). Internalizado del indicador (ver trabajo 1, en la sección Materials and Methods).
- c). Calibración de la señal fluorescente (ver la sección de determinación de la  $[Mg^{2+}]_L$  en la revisión de la Introducción y el trabajo 1, en la sección Materials and Methods).
- d). Determinación del  $[Mg^{2+}]_m$  (ver la sección de Determinación de la  $[Mg^{2+}]_L$  en la primera revisión de la Introducción y el trabajo 1, en la sección Materials and Methods).
- e). Determinación fluorométrica del pH intramitocondrial (ver trabajo 1, en la sección Materials and Methods).
- f). Determinación de la síntesis de ATP (ver trabajo 1, en la sección Materials and Methods).
- g). Determinación del potencial transmembranal (ver trabajo 1, en la sección Materials and Methods).
  - 1. Método espectrofotométrico
  - 2. Método radioactivo
- h). Ensayos de oximetría (ver trabajo 1, en la sección Materials and Methods)
- i). Determinación de los adenin-nucleótidos (ver trabajo 1, en la sección Materials and Methods).
- j). Manejo y almacenamiento de la enzima aislada (ver trabajo 2, en la sección Materials and Methods).
- k). Preparación y almacenamiento de los extractos mitocondriales (ver trabajo 2, en la sección Materials and Methods).

- l). Determinación de la actividad de la 2-OGDH (ver trabajo 2, en la sección Materials and Methods).
- m). Cálculos de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  libres mediante la utilización del programa de computadora CHELATOR.

### Trazos representativos de la determinación de la concentración de ATP y ADP por el método enzimático.



Composición del medio para determinación de ATP.

Medio KME  
 NAD<sup>+</sup>  
 glucosa  
 MgCl<sub>2</sub>  
 glucosa 6P deshidrogenasa  
 hexocinasa

Composición de medio para la determinación de ADP.

Medio KME  
 NADH  
 fosfoenol piruvato  
 lactato deshidrogenasa  
 piruvato cinasa

**Cálculos de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  libres mediante  
la utilización del programa de computadora CHELATOR.**

Condición:

MOPS 20 mM

EGTA 2.38 mM

EDTA 0.2 mM

$[\text{Mg}^{2+}]_T$  0.6 mM

$[\text{Ca}^{2+}]_T$  2.4 mM

Temp 30° C

pH 7.25

$[\text{Mg}^{2+}]_L$  408  $\mu\text{M}$

$[\text{Ca}^{2+}]_L$  860 nM

MOPS 20 mM

EGTA 2.38mM

EDTA 0.2 mM

$[\text{Mg}^{2+}]_T$  0.6 mM

$[\text{Ca}^{2+}]_T$  2.4 mM

ADP 600  $\mu\text{M}$

Temp 30° C

pH 7.25

$[\text{Mg}^{2+}]_L$  293  $\mu\text{M}$

$[\text{Ca}^{2+}]_L$  843 nM

Mg-ADP 124  $\mu\text{M}$

Ca-ADP 139 nM

MOPS 20 mM

EGTA 2.38 mM

EDTA 0.2 mM

$[\text{Mg}^{2+}]_T$  0.6 mM

$[\text{Ca}^{2+}]_T$  2.4 mM

Temp 30° C

pH 7.25

ADP 600  $\mu\text{M}$

Pi 5 mM

$[\text{Mg}^{2+}]_L$  147  $\mu\text{M}$

$[\text{Ca}^{2+}]_L$  802 nM

Mg-ADP 69  $\mu\text{M}$

Ca-ADP 147 nM

Mg-Pi 221  $\mu\text{M}$

Ca-Pi 926 nM

## 5. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados se describen detalladamente en el trabajo publicado y en el manuscrito enviado para su publicación. En el primero se cubren los datos obtenidos con la enzima *in situ*, es decir en mitocondrias intactas acopladas, aisladas de corazón de rata; mientras que el segundo trabajo reúne los datos obtenidos con la enzima aislada y con extractos de mitocondrias de corazón.

### a) Trabajo No 1.

En este trabajo se muestra que el aumento en la  $[Mg^{2+}]_{ex}$  se transmite a la matriz mitocondrial, incrementando la  $[Mg^{2+}]_m$  y que, como era de esperarse, la entrada de  $Mg^{2+}$  es más rápida en presencia del ionóforo para cationes divalentes A23187. A pesar de que se mostró que el A23187 no es un buen ionóforo de  $Mg^{2+}$ , se prefirió su utilización debido a que el gradiente de  $Mg^{2+}$  alcanzado con A23187 fue 5 a 6 veces mayor que en su ausencia. Esto permitió una más fácil manipulación de la  $[Mg^{2+}]_m$  y la obtención de una respuesta más rápida a las variaciones en la  $[Mg^{2+}]_{ex}$ .

Se exploró el efecto del  $Mg^{2+}$  sobre la fosforilación oxidativa dividiendo a la vía metabólica en dos bloques para identificar a qué nivel se llevaba a cabo la modulación. El primer bloque se delimitó utilizando 2-OG como sustrato, involucrando de esta forma al ciclo de Krebs desde la 2-OGDH hasta la MDH, la cadena respiratoria y el sistema fosforilante; el segundo bloque se constituyó al utilizar succinato (en presencia de rotenona), dejando fuera al ciclo de Krebs e involucrando solamente a la cadena respiratoria a partir del sitio II y al sistema fosforilante. Cuando se midió el efecto del  $Mg^{2+}$  sobre la síntesis de ATP, la sensibilidad a  $Mg^{2+}$  fue diferente al utilizar 2-OG o

succinato (con rotenona) como sustratos, siendo la  $K_{0.5}$  por  $Mg^{2+}$  menor en presencia de succinato. Esta diferencia en sensibilidad al  $Mg^{2+}$  nos sugirió la existencia de por lo menos 2 sitios de modulación por  $Mg^{2+}$  en la vía metabólica. El primero a nivel de la 2-OGDH y el segundo posiblemente localizado a nivel del sistema fosforilante (la ATP sintetasa o la translocasa de adenin-nucleótidos). Se hicieron unos estudios preliminares de arsenilación oxidativa, en los cuales se sustituye al  $P_i$  con su análogo el arsenato (As), y se utilizan las concentraciones endógenas de ADP para prescindir de la participación del translocador de adenin-nucleótidos; en estas condiciones se lleva a cabo la formación del As-ADP el cual se hidroliza espontáneamente, y regenera al ADP y al As. Se observó que al aumentar la concentración de  $Mg^{2+}$  se activa la síntesis de As-ADP, indicando que el sitio de activación por  $Mg^{2+}$  en el sistema fosforilante es la ATP sintetasa.

Por medio de la distribución del TPP<sup>+</sup> o cambios de absorbancia de la safranina, se determinaron los cambios en el potencial transmembranal generado por la oxidación del 2-OG. Se observó que el incremento en la  $[Mg^{2+}]_m$ , promueve un aumento en el potencial transmembranal. En estos experimentos se demostró que el ADP es un modulador de la activación por  $Mg^{2+}$  y que la remoción del  $P_i$  del medio disminuye el potencial máximo generado por la estimulación por  $Mg^{2+}$ . Esta última observación nos condujo a ensayar el efecto del  $P_i$  sobre la generación del potencial transmembranal activada por  $Mg^{2+}$ . Los resultados mostraron que un incremento en la concentración del  $P_i$  producía un aumento en la afinidad por  $Mg^{2+}$  y en el potencial máximo alcanzado. Con succinato como sustrato no se observó ningún cambio en la afinidad ni en el potencial generado al incrementar la concentración de  $P_i$ , indicando que la modulación se realizaba en algún sitio antes del complejo I de la cadena respiratoria. Se determinó

el efecto del  $Mg^{2+}$  y el  $P_i$  sobre la 2-OGDH, midiendo la reducción de piridín-nucleótidos y el efecto del  $P_i$  sobre la activación por  $Mg^{2+}$  de la respiración soportada por 2-OG. Con estas determinaciones se corroboró la modulación de la activación de la 2-OGDH por  $Mg^{2+}$  por  $P_i$ , mediante las determinaciones de la disminución de la  $K_{0.5}$  por el catión y del incremento de la velocidad máxima de la reacción.

Para explicar el efecto del  $P_i$  sobre la activación por  $Mg^{2+}$  de la 2-OGDH en las mitocondrias intactas se plantearon las siguientes posibilidades:

a). Que al incrementar la concentración de  $P_i$  externo se aumenta también la concentración de 2-OG intramitocondrial, como consecuencia de su intercambio con  $P_i$ . De esta forma, se incrementa la actividad de la enzima al aumentar la concentración de uno de los sustratos para la reacción.

b). Que al incrementar el  $P_i$  externo el pH intramitocondrial se modifique por la actividad del simportador  $P_i/H^+$ , y el aumento en el pH intramitocondrial sea el responsable de la activación de la enzima.

c). Por último, una interacción directa del  $P_i$  con la 2-OGDH en un sitio específico para su activación.

La segunda posibilidad se descartó al determinar el  $pH_m$  con  $P_i$  y acetato. Al sustituir al  $P_i$  con 10 o 20 mM de acetato, el  $pH_m$  determinado fue igual o incluso menor que con fosfato, sin que se observara incremento alguno en la reducción de piridín-nucleótidos. Estos datos demostraron que por lo menos en estas condiciones, el cambio en el pH no es el responsable de la activación de la 2-OGDH.

Para examinar las otras posibilidad se hizo necesaria la utilización de la 2-OGDH aislada y los resultados se presentan en el segundo trabajo.

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes: el  $Mg^{2+}$  activa a la fosforilación oxidativa por lo menos en dos sitios, la 2-OGDH y la ATP sintetasa; la activación por  $Mg^{2+}$  de la 2-OGDH es modulada por  $P_i$  y el mecanismo de esta modulación es el incremento de la afinidad de la enzima por el magnesio y el incremento de la velocidad máxima de la reacción; aumentos en la concentración del  $P_i$  en la matriz mitocondrial pueden activar a la 2-OGDH, aún cuando no ocurran variaciones en la concentración del  $Mg^{2+}$  libre intramitocondrial.



## Modulation of Oxidative Phosphorylation by $Mg^{2+}$ in Rat Heart Mitochondria\*

(Received for publication, June 13, 1997, and in revised form, December 10, 1997)

José Salud Rodríguez-Zavala†, and Rafael Moreno-Sánchez

From the Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, México, D.F. 14080, México

The effect of varying the  $Mg^{2+}$  concentration on the 2-oxoglutarate dehydrogenase (2-OGDH) activity and the rate of oxidative phosphorylation of rat heart mitochondria was studied. The ionophore A23187 was used to modify the mitochondrial free  $Mg^{2+}$  concentration. Half-maximal stimulation ( $K_{0.5}$ ) of ATP synthesis by  $Mg^{2+}$  was obtained with  $0.13 \pm 0.02$  mM ( $n = 7$ ) with succinate (+rotenone) and  $0.48 \pm 0.13$  mM ( $n = 6$ ) with 2-oxoglutarate (2-OG) as substrates. Similar  $K_{0.5}$  values were found for NAD(P)H formation, generation of membrane potential, and state 4 respiration with 2-OG. In the presence of ADP, an increase in  $P_i$  concentration promoted a decrease in the  $K_{0.5}$  values of ATP synthesis, membrane potential formation and state 4 respiration for  $Mg^{2+}$  with 2-OG, but not with succinate. These results indicate that 2-OGDH is the main step of oxidative phosphorylation modulated by  $Mg^{2+}$  when 2-OG is the oxidizable substrate; with succinate, the ATP synthase is the  $Mg^{2+}$ -sensitive step. Replacement of  $P_i$  by acetate, which promotes changes on intramitochondrial pH abolished  $Mg^{2+}$  activation of 2-OGDH. Thus, the modulation of the 2-OGDH activity by  $Mg^{2+}$  has an essential requirement for  $P_i$  (and ADP) in intact mitochondria which is not associated to variations in matrix pH.

The notion that the cytosolic concentration of free  $Mg^{2+}$  ( $[Mg^{2+}]_c$ )<sup>1</sup> had a constant value around 1 mM under different conditions has changed in recent years. By using permeant fluorescent dyes and nuclear magnetic resonance, tissue-dependent variations in  $[Mg^{2+}]_c$  in the range 0.4 of 0.8 mM have been observed, in response to several hormones and agonists. For instance, norepinephrine induced a net release of cellular  $Mg^{2+}$  (1), while vasopressin induced  $Mg^{2+}$  accumulation in isolated hepatocytes (2). Likewise, increments of 50% in  $[Mg^{2+}]_c$  has been determined, after stimulation with the muscarinic agonist carbachol, and a 10% increase was observed, after addition of forskolin in rat sublingual mucous acini (3). In acinar pancreatic cells, addition of acetylcholine or cholecystokinin-octapeptide promoted a significant diminution in  $[Mg^{2+}]_c$  (4). Arginine-vasopressin and endothelin-1 induced an incre-

ment in  $[Mg^{2+}]_c$  in muscle cells, probably through a  $Ca^{2+}$ -mediated mechanism (5). Depletion of inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $Ca^{2+}$  stores, induced by  $\alpha$ -adrenergic agonists, activated the uptake of  $Mg^{2+}$  by these organelles (6).

Extracellular ATP stimulated the release of 40% of cellular  $Mg^{2+}$  in ascites cells (7); it was proposed that cAMP promoted  $Mg^{2+}$  release through the activation of a plasma membrane  $Na^+/Mg^{2+}$  antiporter (8). However, a report indicating that addition of cAMP also induced a net release of 20–25% of total  $Mg^{2+}$  in rat liver mitochondria (9) was not confirmed (10). In beef heart mitochondria, the transition from basal (state 4) to active (state 3) respiration led to a small, but significant elevation in the mitochondrial matrix free  $Mg^{2+}$  concentration ( $[Mg^{2+}]_m$ ) from 0.5 mM to 0.6–0.7 mM. This increase in  $[Mg^{2+}]_m$  persisted during ATP synthesis, until added ADP was exhausted; at this time  $[Mg^{2+}]_m$  returned to basal levels. These variations in  $[Mg^{2+}]_m$  were inhibited by oligomycin (11). An elevation in  $[Mg^{2+}]_m$  from 44  $\mu$ M to 1.69 mM also induced a stimulation in the rate of citrulline synthesis in rat liver mitochondria (12). Modulation of mitochondrial glutaminase by 0–2 mM  $Mg^{2+}$  has also been observed (13).

All of these reports describing an active movement of  $Mg^{2+}$  in cells and mitochondria of different tissues and in response to different agonists suggest that  $Mg^{2+}$  may play a role as a second messenger in the cell. In this work, we show that variations of external  $Mg^{2+}$ , and hence in  $[Mg^{2+}]_m$ , can modulate the activities of the 2-OGDH and the ATP synthase and, in consequence,  $Mg^{2+}$  may affect the rate of oxidative phosphorylation in isolated rat heart mitochondria.

### MATERIALS AND METHODS

Rat heart mitochondria were isolated from male Wistar rats of 250–300-g weight according to a previously described method using the protease type XXVII (Nagarse) from Sigma (14).

**Dye Loading.**—Heart mitochondria were loaded with Mag-Fura-2 or BCECF (Molecular Probes) by incubating 30–40 mg of mitochondrial protein in 2 ml of a medium composed of 250 mM sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA (SHE medium), 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM ADP, 0.2% fatty acid-free bovine serum albumin, pH 7.4, and 5  $\mu$ M Mag-Fura-2/AM or BCECF/AM at 25 °C for 20 min. At the end of this incubation period, mitochondria were diluted 10–15 times with ice-cold SHE medium + 0.2% bovine serum albumin, centrifuged, resuspended in 1 ml of SHE medium, and kept on ice until use. Mitochondria loaded by following this procedure showed higher respiratory control values than non-loaded mitochondria, 8.6 and 4.3 ( $n = 2$ ), respectively, with 10 mM 2-oxoglutarate as a substrate.

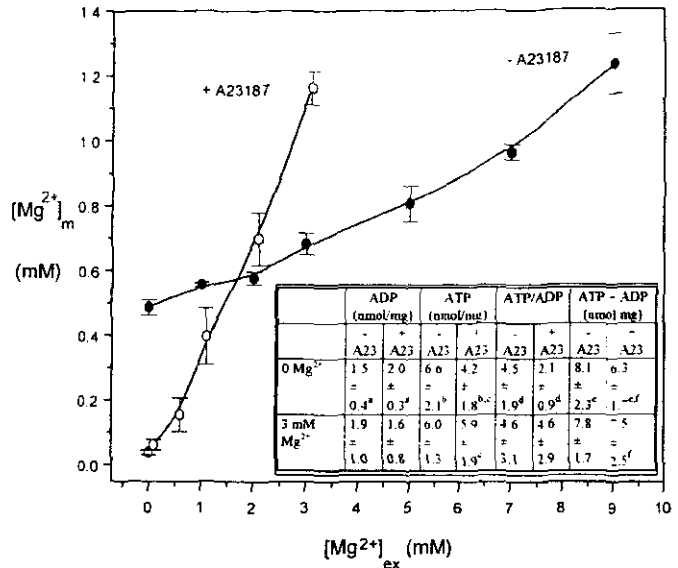
**Determination of  $[Mg^{2+}]_m$ .**—Mag-Fura-2-loaded mitochondria (0.5 mg protein/ml) were incubated in 120 mM KCl, 20 mM MOPS, 0.5 mM EGTA (KME medium), 5 mM succinate, and 2  $\mu$ M rotenone, at pH 7.25 and 30 °C. To avoid interference by matrix NAD(P)H fluorescence, 2-oxoglutarate was not used as an oxidizable substrate for determinations of  $[Mg^{2+}]_m$ . Fluorescence changes were monitored under smooth stirring and gassing with 100%  $O_2$  in an Aminco Bowman Series 2 spectrofluorometer. Excitation wavelengths were 340 and 398 nm and emission was collected at 483 nm.  $[Mg^{2+}]_m$  was determined from the fluorescence ratio signal ( $R$ , 398/340 nm).  $R_{max}$  and  $R_{min}$  were obtained at the end of each experiment.  $R_{min}$  was generated by addition of 800 pmol of A23187/mg protein and sufficient EDTA-Tris, pH 8.0, to chelate all the

\* This work was supported in part by CONACyT 2169-M9304, CONACyT F-554, PADEP/UNAM-05354, and PADEP/UNAM-05345 grants. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† To whom correspondence should be addressed: Dept. de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Juan Badiano #1, Col. Sección XVI, México, D.F., 14080, México. Fax: 525-573-0926.

<sup>1</sup> The abbreviations used are:  $[Mg^{2+}]_c$ , cytosolic free  $Mg^{2+}$  concentration;  $[Mg^{2+}]_m$ , matrix free  $Mg^{2+}$  concentration;  $[Mg^{2+}]_e$ , external  $Mg^{2+}$  concentration; 2-OGDH, oxoglutarate dehydrogenase; 2-OG, 2-oxoglutarate; TPP<sup>+</sup>, tetraphenylphosphonium; BCECF, 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein; BCECF/AM, BCECF/acetoxymethyl ester; MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid.

**FIG. 1. Mitochondrial  $Mg^{2+}$  gradient in the presence and in the absence of A23187.** Mag-Fura-2-loaded mitochondria (0.5 mg/ml) were incubated as described under "Materials and Methods" in the presence of 10 mM NaCl, 5 mM P<sub>i</sub>, and the indicated  $Mg^{2+}$  concentrations; the matrix content of Mag-Fura-2 was estimated to be  $150 \pm 30$  pmol/mg of protein ( $n = 5$ ). Calibration of the fluorescence ratio signal was performed and  $[Mg^{2+}]_m$  calculated as described under "Materials and Methods." The bandwidths were 4 nm for both excitation and emission wavelengths, while the sensitivity was set at 500 V. The results represent the mean  $\pm$  S.D. from three different mitochondrial preparations. The inset shows the determination of intramitochondrial ATP and ADP of five different mitochondrial preparations incubated for 10 min with the indicated concentrations of  $MgCl_2$  and in the presence or in the absence of 800 pmol of A23187/mg of protein;  $n, d, p < 0.05$ ;  $e, r, p < 0.01$ ;  $^* p < 0.005$  (Student's *t* test for paired samples).



$Mg^{2+}$  present in the incubation medium; 0.005% (v/v) Triton X-100 was added to ensure complete  $Mg^{2+}$  equilibration across the membrane.  $R_{max}$  was obtained after further addition of 70 mM  $MgCl_2$ . Calculation of  $[Mg^{2+}]_m$  was made using the following equation (15):

$$[Mg^{2+}]_m = K_{d(Mg^{2+})} \left( \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R} \cdot \frac{S_f}{S_b} \right) \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $K_{d(Mg^{2+})}$  is the dissociation constant for the Mg-dye complex in the mitochondrial matrix and  $S_f$  and  $S_b$  are the dye fluorescence intensities at 398 nm with zero and excess  $Mg^{2+}$ , respectively. The  $K_{d(Mg^{2+})}$  value was determined experimentally to be  $1.52 \pm 0.18$  mM ( $n = 5$ ).

**pH Determination**—BCECF-loaded mitochondria (0.5 mg of protein/ml) were incubated in KME medium containing 0.5 mM 2-oxoglutarate, 10 mM NaCl, 600  $\mu$ M ADP, 3.5  $\mu$ M oligomycin, 800 pmol of A23187/mg of protein and different concentrations of  $Mg^{2+}$ , P<sub>i</sub>, or acetate. For pH calculations, a calibration plot was generated incubating 0.5 mg of protein/ml in the medium mentioned above, at the desired pH, in the presence of 2  $\mu$ M carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone, 200 pmol of nigericin/mg of protein and 0.005% Triton X-100 to equilibrate all ion gradients. Excitation wavelengths were 450 and 500 nm; fluorescence was collected at 530 nm. The plot of pH values versus fluorescence ratio signal gives a straight line between pH 6.8 and 7.8.

**ATP Synthesis**—Mitochondria (1 mg of protein/ml) were incubated in KME medium containing 0.5 mM 2-oxoglutarate or 5 mM succinate (+1  $\mu$ M rotenone), 10 mM NaCl, 10 mM glucose, 30 units of hexokinase, and 5 mM  $^{32}P_i$  (specific activity,  $1-1.5 \times 10^6$  cpm/ml, Cerenkov radiation), at 30 °C. After 5 min, 1.2 mM ADP was added, and the reaction was stopped 30 s later by addition of 200  $\mu$ l of 30% (w/v) cold trichloroacetic acid. Excess  $^{32}P_i$  was extracted as described previously using acetone + *n*-butyl acetate as organic solvents [16]. Radioactivity of an aliquot of the aqueous phase was determined as  $^{32}P_i$  Cerenkov radiation in a scintillation counter.

**Activity of 2-OGDH**—Mitochondria (1 mg of protein/ml) were suspended in KME medium containing 1 mM 2-oxoglutarate, 10 mM NaCl, 600  $\mu$ M ADP, pH 7.25, and different concentrations of  $Mg^{2+}$  and P<sub>i</sub> at 30 °C. Matrix NAD(P)H formed was determined following mitochondrial intrinsic fluorescence at 460 nm with the excitation wavelength at 340 nm. To obtain the fluorescence minimum, mitochondria were incubated in the absence of added substrates until endogenous substrates were depleted (approximately 5–8 min) ( $NAD(P)H = 0\%$ ); the fluorescence maximum was reached by adding 5  $\mu$ M rotenone for complete reduction of NAD(P)<sup>+</sup> ( $NAD(P)H = 100\%$ ) at the end of each experiment.

**Membrane Potential ( $\Delta\psi$ )**—Mitochondria (1 mg protein/ml) were sus-

ended in KME medium containing 0.5 mM 2-oxoglutarate, 10 mM NaCl, 5  $\mu$ M safranin O, at 30 °C. Absorbance was recorded at 534–520 nm (17, 18), using a dual-beam SLM Aminco DW2000 spectrophotometer. Zero  $\Delta\psi$  was reached by addition of 1  $\mu$ M carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone and 2  $\mu$ M rotenone at the end of each experiment.

The membrane potential was also quantitatively measured using the distribution of [<sup>3</sup>H]TTP<sup>+</sup>. Mitochondria (1.5 mg protein/ml) were suspended in 500  $\mu$ l of KME medium containing 5 mM P<sub>i</sub>, 10 mM NaCl, 0.8  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]TTP (specific activity,  $4-5 \times 10^4$  cpm/ml) at 30 °C and different concentrations of  $Mg^{2+}$ . After 5 min, 800 pmol of A23187/mg of protein were added; 3 min later 1 mM 2-oxoglutarate was added, and the incubation was continued for another 3 min. Then, mitochondria were centrifuged at 14,000 rpm for 1 min in a microcentrifuge. Aliquots from the pellet and supernatant were taken to measure the [<sup>3</sup>H]TTP<sup>+</sup> distribution; the membrane potential was determined as described previously (19).

**Oximetry Assays**—Mitochondrial respiration was measured using an oxygen Clark-type electrode. Mitochondria (0.6 mg of protein/ml) were incubated in KME medium containing 1 mM 2-oxoglutarate, 10 mM NaCl, 1 or 5 mM P<sub>i</sub>, and 800 pmol of A23187/mg of protein. After 5 min, 600  $\mu$ M ADP was added, and the change in the rate of respiration was measured.

**Matrix ATP and ADP Content**—Mitochondria (2.5 mg of protein/ml) were incubated in KME medium plus 5 mM succinate and 2  $\mu$ M rotenone at 30 °C for 10 min under orbital shaking. Then, 3% (v/v) cold perchloric acid, 25 mM EDTA was added, the suspension was centrifuged, and the supernatant neutralized for enzymatic determination of ATP and ADP. Essentially identical results were obtained when mitochondria were previously sedimented in a microcentrifuge at 6–10 °C and further denaturalized by the addition of perchloric acid.

## RESULTS

The increase in the external  $Mg^{2+}$  concentration induced a proportional, but small elevation in  $(Mg^{2+})_m$  in rat heart mitochondria (Fig. 1). This  $Mg^{2+}$  gradient ( $(Mg^{2+})_m / (Mg^{2+})_{ex}$ ) showed a slope of 0.066, in the range 0–3 mM externally added  $Mg^{2+}$ , indicating that  $Mg^{2+}$  does not easily equilibrate across the mitochondrial inner membrane, probably due to a slow  $Mg^{2+}$  influx, or to an active  $Mg^{2+}$  efflux. Similar results were previously reported for rat liver mitochondria (12). To accelerate the equilibration of  $Mg^{2+}$ , the divalent cation ionophore A23187 was added. Fig. 1 shows that the ionophore modifies the steady-state concentration of matrix  $Mg^{2+}$ , although equil-

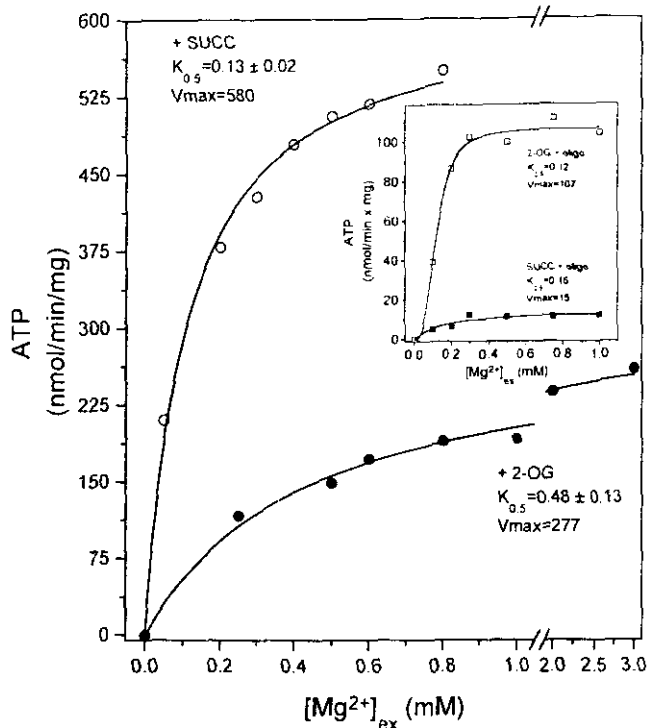


FIG. 2. Activation of ATP synthesis by  $Mg^{2+}$ . Mitochondria were incubated as described under "Materials and Methods" with the indicated  $Mg^{2+}$  concentrations, in the presence of 800 pmol of A23187/mg of protein; 1200  $\mu M$  ADP was added to initiate the reaction. The plots are representative.  $K_{0.5}$  values in millimoles are mean  $\pm$  S.D. from seven (for 5 mM succinate, succ) and six (for 0.5 mM 2-OG) different preparations. The solid lines represent the best fit lines derived from the Hill equation. The  $V_{max}$  values obtained from such a fitting are in nanomoles/(mg  $\times$  min). The rate of ATP synthesis attained in the absence of added  $Mg^{2+}$  was 250 nmol/(min  $\times$  mg) with succinate and 100 nmol/(min  $\times$  mg) with 2-OG, and it was subtracted from the rates obtained in the presence of  $Mg^{2+}$ . The inset shows the determination of substrate level phosphorylation under identical experimental conditions to those used for the ATP synthesis assay, but in the presence of a saturating concentration of oligomycin (3  $\mu M$ ).

incubation with external  $Mg^{2+}$  was not complete. Since mitochondria incubated with A23187 conserved the  $H^+$  gradient, it was not unexpected that A23187 did not produce complete equilibration of  $Mg^{2+}$  concentrations across the mitochondrial membrane. Moreover, A23187 seems to be a weak  $Mg^{2+}$  ionophore due to a low affinity and poor mobility across the mitochondrial membrane (20–22). Nonetheless, the addition of A23187 allowed a more rapid manipulation of matrix  $Mg^{2+}$  in a lower range of external  $Mg^{2+}$  concentrations. The use of 1600 pmol of 4-bromo-A23187/mg of protein, instead of A23187, resulted in a curve very similar to that shown in Fig. 1 in the absence of ionophore (data not shown).

The addition of A23187 to mitochondria incubated in the absence of added  $MgCl_2$  decreased  $[Mg^{2+}]_m$  from 0.49 to 0.02 mM and induced a significant diminution of matrix ATP/ADP ratio and the ADP + ATP content (see Fig. 1, inset). The further addition of 3 mM  $Mg^{2+}$ , in the presence of A23187, increased  $[Mg^{2+}]_m$  from 0.02 to 1.15 mM and preserved matrix ATP/ADP ratio and ADP + ATP content at high values. Although a correlation between  $[Mg^{2+}]_m$  and the ATP/ADP ratio (or ATP content) was not found for mitochondria incubated with 3 mM  $Mg^{2+}$  and with or without A23187, it is apparent from the data of Fig. 1 that, in the presence of A23187, the addition of external  $Mg^{2+}$  modified both the  $[Mg^{2+}]_m$  and the ATP/ADP ratio, which may affect the rate of oxidative phosphorylation.

The rate of oxidative phosphorylation, assayed in the presence of A23187, depended on  $Mg^{2+}$  concentration in the incubation medium (Fig. 2). Since the sensitivity to  $Mg^{2+}$  depended on whether succinate (+ rotenone) or 2-oxoglutarate (2-OG) was used ( $p < 0.05$ ), the data of Fig. 2 suggest the existence of at least two sites of modulation by  $Mg^{2+}$ . These sites may be located in the phosphorylating system (i.e. the ATP synthase or the adenine nucleotide translocase) during succinate oxidation,

and at the level of 2-OGDH for 2-OG oxidation. Replacement of  $Mg^{2+}$  by  $Mn^{2+}$  also induced an activation of ATP synthesis, but at higher concentrations ( $K_{0.5}$  values for  $Mn^{2+}$  were  $0.60 \pm 0.047$  mM ( $n = 3$ ) with succinate and  $0.92 \pm 0.052$  mM ( $n = 3$ ) with 2-OG as a substrate).

Since succinyl-CoA synthase also requires  $Mg^{2+}$ , its contribution to the uptake of  $^{32}P_i$  was assayed. In the inset of Fig. 2, it is shown that substrate level phosphorylation by the Krebs cycle accounted for up to 40–50% of total ATP synthesis during oxidative phosphorylation with 2-OG as an oxidizable substrate. As substrate-level phosphorylation and oxidative phosphorylation with 2-OG showed different sensitivities to  $Mg^{2+}$ , an effect of  $Mg^{2+}$  on sites different from succinyl-CoA synthase seemed likely.

To discard the participation of contaminating ATPases, in the ATP synthesis assays, hexokinase + glucose was used to capture ATP generated by oxidative phosphorylation. This prompted us to determine the  $Mg^{2+}$  dependence of hexokinase. Under the conditions of ATP synthesis (see Fig. 2),  $K_{0.5}$  values of hexokinase for ATP-Mg were 92  $\mu M$ , in the presence of 400  $\mu M$  ATP, and 31  $\mu M$  in the presence of 100  $\mu M$  ATP. These two concentrations of added ATP represent the maximal level of ATP synthesis (for 1 mg of protein/ml in 30 s at 30  $^{\circ}C$ ) during oxidative phosphorylation with succinate and 2-OG, respectively. The sensitivity of hexokinase to  $Mg^{2+}$  revealed that this enzyme is not involved in the lower sensitivity of oxidative phosphorylation to  $Mg^{2+}$  with 2-OG as a substrate (see Fig. 2). However, in the presence of succinate, the sensitivity of oxidative phosphorylation to  $Mg^{2+}$  might result from a mixed response of both hexokinase and ATP synthase to  $Mg^{2+}$ . However, an essentially identical sensitivity of oxidative phosphorylation to  $Mg^{2+}$  was observed in the absence of hex-

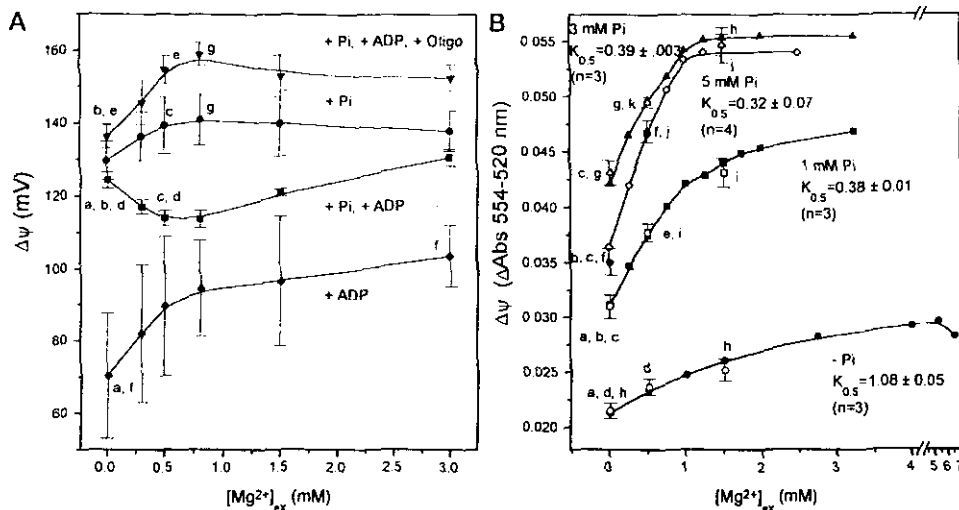


FIG. 3. Effect of  $Mg^{2+}$  and  $P_i$  on the steady state value of  $\Delta\psi$ . A, mitochondria (1.5 mg/ml) were incubated as described under "Materials and Methods" in the presence of 1 mM 2-OG and 800 pmol of A23187/mg of protein. Other additions were 5 mM  $P_i$ , 600  $\mu$ M ADP, and 3  $\mu$ M oligomycin. The data show the mean  $\pm$  S.D. of four different mitochondrial preparations. \* $p < 0.01$ ; <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup> $p < 0.05$  (Student's  $t$  test for nonpaired samples). B, mitochondria were incubated in the presence of 0.5 mM 2-OG, 800 pmol of A23187/mg, 3  $\mu$ M oligomycin, 600  $\mu$ M ADP, 5  $\mu$ M safranin O, different concentrations of  $Mg^{2+}$ , and the indicated  $P_i$  concentrations.  $K_{0.5}$  values (in mM) and experimental points are the mean  $\pm$  S.D. (empty symbols) from three different mitochondrial preparations. <sup>a,c,e,f,g,h,i,k</sup> $p < 0.005$ ; <sup>b,d</sup> $p < 0.05$ ; <sup>h</sup> $p < 0.01$  (Student's  $t$  test for nonpaired samples).

okinase ( $K_{0.5} = 0.13 \pm 0.014$  mM,  $n = 3$ ), with succinate (+rotenone).

The change in the magnitude of the membrane potential, as estimated from the distribution of TPP<sup>+</sup>, was initially used to monitor indirectly variations in 2-OGDH activity in mitochondria incubated with limiting concentrations of 2-OG (Fig. 3A). A membrane potential ( $\Delta\psi$ ) of 130 mV in the absence of added ADP and  $Mg^{2+}$  and in the presence of A23187 and  $P_i$  was determined. This value increased to 140 mV by the increase in  $[Mg^{2+}]_{ex}$  (Fig. 3A, circles). With 600  $\mu$ M ADP, steady state  $\Delta\psi$  diminished to 112 mV by increasing  $[Mg^{2+}]_{ex}$  (Fig. 3A, squares), due to stimulation of ATP synthesis. Although under these last conditions the oxidative system was activated by  $Mg^{2+}$ , the diminution in  $\Delta\psi$  indicated that, at  $Mg^{2+}$  concentrations of 0–1.5 mM, activation of the phosphorylating system of the pathway by  $Mg^{2+}$  was predominant. At higher  $Mg^{2+}$  concentrations (>1.5 mM), activation of the oxidative system prevailed over that of the phosphorylating system, resulting in  $\Delta\psi$  values larger than those obtained at zero  $Mg^{2+}$  (data not shown).

The enhancement of  $\Delta\psi$  up to 162 mV by increasing  $[Mg^{2+}]_{ex}$  in the presence of ADP +  $P_i$  + oligomycin (Fig. 3A, triangles), which was larger than that reached at the same concentration of  $[Mg^{2+}]_{ex}$  in the absence of ADP, indicated that ADP was a modulator of the  $Mg^{2+}$  activation. In the absence of added  $Mg^{2+}$ , removal of  $P_i$  markedly diminished  $\Delta\psi$  (Fig. 3A, diamonds). In the absence of  $P_i$ ,  $\Delta\psi$  increased when  $[Mg^{2+}]_{ex}$  was increased, but only to 105 mV. This latter observation prompted us to determine the effect of different concentrations of  $P_i$  on the activity of 2-OGDH.

In comparison to the [<sup>3</sup>H]TPP<sup>+</sup> method, the absorbance difference of safranin O (Fig. 3B) allows for continuous monitoring of  $\Delta\psi$ , and a large number of experiments with the same mitochondrial preparation. Using the safranin O signal, the increase in  $P_i$  concentration (in the presence of ADP + oligomycin) potentiated the activating effect of  $Mg^{2+}$  on the steady state value of  $\Delta\psi$  (Fig. 3B). Thus, the half-maximal stimulation

of  $\Delta\psi$  by  $Mg^{2+}$  was decreased and the maximal value of  $\Delta\psi$  was elevated by increasing  $P_i$  concentrations. This effect of  $P_i$  was not apparent in the absence of added ADP. Similar results to those of Fig. 3B were obtained by measuring the [<sup>3</sup>H]TPP<sup>+</sup> distribution under the same conditions (data not shown).

The activity of 2-OGDH was also measured, following the level of reduction of matrix pyridine nucleotides. In the absence of added  $P_i$ , the increase in  $[Mg^{2+}]_{ex}$  did not promote the generation of NAD(P)H (Fig. 4A). However, an increase in  $P_i$  concentration induced both a decrease in the  $K_{0.5}$  value for  $Mg^{2+}$  and an increase in the level of NAD(P)H reduction. The rate of respiration measured in the presence of ADP + oligomycin (state 4) was also stimulated by increasing  $[Mg^{2+}]_{ex}$  (Fig. 4B). Again, the presence of increasing  $P_i$  concentrations potentiated the stimulation by  $Mg^{2+}$ , through a diminution in the  $K_{0.5}$  value for  $Mg^{2+}$  and an increase in the maximal rate of respiration. Thus, the data of Figs. 3 and 4 indicate that  $P_i$ , in the presence of ADP, potentiates the activating effect of  $Mg^{2+}$  on 2-OGDH activity.

The study of the effect of different  $P_i$  concentrations on the  $Mg^{2+}$  sensitivity of ATP synthesis and state 3 respiration supported by succinate (+rotenone) revealed a negligible effect on the  $K_{0.5}$  value for  $Mg^{2+}$ , indicating that the effect of  $P_i$  was exerted only at the Krebs cycle level. Lack of  $Mg^{2+}$  activation on state 4 respiration with succinate (+rotenone) as substrate and oligomycin (data not shown), discarded the possibility that  $Mg^{2+}$  activated the respiratory chain.

Matrix acidification brought about by the  $P_i$  uptake might be involved in  $Mg^{2+}$  activation of 2-OGDH. The activating effect of 5 mM  $P_i$  on the stimulation of matrix NAD(P)H formation by  $Mg^{2+}$  was not reproduced by addition of 10 or 20 mM acetate (data not shown); the final steady-state pH values in BCECF-loaded mitochondria incubated with 10 mM acetate or 5 mM  $P_i$ , in the presence of ADP, oligomycin, and A23187, were 6.91 and 6.88 with no added  $Mg^{2+}$ , and 7.11 and 7.16 with 1 mM  $Mg^{2+}$ , respectively. These results indicate that matrix acidification is not the mechanism involved in the  $P_i$  potentiating effect.

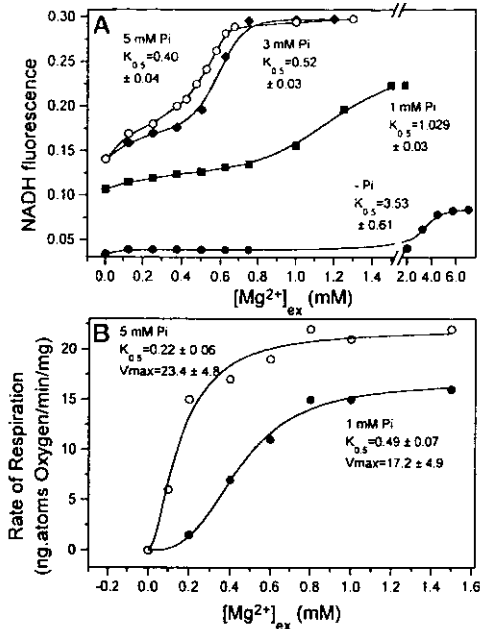


FIG. 4. Effect of  $P_i$  on the activation of the intramitochondrial NAD(P)<sup>+</sup> reduction and state 4 respiration by  $Mg^{2+}$ . Mitochondria were incubated in the presence of 600  $\mu$ M ADP + 3  $\mu$ M oligomycin in the conditions described under "Materials and Methods." The plots are representative, but  $K_{0.5}$  values are means  $\pm$  S.D. of four or five (5 mM  $P_i$ ) experiments for NAD(P)H production and five (1 mM  $P_i$ ) or seven (5 mM  $P_i$ ) experiments for respiration, with different mitochondrial preparations.

#### DISCUSSION

The different sensitivity to  $Mg^{2+}$  of the rate of oxidative phosphorylation, with 2-OG or succinate, suggested that different sites in the pathway are involved in the interaction with  $Mg^{2+}$ . With the former substrate, the data on  $\Delta\psi$ , matrix NAD(P)H, and respiratory rates indicated that the main site of interaction with  $Mg^{2+}$  was 2-OGDH.

Since ADP-Mg is the true substrate for the ATP synthase (24), increasing  $[Mg^{2+}]_m$  is expected to activate this enzyme. However, the substrates for adenine nucleotide translocase are free ADP and ATP (25). During ATP synthesis, external ADP exchanges with matrix ATP. As ATP has a higher affinity for  $Mg^{2+}$  than ADP, increasing  $[Mg^{2+}]_m$  is expected to inhibit the adenine nucleotide translocase activity through the diminution of the internal substrate. Therefore, the effect of increasing  $[Mg^{2+}]_m$  on the rate of oxidative phosphorylation is not readily apparent. As the elevation of external  $Mg^{2+}$ , and hence  $[Mg^{2+}]_m$ , resulted in higher rates of ATP synthesis with succinate as substrate, it can be assumed that  $Mg^{2+}$  activation of the ATP synthase prevailed over  $Mg^{2+}$  inhibition of the adenine nucleotide translocase. Stimulation of the rate of oxidative phosphorylation, an analogous process to oxidative phosphorylation, but without the participation of adenine nucleotide translocase (16), by  $Mg^{2+}$  using succinate (data not shown), supported the interpretation of an activating effect of  $Mg^{2+}$  on the ATP synthase.

In addition to a direct interaction of  $Mg^{2+}$  with the oxidative phosphorylation enzymes,  $Mg^{2+}$  might also perturb matrix  $Ca^{2+}$  homeostasis, and hence, affect the rate of ATP synthesis (16, 19, 26) (reviewed in Moreno-Sánchez and Torres-Márquez

(27)). For instance,  $Mg^{2+}$  might compete with  $Ca^{2+}$  for the same binding sites in 2-OGDH. A decreased  $Ca^{2+}$  sensitivity by increasing  $Mg^{2+}$  has been observed for the NAD<sup>+</sup>-isocitrate dehydrogenase (28), whereas an enhanced  $Ca^{2+}$  sensitivity was described for the pyruvate dehydrogenase phosphatase (29). Although the sensitivity of 2-OGDH to  $Ca^{2+}$ , at different  $Mg^{2+}$  concentrations, has not yet been determined, Panov and Scarpa (30) reported that 2-OGDH can be activated synergistically by both  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ , implying the existence of different binding sites.

Panov and Scarpa (30) also determined a dissociation constant ( $K_d$ ) for  $Mg^{2+}$  of 25  $\mu$ M in the isolated 2-OGDH, with saturating concentrations of thiamine pyrophosphate, coenzyme A, and NAD<sup>+</sup>. Although such a  $K_d$  value for  $Mg^{2+}$  is lower than the  $K_{0.5}$  value obtained in this study (0.48 mM, see Fig. 2), it can be argued that the matrix concentrations of the 2-OGDH coenzymes in intact heart mitochondria may be limiting, and that 2-OGDH activity is not the only controlling step of the pathway (25). The value of the  $K_d$  or  $K_{0.5}$  for  $Mg^{2+}$  may establish the physiological relevance of variations in  $[Mg^{2+}]_m$ . Thus, a  $K_{0.5}$  value of 0.48 mM would appear as more physiologically relevant for modulating 2-OGDH activity and the rate of oxidative phosphorylation, since this concentration is in the range of  $[Mg^{2+}]_m$  in intact mitochondria (31, 32).

It should be noted, however, that the estimated  $K_{0.5}$  values for  $Mg^{2+}$  refers to the external  $Mg^{2+}$  concentrations, which were not fully equilibrated with the mitochondrial matrix by A23187 (cf. Fig. 1). Thus, the  $K_{0.5}$  value of 0.48 mM for external  $Mg^{2+}$  corresponds to a  $[Mg^{2+}]_m$  of 140  $\mu$ M, which is slightly below the physiological range. Higher  $K_{0.5}$  values for  $Mg^{2+}$  were determined at low  $P_i$  concentrations. For instance, a  $K_{0.5}$  value of 1 mM for  $Mg^{2+}$  was observed in NAD(P)H formation with 1 mM  $P_i$  (see Fig. 4A). Such a  $K_{0.5}$  value was diminished to 0.5 mM by increasing  $P_i$  concentration up to 3 mM  $P_i$ . The corresponding  $[Mg^{2+}]_m$  for 1 mM external  $Mg^{2+}$  would be 350  $\mu$ M, a value well within the physiological range. A variation in the cytosolic  $P_i$  concentration from 0.83 to 3.1 mM induced by epinephrine was established in rat heart (33). Therefore, physiological modulation of the 2-OGDH activity by  $Mg^{2+}$  may depend on the level of cytosolic (and matrix)  $P_i$ .

Other possible sites of modulation by  $Mg^{2+}$  during oxidative phosphorylation supported by 2-OG oxidation were the succinyl-CoA synthase, the ATP synthase and hexokinase (in the experiments of <sup>32</sup>P<sub>i</sub> incorporation into ATP). However, the  $Mg^{2+}$  sensitivity of these three enzymes showed that their saturation by  $Mg^{2+}$  was fully achieved at concentrations (<0.2–0.3 mM) that stimulated oxidative phosphorylation by less than 40%. The lack of stimulation of state 4 respiration by  $Mg^{2+}$  in mitochondria that oxidized succinate, in the presence of oligomycin, discarded an effect of  $Mg^{2+}$  at the level of the respiratory chain. Thus, these results indicate that 2-OGDH is one (but not the only) of the main controlling steps of oxidative phosphorylation (see also Moreno-Sánchez *et al.* (26)), at non-saturating  $Mg^{2+}$  concentrations. In this respect, control of the rate of oxidative phosphorylation by changes in the spermine/ $Mg^{2+}$  rates, without a concomitant increase in  $[Ca^{2+}]_m$ , has been shown in dog pancreas mitochondria (19).

Modulation of the 2-OGDH activity by adenine nucleotides is well established (23). A synergistic effect by  $Ca^{2+}$  and adenine nucleotides has been described (28).  $Mg^{2+}$  also activates 2-OGDH (30) (this work), but in contrast to other enzyme effectors, the mechanism of action is by enhancing the catalytic enzyme capacity ( $k_{cat}$ ), rather than by increasing substrate affinity. Potentiation of the modulating effect of  $Mg^{2+}$  by  $P_i$ , although clearly demonstrated in this work, is somewhat puzzling. There is a report describing an activation of purified

2-OGDH by a high concentration of  $P_i$  ( $>10$  mM), through the diminution of the  $K_{0.5}$  for 2-OG (34). Moreover, the  $P_i$  potentiating effect could be through promoting changes in matrix pH, since modulation of 2-OGDH activity by pH has also been reported (35). However, substitution of acetate for  $P_i$ , to induce similar matrix pH values, did not reconstitute the  $Mg^{2+}$  sensitivity of 2-OGDH. Thus, a direct interaction of  $P_i$  with the enzyme is likely to occur. From the present findings, the question that arises is to what extent and how  $P_i$  and  $Mg^{2+}$  affect the interplay of the other well described effectors, such as  $Ca^{2+}$  and adenine nucleotides, and the coenzymes  $NAD^+$ , thiamine pyrophosphate, and coenzyme A, on 2-OGDH activity.

**Acknowledgments**—We thank Drs. A. Gómez-Puyou and G. MacCarthy for their critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Romani, A., and Scarpa, A. (1990) *FEBS Lett.* **269**, 37–40
- Romani, A., Marfella, C., and Scarpa, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 15489–15495
- Zhang, G. H., and Melvin, J. E. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 20721–20727
- Singh, J., and Wisdom, D. M. (1995) *Mol. Cell. Biochem.* **149/150**, 175–182
- Okada, K., San-e, Y., and Toshikazu, S. (1992) *Am. J. Physiol.* **263**, C837–C878
- Zhang, G. H., and Melvin, J. E. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 10352–10356
- Wolf, F. I., Di Francesco, A., Covacci, V., Corda, D., and Cittadini, A. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **331**, 194–200
- Wolf, F. I., Di Francesco, A., Covacci, V., and Cittadini, A. (1994) *Stochem. Biophys. Res. Commun.* **202**, 1209–1214
- Romani, A., Dowell, E., and Scarpa, A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 24376–24384
- Altschuld, R. A., Jung, D. W., Phillips, R. M., Narayan, P., Castillo, L. C., Whitaker, T. E., Hensley, J., Hohl, C. M., and Brierley, G. P. (1994) *Am. J. Physiol.* **266**, H1103–H1111
- Jung, D. W., Apel, L., and Brierley, G. P. (1990) *Biochemistry* **29**, 4121–4128
- Rodríguez-Zavala, J. S., Sarrwedra-Molina, A., and Moreno-Sánchez, R. (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **411**, 179–188
- Kovacic, Z., Day, S. H., Gillett, V., Brosnan, J. T., and Brosnan, M. E. (1995) *Biochem. J.* **305**, 837–841
- Moreno-Sánchez, R., and Hansford, R. G. (1988) *Biochem. J.* **256**, 403–412
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 3440–3450
- Moreno-Sánchez, R. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 12554–12560
- Akerman, K. E., and Saris, N. L. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **426**, 624–629
- Zanotti, A., and Azzone, G. F. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* **201**, 255–265
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enriquez, S., Cuellar, A., and Corona, N. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* **319**, 432–444
- Debono, M., Molloy, R. M., Dorman, D. E., Paschal, J. W., Babcock, D. F., Deber, C. M., and Pfeiffer, D. R. (1981) *Biochemistry* **20**, 6865–6872
- Jung, D. W., Chapman, C. J., Baysal, K., Pfeiffer, D. R., Brierley, G. P. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **332**, 19–29
- Erdahl, W. L., Chapman, C. J., Wang, E., Taylor, K. W., and Pfeiffer, D. R. (1996) *Biochemistry* **35**, 13817–13825
- Rutter, G. A., and Denton, R. M. (1988) *Biochem. J.* **252**, 181–189
- Kozlov, I. A., and Skulachev, V. P. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **463**, 29–39
- Pfaff, E., Heldt, H. W., and Klingenberg, M. (1969) *Eur. J. Biochem.* **10**, 484–493
- Moreno-Sánchez, R., Devars, S., López-Gómez, F., Uribe, A., and Corona, N. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* **1060**, 284–292
- Moreno-Sánchez, R., and Torres-Márquez, M. E. (1991) *Int. J. Biochem.* **23**, 1163–1174
- Rutter, G. A., and Denton, R. M. (1989) *Biochem. J.* **263**, 445–452
- Thomas, A. P., Diggie, T. A., and Denton, R. M. (1986) *Biochem. J.* **238**, 83–91
- Panov, A., and Scarpa, A. (1996) *Biochemistry* **35**, 427–432
- Rutter, G. A., Osbaldeston, N. J., McCormack, J. G., and Denton, R. M. (1990) *Biochem. J.* **271**, 627–634
- Murphy, E., Freudenrich, C. C., and Lieberman, M. (1991) *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 273–283
- Headrick, J., Dobson, G., Williams, J., McKirdy, J., Jordan, L., and Willis, R. (1994) *Am. J. Physiol.* **267**, H1074–H1084
- Lawlis, V. B., and Roche, T. E. (1981) *Biochemistry* **20**, 2512–2518
- Smith, B. C., Clotfelter, L. A., Cheung, J. Y., and La Noue, K. F. (1992) *Biochem. J.* **284**, 819–826

## b) Trabajo No. 2.

En el segundo trabajo se demostró que existe una interacción física del Pi con la 2-OGDH para activarla. Se demuestra además, que esta activación ocurre a concentraciones fisiológicas de fosfato ( $< 5$  mM), aunque también puede ocurrir a concentraciones de Pi mayores a 10 mM como fue reportado anteriormente por otros autores.

Los datos relevantes de este trabajo son los que demuestran que no solamente el  $Mg^{2+}$ , el Pi, el ADP o el ATP libres son las especies que modulan la actividad de la 2-OGDH como se pensaba anteriormente, sino que los complejos formados por el  $Mg^{2+}$  con los otros ligandos (Mg-Pi, Mg-ADP, Mg-ATP), son efectores aún más potentes de la 2-OGDH. El mecanismo de activación por el Pi, el ADP, el Mg-Pi y el Mg-ADP sobre la enzima aislada fue mediante el aumento de la afinidad de la 2-OGDH por su sustrato y el incremento de la velocidad máxima de la reacción. En contraste, el ATP inhibió a la 2-OGDH por dos mecanismos: secuestrando al  $Mg^{2+}$  libre y disminuyendo la velocidad máxima de la reacción. En la enzima aislada el ATP no afectó la afinidad de la enzima por el sustrato, pero en el extracto mitocondrial el ATP incrementó la afinidad de la 2-OGDH por 2-OG en un 100%. De estos experimentos se pudo establecer el siguiente orden de potencia: Mg-ADP > Mg-Pi > ADP > Pi >  $Mg^{2+}$ .

Se ensayó si el Pi tenía algún efecto modulador sobre la activación de la 2-OGDH por  $Ca^{2+}$ , pero se demostró que el Pi no ejerce ningún efecto y que el  $Ca^{2+}$  libre es el verdadero activador de la 2-OGDH. Se demostró también que cambios en la  $[Mg^{2+}]$  en el intervalo fisiológico no afectan la afinidad de la 2-OGDH por  $Ca^{2+}$ . Esto hace factible la activación de la 2-OGDH por una liberación simultánea de ambos cationes bajo un estímulo hormonal o eléctrico, dejando de lado la posibilidad de un

efecto antagónico al encontrarse los dos cationes presentes. Contrario a esto, se observó un efecto sinérgico del  $Mg^{2+}$  y el  $Ca^{2+}$  sobre la activación de la 2-OGDH.

Se encontraron diferencias en el comportamiento cinético de la 2-OGDH aislada y de la enzima en el extracto mitocondrial. Estas diferencias ocurrieron principalmente cuando se ensayó el efecto de los diferentes ligandos en presencia o en ausencia de  $Mg^{2+}$ , sobre la afinidad por el sustrato. En el extracto mitocondrial, las curvas obtenidas fueron sigmoideas, la respuesta a los efectores en presencia de  $Mg^{2+}$  fue muy similar y el efecto inhibitor del ATP fue más potente, mientras que en la enzima aislada se obtuvieron curvas hiperbólicas, la respuesta a los efectores en presencia de  $Mg^{2+}$  fue de 3 a 4 veces mayor que en su ausencia y el efecto inhibitor del ATP fue menos potente.

De los datos de este trabajo podemos obtener las siguientes conclusiones: la activación por fosfato de la 2-OGDH es de manera directa por su unión a la enzima; esta activación se lleva a cabo a concentraciones fisiológicas de  $P_i$ ; el mecanismo de activación de la 2-OGDH por  $P_i$  es incrementando la afinidad de la enzima por el sustrato y elevando la velocidad máxima de la reacción; además del  $Mg^{2+}$ , el  $P_i$  y el ADP, los complejos  $Mg-P_i$  y  $Mg-ADP$  también activan a la 2-OGDH; los complejos  $Mg-P_i$  y  $Mg-ADP$ , son activadores mas potentes de la enzima; en el proceso de aislamiento de la 2-OGDH se pierde algún factor esencial para la regulación del comportamiento cinético de la enzima.



# Modulation of 2-Oxoglutarate Dehydrogenase by Inorganic Phosphate, Mg<sup>2+</sup> and Other Effectors<sup>‡</sup>.

José Salud Rodríguez-Zavala\*, Juan Pablo Pardo<sup>‡</sup> and Rafael Moreno-Sánchez.  
Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología. México, D.F., 14080, México. <sup>‡</sup>. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

## Key words:

2-oxoglutarate dehydrogenase, magnesium, phosphate, mitochondria.

Running title: Activation of 2-OGDH.

## \* Corresponding author:

José Salud Rodríguez-Zavala.  
Departamento de Bioquímica  
Instituto Nacional de Cardiología  
Juan Badiano # 1, Col. Sección XVI  
México, D.F. 14080, México.  
Fax:(525) 573-0926.  
E-mail: [rzavala@cenids.ssa.gob.mx](mailto:rzavala@cenids.ssa.gob.mx)

<sup>‡</sup> This work was partially supported by grants from CONACyT-México 25274-M, PADEP-UNAM 05354 and PADEP-UNAM 05345.

\* Enviado para su publicación a la revista **Biochemistry**.

## ABSTRACT

The interplay of inorganic phosphate (Pi) with other ligands such as  $Mg^{2+}$ , ADP, ATP and  $Ca^{2+}$  on the activation of 2-oxoglutarate dehydrogenase (2-OGDH) in both isolated enzyme complex and mitochondrial extracts was examined. Pi alone activated the enzyme, following biphasic kinetics with high ( $K_{0.5}=1.96 \pm 0.42$  mM) and low ( $K_{0.5}=9.8 \pm 0.4$  mM) affinity components for Pi. The activation by Pi was highly pH-dependent; it increased when the pH was raised from 7.1 to 7.6, but it was negligible at pH values below 7.1. Mg-Pi and Mg-ADP but not Mg-ATP were more potent activators of 2-OGDH than Pi and ADP. ATP inhibited the 2-OGDH activity by chelating the free  $Mg^{2+}$ . With or without  $Mg^{2+}$ , ADP and Pi activated the 2-OGDH by increasing the affinity for 2-OG and the  $V_m$  of the reaction; ATP diminished the  $V_m$ , but it increased the affinity for 2-OG in the mitochondrial extract. Pi did not modify the 2-OGDH activation by  $Ca^{2+}$ . The results above mentioned were similar for both preparations, except for hyperbolic kinetics in the isolated enzyme and sigmoidal kinetics in the mitochondrial extracts when 2-oxoglutarate was varied. The data of this study indicated that physiological concentrations of Pi may exert a significant activation of 2-OGDH, which was potentiated by  $Mg^{2+}$  and high pH, but surpassed by ADP.

2-oxoglutarate dehydrogenase (2-OGDH) is a member of the thiamine pyrophosphate-requiring 2-oxoacid dehydrogenase complex family (1). This complex consist of three different enzymes: oxoglutarate dehydrogenase (E1), dihydrolipoamide succinyltransferase (E2) and dihydrolipoamide dehydrogenase (E3). Functional 2-OGDH shows a stoichiometry of 12 E1, 24 E2 and 12 E3 subunits (2). The cDNA sequences of 2-OGDH from different species are already available (3-7).

Modulation of 2-OGDH activity by  $\text{Ca}^{2+}$ , ADP, ATP, GTP,  $\text{NAD}^+$ , NADH, CoA and succinyl-CoA is well documented (8-12). An increase in the affinity for 2-oxoglutarate is promoted by  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{NAD}^+$ , ADP and apparently ATP (8,10,12). ATP as well as GTP (8) have also been described as inhibitors of the 2-OGDH activity. NADH and succinyl-CoA, the end products of the enzyme complex, induce feed-back inhibition on the first reaction (8,10). The affinity of 2-OGDH for  $\text{Ca}^{2+}$  is enhanced by ADP and diminished by ATP (12). Recently, it was shown that  $\text{Mg}^{2+}$  increased the  $V_m$  of the isolated 2-OGDH from pig heart by interacting with a binding site different of that for  $\text{Ca}^{2+}$  (13).

In a previous work we showed that changes in external  $\text{Mg}^{2+}$ , and hence in matrix free  $\text{Mg}^{2+}$ , could modulate the 2-OGDH activity and the rate of oxidative phosphorylation in intact rat heart mitochondria (14).  $\text{Mg}^{2+}$  also affected respiratory rates in rat liver mitochondria through the modulation of the activities of the succinate and glutamate dehydrogenases (15). These observations may have physiological relevance since several recent reports have established that the cytosolic and intramitochondrial free  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations may change in response to different hormones and agonists in different types of cells (16-20); this, however, remains controversial (21).

Mg<sup>2+</sup> activation of 2-OGDH was potentiated by physiological concentrations of Pi (<5 mM), which resulted in decrease of the K<sub>0.5</sub> value for Mg<sup>2+</sup> and elevation of the V<sub>max</sub> (14). An earlier report described an activation of bovine kidney 2-OGDH by Pi, but in the concentration range of 10 to 20 mM (8), concentrations which are well above the physiological range (22). The activation by Pi was due to an increase in the affinity of 2-OGDH for 2-oxoglutarate (8).

The activation of 2-OGDH by low Pi concentrations described in intact mitochondria could be the result of a direct interaction with the enzyme complex or by changing the concentration of other modulating factors such as Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> or adenine nucleotides. Therefore, we examined the effect of Pi on the activity of 2-OGDH in the presence of different effectors in the purified enzyme and mitochondrial extracts.

## MATERIALS AND METHODS

Isolated pig heart 2-OGDH was purchased from Sigma Chemical Co. Two different enzyme preparation lots were used. The enzyme solution contained 50% glycerol, 10 mg bovine serum albumin/ml, 30% sucrose, 2.5 mM EGTA, 2.5 mM EDTA, 2.5 mM 2-mercaptoethanol, 0.5% Triton X-100, 0.005% sodium azide, 25 mM potassium phosphate, pH 6.8, 11 or 9.7 mg protein/ml; the specific activity was 0.63 or 1 units/mg protein. The enzyme solution was stored in aliquots of 1 ml at -10°C. No activity was lost after a year of storage.

Rat heart mitochondria were isolated from male Wistar rats of 250-300 g, according to a previously described method, incubating two hearts in SHE medium (250 mM sucrose, 10 mM HEPES, 1 mM EGTA, pH 7.4), in the presence of 1 mg of the

protease Nagarse (protease type XXVII, Sigma Chemical; specific activity 10 units/mg), on ice for 9 min (23).

**Mitochondrial extracts.** Freshly prepared mitochondria (5 mg protein/ml) were suspended in SHE medium, containing 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5% BSA, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol and solubilized with 0.2% Triton X-100. This mitochondrial solution was diluted with glycerol (1:1) and stored at  $-10^{\circ}\text{C}$  until use; under these conditions the 2-OGDH activity remained constant for at least one month. After one month, activation by Pi and  $\text{Mg}^{2+}$  started to diminish, although activation by  $\text{Ca}^{2+}$  and ADP remained unchanged. In extracts prepared by freezing in liquid  $\text{N}_2$  and fast thawing at  $40^{\circ}\text{C}$  three times (11), the 2-OGDH activity was much lower and unstable than in Triton-solubilized mitochondria.

**2-OGDH activity.** An aliquot of mitochondrial extract (0.5 mg protein/ml) or isolated pig heart 2-OGDH (0.055 mg protein/ml) was suspended in a medium containing 120 mM KCl, 20 mM MOPS-K (pH 7.35), 0.5 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM thiamine pyrophosphate (TPP), 1 mM  $\text{NAD}^+$ , 0.25 mM CoA, 0.5 mM 2-oxoglutarate at  $30^{\circ}\text{C}$ . Fresh solutions of TPP,  $\text{NAD}^+$  and DTT were used throughout this study. Other additions were as indicated in the figure legends. NADH formed was determined following the absorbance at 340 nm in a dual beam Aminco DW2000 spectrophotometer. The reduction of  $\text{NAD}^+$  either in the absence of 2-oxoglutarate, CoA or TPP was negligible. The determination of 2-OGDH activity by measuring NADH absorbance instead of NADH fluorescence was used because it exhibited lower variations (24).

The concentrations of free  $Mg^{2+}$ , free  $Ca^{2+}$ , Pi-Mg, ADP-Mg and ATP-Mg were calculated with the use of the computer program CHELATOR (25). Fitting of equations to experimental data was done by using the computer program ORIGIN Ver 3.73 (Microcal Software Inc.).

## RESULTS

### Activation by Pi and pH.

To examine whether the effect of Pi on the 2-OGDH activity observed in intact mitochondria (14) was due to a direct interaction with the enzyme complex, the effect of Pi on the commercially available 2-OGDH and on extracts from rat heart mitochondria was measured. The addition of Pi induced a significant stimulation of the activity in both, the isolated enzyme and the mitochondrial extract with two kinetic components (Fig. 1): a high affinity component for Pi concentrations lower than 5 mM, and a second component of low affinity at Pi concentrations larger than 7 mM.

Variations in pH activate the 2-OGDH complex isolated from heart and kidney (10,11). Therefore, the effect of pH on the activation of isolated 2-OGDH by Pi was assayed. In agreement with earlier reports, the lowering of pH from 7.6 to 6.8 promoted a six-fold stimulation of the enzyme activity. However, when the pH value was lower than 7.1 the activation by Pi disappeared (Table I). Enzyme activation by Pi was high at pH values between 7.2 and 7.6, which is the range of pH values determined for the mitochondrial matrix environment (26,27). The effect of pH on the activation of the enzyme by Pi was similar when either the isolated enzyme (Table I) or the mitochondrial extract were used (data not shown).

### Activation by Pi, Mg<sup>2+</sup> and ADP.

As in intact mitochondria (14), Pi potentiated the Mg<sup>2+</sup> induced activation of isolated 2-OGDH; it produced a slight increase in the affinity for Mg<sup>2+</sup>, but a significant elevation of the apparent V<sub>m</sub> (Fig. 2A). ADP also increased the affinity for Mg<sup>2+</sup> and V<sub>m</sub> (Fig. 2A), but the combination of Pi + ADP did not increase further the affinity for Mg<sup>2+</sup>, *albeit* it brought about a greater rise in V<sub>m</sub> (see table 2 for values of K<sub>0.5</sub> and V<sub>m</sub>). In Fig. 2<sup>a</sup> activity was plotted against total concentrations of Mg<sup>2+</sup> in the presence or absence of Pi and ADP. When the concentrations of free Mg<sup>2+</sup> and Mg-complexes were considered, it was evident the following order of potency for 2-OGDH activation: Mg-ADP > Mg-Pi > Mg<sup>2+</sup> (Fig. 2B). The additive activating effect observed for the combination Mg-ADP + Mg-Pi suggested the existence of independent sites for each complex.

To explore further whether the Mg-ADP complex is a true activating molecule, the effect of different concentrations of Mg<sup>2+</sup> and ADP on the 2-OGDH activity was assayed without (Fig. 3A) or with 5 mM Pi (Fig. 4A). It may be noted that the activating effect of ADP in the absence of Mg<sup>2+</sup> was negligible without Pi (Fig. 3A) or small with Pi (Fig. 4A). Replotting the concentrations of Mg-ADP (Fig. 3B, 4B), free Mg<sup>2+</sup> (Fig. 3C) or Mg-Pi (Fig. 4C), from the data in Fig. 3A or 4A, indicated that the increase in 2-OGDH activity was more closely related to variations in Mg-ADP concentration.

### Effect of ATP on the 2-OGDH activity.

In contrast to ADP, the addition of ATP induced a significant diminution of 2-OGDH activity in the presence of different concentrations of  $Mg^{2+}$  (Fig 5A). In the absence of added  $Mg^{2+}$  (+ 0.2 mM EDTA), ATP did not affect the activity of 2-OGDH. The estimation of free  $Mg^{2+}$  and Mg-ATP complex concentrations from the data of Fig. 5A, revealed that the inhibition of 2-OGDH activity by ATP was related to the diminution in the concentration of free  $Mg^{2+}$  (Fig 5B), and that the Mg-ATP complex by itself did not affect the activity of the enzyme complex (Fig. 5C).

#### Modulation of the 2-OGDH kinetics.

To further understand the modulation of 2-OGDH by Pi and its interplay with  $Mg^{2+}$  and other effectors, the effect of ADP, ATP, and Pi with or without  $Mg^{2+}$  on the affinity of 2-OGDH for 2-OG and on the  $V_m$  was determined. In the absence of  $Mg^{2+}$ , ADP and Pi diminished the  $K_{0.5}$  of 2-OGDH for 2-OG and enhanced the  $V_m$ , and ATP induced a significant diminution of the affinity of 2-OGDH for its substrate and  $V_m$  (Fig. 6A) (see Table II for values of  $K_{0.5}$  and  $V_m$ ). In the presence of  $Mg^{2+}$ , ADP (or rather Mg-ADP) also increased the affinity for 2-OG and the  $V_m$ , whereas ATP induced a slightly diminution in the  $V_m$  and in the affinity for the substrate. Pi also increased the affinity for 2-OG and the  $V_m$  of the reaction, but to an extent lower than that observed with ADP (Fig. 6B). In all conditions,  $Mg^{2+}$  increased by three fold the  $V_m$ . Without  $Mg^{2+}$ , the inhibitory effect of ATP was less apparent. The data of Fig. 6 indicated the following order of potency for stimulation of 2-OGDH activity: Mg-ADP>Mg-Pi> $Mg^{2+}$ >ADP>Pi.

In the mitochondrial extracts, the effect of Pi,  $Mg^{2+}$ , ADP and ATP on the affinity of 2-OGDH for 2-OG and the true  $V_m$  (Fig. 7) was similar to that observed in the isolated



enzyme. However, in contrast to the isolated enzyme (cf. Fig 6), mitochondrial extracts exhibited well-defined sigmoidal kinetics (Fig. 7). The Hill coefficients were not significantly different from one for the isolated enzyme, but they were higher than one ( $P < 0.01$ ) in the mitochondrial extracts (see legends to Figs. 6 and 7 for values).

#### Activation by Pi, Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup>.

To assess whether the Ca-Pi complex also influenced the activity of isolated 2-OGDH, we measured the stimulation by Ca<sup>2+</sup> at different Pi concentrations with or without ADP. The results indicated that the  $K_{0.5}$  value for Ca<sup>2+</sup> (0.27-0.34  $\mu$ M) was not modified by the presence of Pi or ADP (data not shown). Increasing Mg<sup>2+</sup> in the physiological range (100-600  $\mu$ M) did not alter the Ca<sup>2+</sup> activation of 2-OGDH, but instead it promoted the elevation of the apparent  $V_m$  (Fig. 8). Hence, instead of an antagonistic effect between the two cations, there is a synergistic activating effect of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> on 2-OGDH, through an increase in both, the affinity for 2-OG (Ca<sup>2+</sup>) and the catalytic turnover (Mg<sup>2+</sup>).

Table II summarizes the effect of Pi and the other effectors on the  $K_{0.5}$  value for different ligands and the apparent  $V_m$  obtained with the isolated enzyme and the mitochondrial extracts. The  $K_{0.5}$  value of the enzyme for ADP was about three-fold higher in the extracts, while the  $K_{0.5}$  for Pi was slightly larger than the value in the isolated enzyme. The  $K_{0.5}$  value for Mg<sup>2+</sup> and 2-OG (+ ATP, + Mg<sup>2+</sup>, and + Mg<sup>2+</sup> + ADP) in the extracts were similar to those observed with the isolated enzyme. The  $K_{0.5}$  values for Ca<sup>2+</sup> and 2-OG (in the absence of effectors or in the presence of ADP) were larger,

while the  $K_{0.5}$  values for Mg-Pi, 2-OG (+ Pi, + ATP + Mg<sup>2+</sup> and + Pi + Mg<sup>2+</sup>) were lower than those determined in the isolated enzyme.

Analysis of the  $V_m$  values revealed other differences between both preparations. In the isolated enzyme, the addition of Mg<sup>2+</sup> increased 3-4 times the  $V_m$ , when the 2-OG concentration was varied. In contrast, in the mitochondrial extracts, Mg<sup>2+</sup> did not enhance further the  $V_m$ , in comparison to values obtained in its absence.

## DISCUSSION

It was previously reported that Mg<sup>2+</sup> (13,14) and Pi (8,9,14) activated 2-OGDH and that Pi modulated the Mg<sup>2+</sup> activation in intact heart mitochondria (14); however, the mechanism of activation by Pi was not elucidated. Here we show that the interaction of Pi with 2-OGDH enhances the apparent  $V_m$  and that Mg-ADP, but not Mg-ATP, is a potent activator of the isolated 2-OGDH. The observation that Mg-Pi stimulates the 2-OGDH activity in the presence of saturating Mg-ADP, suggests the existence of different sites of modulation in the enzyme complex for these effectors. The activation of 2-OGDH by ADP has been well documented (8-11), but according to our data, the ADP site can also be occupied by the Mg-ADP complex. Thus, the previously reported activating effect of ADP (8-11), could be attributed to the ADP-Mg complex, since the assay reaction medium contained 1 (10,11) or 2 mM (8,9) Mg<sup>2+</sup> and, in consequence, the true activator of 2-OGDH could be Mg-ADP.

In contrast, ATP clearly exerts an inhibitory effect on 2-OGDH activity. Since Mg<sup>2+</sup> induces an increase in the apparent  $V_m$ , then ATP, by decreasing the concentration of free Mg<sup>2+</sup>, brings about a diminution in the  $V_m$ . In addition, ATP

attenuates the 2-OGDH activation by  $\text{Ca}^{2+}$  (12). However, ATP is also able to increase the affinity for 2-OG, leading to enzyme activation. Therefore, the effect of ATP on 2-OGDH activity will depend on the specific incubation conditions, although in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , a strong inhibition will be predicted, whereas in the absence of the cations a slight activation would be expected (see Figs. 5-7 and Table II).

The activation of 2-OGDH by lowering pH (Table II) is in agreement with previous observations in pig heart 2-OGDH (10), and bovine heart and kidney enzymes (8). The 2-OGDH activation by  $\text{P}_i$  is also pH dependent, which is negligible at low pH and enhanced at high pH. This suggests that  $\text{HPO}_4^{2-}$  is the active  $\text{P}_i$  species or that at high pH values, some deprotonated aminoacid residues are involved in the binding of  $\text{P}_i$ . This finding may explain why the effect of  $\text{P}_i$  at physiological concentrations was not observed before and why other authors [8] observed activation by  $\text{P}_i$  solely at concentrations higher than 15 mM.

When the affinity of isolated 2-OGDH for 2-OG is determined under different conditions, the experimental curves show hyperbolic kinetics in agreement with earlier reports (9,13), whereas with mitochondrial extracts, the curves are clearly sigmoidal, as in toluene-permeabilized mitochondria and mitochondrial extracts (12). Other clear differences are the values of  $V_m$  attained at saturating concentrations of 2-OG, in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$ , and the activating effect of ATP. The values of  $V_m$  obtained with mitochondrial extracts with or without  $\text{Mg}^{2+}$  are not significantly different, but with the isolated enzyme the values in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  were up to four-fold higher. ATP increases the affinity of the enzyme for 2-OG with or without  $\text{Mg}^{2+}$  in the mitochondrial extract, but in the isolated enzyme ATP did not affect the affinity of the 2-OGDH for 2-

OG. The kinetic differences between the isolated enzyme and the mitochondrial extracts, suggest that in the process of enzyme isolation, a factor is lost or a change in the original conformation of the enzyme occurs, that induces a kinetic change with respect to substrate and other ligands.

*The activation of 2-OGDH by  $\text{Ca}^{2+}$  is not inhibited by increasing the  $\text{Mg}^{2+}$  concentration in the physiological range (100-600  $\mu\text{M}$ ), rather the effect of both cations is additive. After agonist stimulation,  $[\text{Mg}^{2+}]_c$  raises from 0.5 to 0.8 mM (16-20),  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  also increases from 0.1 to 0.6  $\mu\text{M}$  (28), cytosolic Pi concentration rises from 0.83 to 3.13 mM, and the pH remains constant at 7.35 in whole rat heart (22). These changes may produce a synergistic activating effect of 2-OGDH by both divalent cations and Pi, which may stimulate the rate of oxidative phosphorylation (14). In consequence, the finding that Pi modulates the 2-OGDH activity may have physiological relevance.*

**Acknowledgments:** The authors thank Dr. A. Gómez-Puyou for his critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

1. Sanderson, S. J., Khan, S. S., McCarntey, R. G., Miller, C., and Lindsay, J. G. (1996) *Biochem. J.* 319, 109-116.
2. Nichols, B. J., and Denton, R. M. (1995) *Mol. Cell. Biochem.* 149/150, 203-212.
3. Berg, A., Vervoort, J., and Kok, A. (1996) *J. Biol. Mol.* 261, 432-442.
4. Hein, S., and Steinbüchel, A. (1996) *FEMS Microbiol. Lett.* 136:3, 231-238.
5. Ricaud, P. M., Howard, M. J., Roberts, E. L., Broadhurst, R. W., and Perham, R. N. (1996) *J. Mol. Biol.* 264, 179-190.
6. Usuda, Y., Tujimoto, N., Abe, C., Asakura, Y., Kimura, E., Kawahara, Y., Kurahashi, O., and Matsui, H. (1996) *Microbiology* 142, 3347-3354.
7. Moteki, S., Leung, P. S., Dickson, E. R., Van Thiel, D. H., Galperin, C., Buch, T., Alarcon, S. D., Kershenovich D., Kawano, K., Coppel, R. L. (1996) *Hepatology.* 23, 436-444.
8. Lawlis, V. B., and Roche, T. E. (1981) *Biochemistry* 20, 2512-2518.
9. Lawlis, V. B., and Thomas, E. R. (1981) *Biochemistry* 20, 2519-2524.
10. McCormack, J. G., and Denton, R. M. (1979) *Biochem. J.* 180, 533-544.
11. McCormack, J. G., and Denton, R. M. (1981) *Biochem. J.* 196, 619-624
12. Rutter, G. A. And Denton, R. M. (1988) *Biochem. J.* 252, 181-189.
13. Panov, A., and Scarpa, A. (1996) *Biochemistry* 35, 427-432.
14. Rodríguez-Zavala, J.S., and Moreno-Sánchez R. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 7850-7855.
15. Panov, A., and Scarpa, A. (1996) *Biochemistry* 35, 12849-12856.
16. Romani, A., and Scarpa, A. (1990) *FEBS Lett.* 269, 37-40.

17. Romani, A., Marfella, C., and Scarpa, A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 15489-15495.
18. Zhang, G. H., and Melvin, J. E. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 20721-20727.
19. Singh, J., and Wisdom, D. M. (1995) *Mol. Cell. Biochem.* 149/150, 175-182.
20. Okada, K., San-e, Y., and Toshikazu, S. (1992) *Am. J. Physiol.* 263, C837-C878.
21. Altschuld, R. A., Jung, D. W. Phillips, R. M. Narayan, P., Castillo, L. C., Whitaker, T. E., Hensley, J., Hohl, C. M., and Brierley, G. P. (1994) *Am. J. Physiol.* 266, H1103-H1111.
22. Headrick, J. P., Dobson, G. P., Williams, J. P., McKirdy, J. C., Jordan, L. and Willis, R. J. (1994) *Am. J. Physiol.* 267, H1074-H1084.
23. Moreno-Sánchez, R., and Hansford, R. G. (1988) *Biochem. J.* 256, 403-412.
24. Shoenmakers, T. J. M., Visser, G. F., and Theuvenet, A. P. R. (1992).  
*Biotechniques* 12, 870-879.
25. Vinogradov, A., Scarpa, A., and Chance, B. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 646-654.
26. Kapus, A., Ligeti, E., and Fonyó, A. (1989) *FEBS. Lett.* 251, 49-52.
27. Jung, D. W., Davis, M. H., and Brierley, G.P. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* 263, 19-28.
28. Denton, M.R., and McCormack, G. J. (1990) *Annu. Rev. Physiol.* 52, 451-466.

Table I. Activation of isolated 2-OGDH by Pi at different pH values.

pH	v (nmol NADH/min/mg)		
	[Pi] = 0	5 mM	15 mM
7.6	6.6	13.3	26.5
7.4	13.3	19.9	26.5
7.25	15.8	21.1	25.7
7.1	20.1	25.4	29.0
7.05	30.5	33.8	33.8
6.9	38.7	38.7	38.7
6.8	45.3	45.3	45.3

Table II. Kinetic parameters of the 2-OGDH activity in the isolated enzyme and in mitochondrial extracts for different ligands.

Ligand	Isolated Enzyme		Mitochondrial Extract	
	$K_{0.5}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_m$ (nmol NADH/min/mg)	$K_{0.5}$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_m$ (nmol NADH/min/mg)
Pi (High affinity)	1200 (2)	49.7 (2)	1960 $\pm$ 420 (6)	6.1 $\pm$ 1.9 (6)
Pi (Low affinity)	10800 (2)	63 (2)	9790 $\pm$ 390 (4)	8.3 $\pm$ 2.5 (4)
Mg <sup>2+</sup>	143.6 $\pm$ 14 (3)	58 $\pm$ 26 (3)	115 $\pm$ 30 (6)	9.5 $\pm$ 6.6 (6)
Mg-ADP	6.9 $\pm$ 2.6 (5)	288 $\pm$ 25 (5)	-	-
Mg-Pi	26 (2)	150 (2)	12 (2)	13 (2)
ADP	115 $\pm$ 35 (5)	70.5 $\pm$ 7(5)	406 $\pm$ 112 (6)	58 $\pm$ 8 (6)
Ca <sup>2+</sup>	0.224 $\pm$ 0.039 (8)	46 $\pm$ 16 (8)	0.279 (2)	52 (2)
2-OG	3200 $\pm$ 2100 (3)	147 $\pm$ 49 (3)	6100 $\pm$ 2300 (3)	60 $\pm$ 11 (3)
2-OG (+ ADP)	810 $\pm$ 200 (3)	166 $\pm$ 29 (3)	1380 $\pm$ 120 (3)	72 $\pm$ 2 (3)
2-OG (+ATP)	3400 $\pm$ 1800 (3)	116 $\pm$ 37 (3)	3070 $\pm$ 180 (3)	33 $\pm$ 2 (3)
2-OG (+Pi)	3700 $\pm$ 1200 (3)	178 $\pm$ 36 (3)	1800 (2)	79(2)
2-OG (+ Mg <sup>2+</sup> )	4200 $\pm$ 2700 (3)	556 $\pm$ 213 (3)	5210 (2)	64.5 (2)
2-OG (+ ADP + Mg <sup>2+</sup> )	1300 $\pm$ 600 (3)	652 $\pm$ 127 (3)	1460 (2)	75 (2)
2-OG (+ ATP + Mg <sup>2+</sup> )	4300 $\pm$ 1500 (3)	399 $\pm$ 109 (3)	1980 (2)	33 (2)
2-OG (+ Pi + Mg <sup>2+</sup> )	3900 $\pm$ 1900 (3)	590 $\pm$ 172 (3)	1130 (2)	75.6 (2)

Values shown are mean  $\pm$  standard deviation



## FIGURE LEGENDS

Figure 1. Activation of 2-OGDH by Pi. Aliquots of isolated enzyme (0.055 mg/ml) or mitochondrial extracts (0.5 mg/ml) were incubated in KME medium (plus 2  $\mu$ M rotenone with the extracts) as described under Materials and Methods, in the presence of the indicated Pi concentrations.  $\circ$ , isolated enzyme;  $\bullet$ , mitochondrial extracts. The solid line represent the best fit to a double Hill equation. The values of the Hill coefficients for the isolated enzyme were 3.6 and 2.9 ( $n=2$ ) and for the mitochondrial extracts were  $1.97 \pm 0.93$  and  $5.4 \pm 1.27$  ( $n=4$ ) for the range of Pi concentration of 0 to 5 mM and of 5 to 15 mM, respectively. Values are mean of two experiments made with two different lots of the isolated enzyme or mean  $\pm$  SD of 5 different extract preparations. The maximal activity measured in the presence of 15 mM Pi was 63 ( $n=2$ ) and  $8.3 \pm 2.5$  ( $n=4$ ) nmol NADH  $\text{min}^{-1}$  (mg protein) $^{-1}$  for the isolated enzyme and the mitochondrial extracts, respectively.

Figure 2. Modulation of isolated 2-OGDH activity by  $\text{Mg}^{2+}$ , Pi and ADP. Isolated 2-OGDH (0.055 mg protein/ml) was incubated as described under Materials and Methods with the indicated concentrations of  $\text{MgCl}_2$ . **A**,  $\bullet$ , No Pi or ADP added;  $\blacksquare$ , + 5 mM Pi;  $\circ$ , + 600 $\mu$ M ADP;  $\square$ , + 5 mM Pi and 600  $\mu$ M ADP. **B**, the concentrations of free  $\text{Mg}^{2+}$ , and Pi-Mg and ADP-Mg complexes were calculated from the data shown in A by using the CHELATOR program [19].  $\bullet$ , free  $\text{Mg}^{2+}$ ;  $\blacksquare$ , Mg-Pi;  $\circ$ , Mg-ADP;  $\square$ , Mg-ADP but Mg-Pi is also present. The curves shown are representative of 5 different experiments; solid lines represent the best fit to the Hill equation. The units of  $V_m$  are nmol NADH  $\text{min}^{-1}$

(mg protein)<sup>-1</sup>. The range of Hill coefficients values was of 1.41 to 2.28, except for the curve obtained in the presence of Mg-ADP + Mg-Pi (□), where the value was not significantly different from one.

Figure 3. Activation of isolated 2-OGDH by Mg-ADP complex. **A**, ●, no Mg<sup>2+</sup> added; □, + 25 μM Mg<sup>2+</sup>; ▲, + 50 μM Mg<sup>2+</sup>; ▽, + 200 μM Mg<sup>2+</sup>. In **B**, the Mg-ADP concentration for each point of figure A was calculated and plotted against activity. **C**, free Mg<sup>2+</sup> concentration for each point of Figure A was calculated and plotted against activity. Solid lines represent the best fit to the Hill equation. The Hill coefficient for curve B was not significantly different from one.

Figure 4. Effect of Mg<sup>2+</sup> and Pi on the affinity of isolated 2-OGDH for ADP. Isolated 2-OGDH (0.055 mg protein/ml) was incubated under the conditions described for Figure 3, in the presence of 5 mM Pi. Figure **A**, total ADP concentration added is plotted against activity. ●, no Mg<sup>2+</sup> added; □, + 25 μM Mg<sup>2+</sup>; ▲, + 50 μM Mg<sup>2+</sup>; ▽, + 200 μM Mg<sup>2+</sup>. In **B** and **C**, Mg-ADP and Mg-Pi concentrations were calculated for each point of A and plotted against activity. Curves are representative of 3 different experiments. The Hill coefficient for curve B was not significantly different from one.

Figure 5. Inhibition of isolated 2-OGDH by ATP. ●, no Mg<sup>2+</sup> added; ■, + 50 μM Mg<sup>2+</sup>; ▲, + 200 μM Mg<sup>2+</sup>; ▽, + 400 μM Mg<sup>2+</sup>; ◆, + 600 μM Mg<sup>2+</sup>. In **B** and **C**, concentrations of free Mg<sup>2+</sup> and Mg-ATP complex were calculated for each point of Figure A and plotted against activity. Note that the X-axis in B decreases from left to right. Plots are the

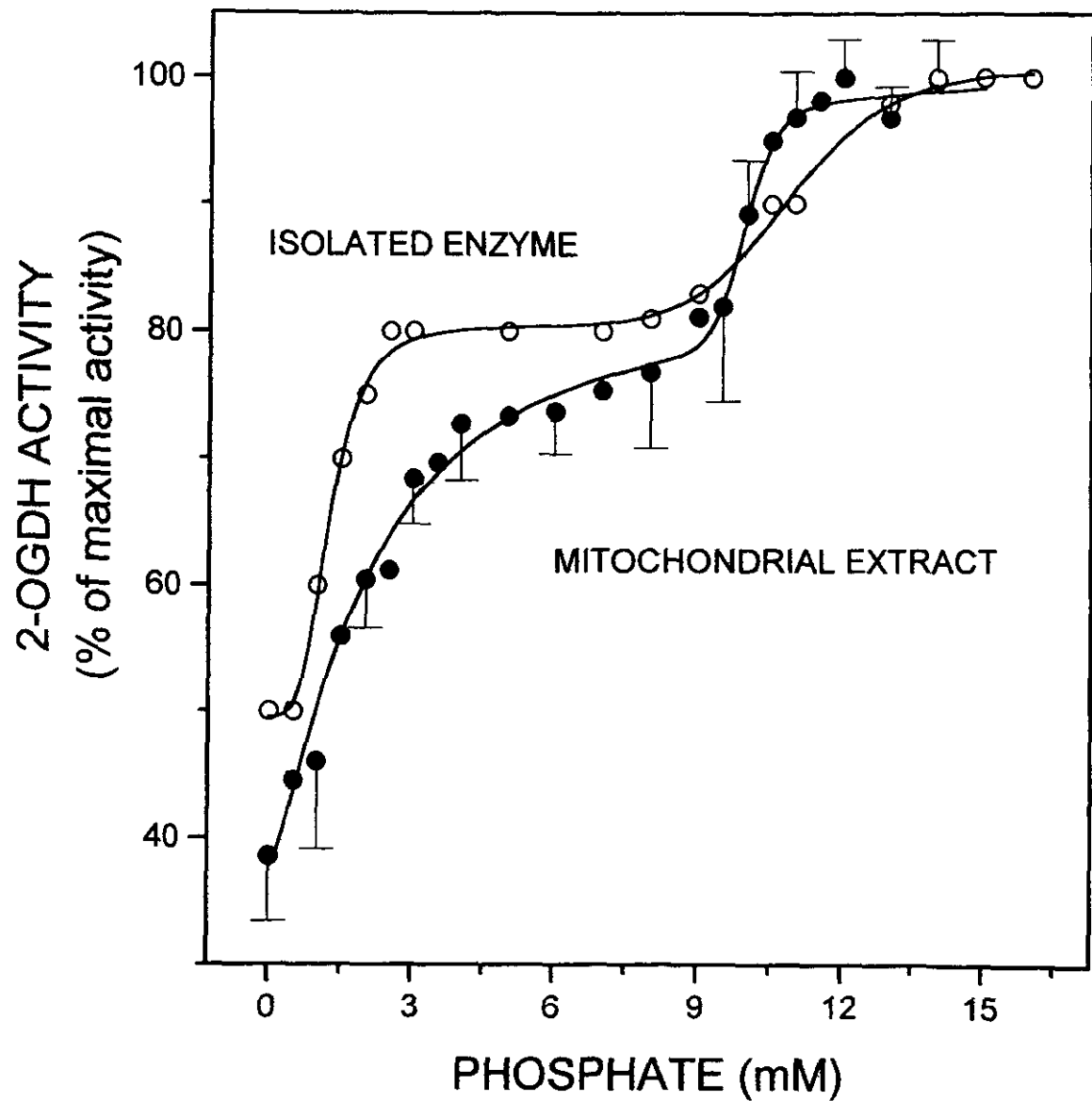
mean  $\pm$  S. D. of 3 different experiments. Solid lines represent a fit to a single exponential decay, but they have no mechanistic implications.

Figure 6. Effect of ADP, ATP, Pi and  $Mg^{2+}$  on the isolated 2-OGDH kinetics. Isolated 2-OGDH (0.055 mg protein/ml) was incubated as indicated under Materials and Methods in the presence of different concentrations of 2-OG. A. ●, no further additions (control); ◆, + 5 mM Pi; ■, + 600  $\mu$ M ADP;  $\Delta$ , + 600  $\mu$ M ATP. B. 600  $\mu$ M  $Mg^{2+}$  was added. The other experimental conditions were as described for A. Solid lines represent the best fit to the Hill equation. Values are the mean  $\pm$  SD of three different experiments. The Hill coefficients values for A and B were 0.84-1.16, which were not significantly different from one.

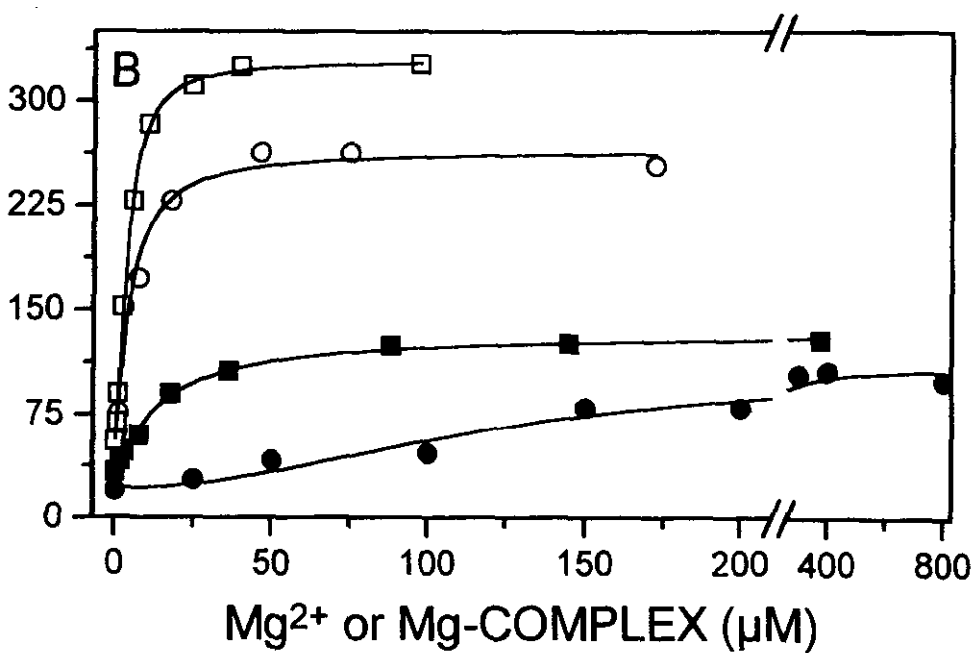
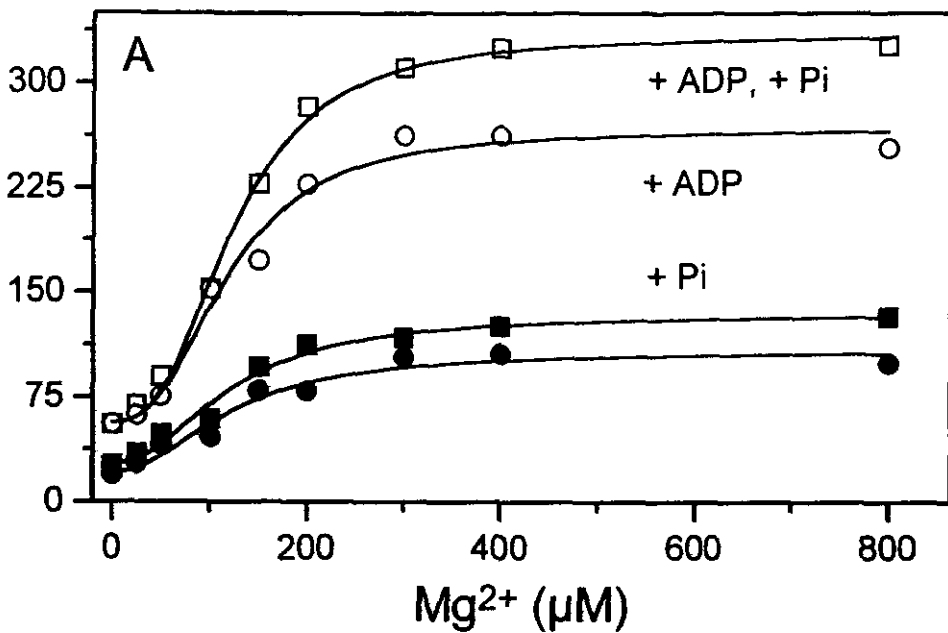
Figure 7. Effect of ADP, ATP, Pi and  $Mg^{2+}$  on the 2-OGDH kinetics in the mitochondrial extract. Mitochondrial extract (0.5 mg protein/ml) was incubated as indicated under Material and Methods in the presence of different concentrations of 2-OG. A. ●, no further additions (control); ◆, + 5 mM Pi; ■, + 600  $\mu$ M ADP;  $\Delta$ , + 600  $\mu$ M ATP. B. 600  $\mu$ M  $Mg^{2+}$  was added. The other experimental conditions were as described for A. Curves are representative of three different extract preparations. The Hill coefficients values for A and B ranged from 1.15 to 2.25, and they were significantly different from one ( $P < 0.01$ ; Student t-test).

Figure 8. Effect of  $Mg^{2+}$  on the activation of isolated 2-OGDH by  $Ca^{2+}$ . 2-OGDH (0.055 mg protein/ml) was incubated in the conditions described under Materials and Methods.

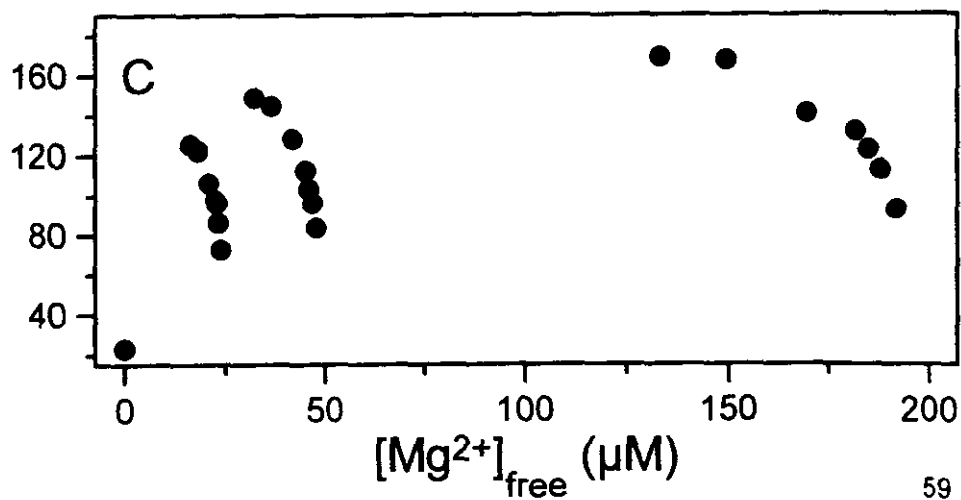
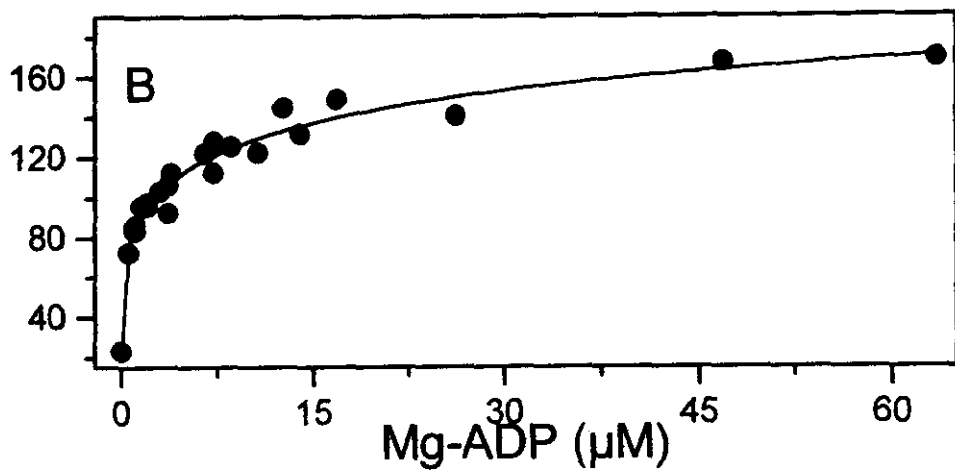
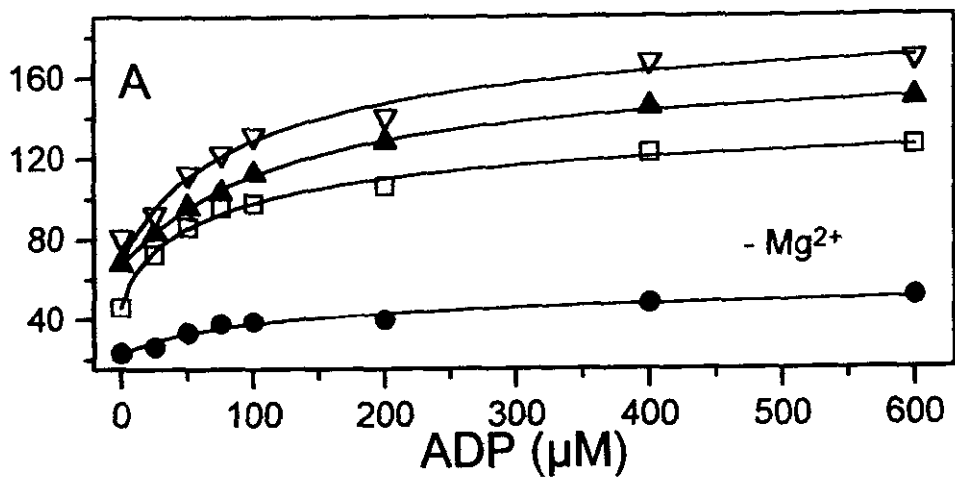
Calcium concentrations were adjusted by the use of  $\text{Ca}^{2+}$ /EGTA buffers; free  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations were calculated with the use of the CHELATOR program (19). ●, no addition; ■, 100  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ ;  $\Delta$ , 200  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ ; ▼, 600  $\mu\text{M}$   $\text{Mg}^{2+}$ . The values of the Hill coefficients ranged from 1.55 to 4.25.

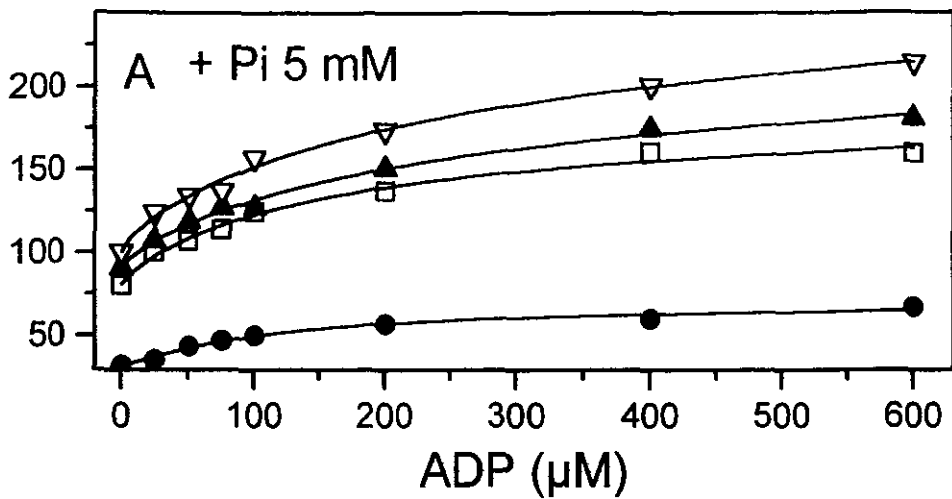


2-OGDH ACTIVITY  
(nmol NADH/min/mg)

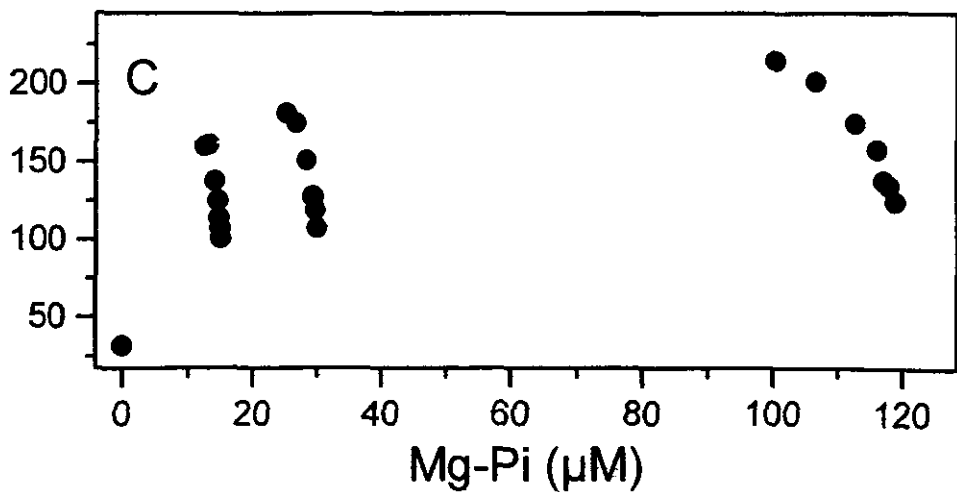
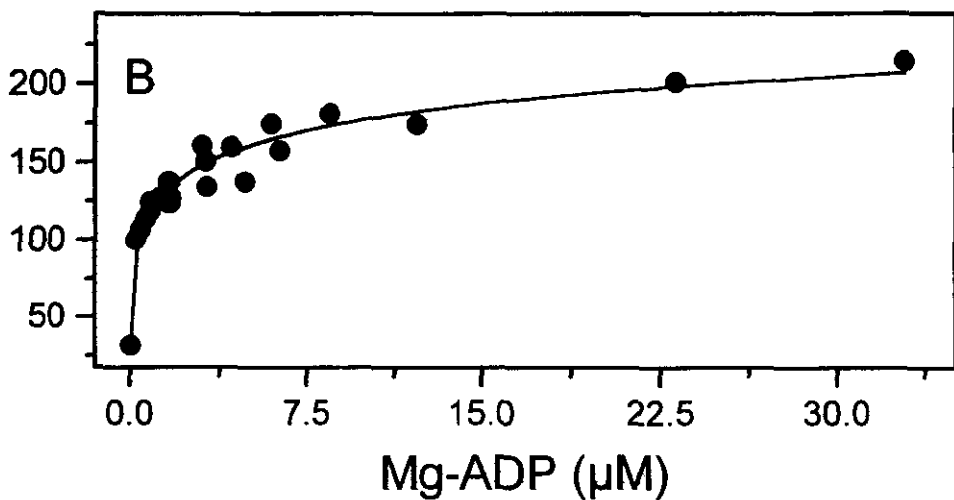


2-OGDH ACTIVITY  
(nmol NADH/min/mg)



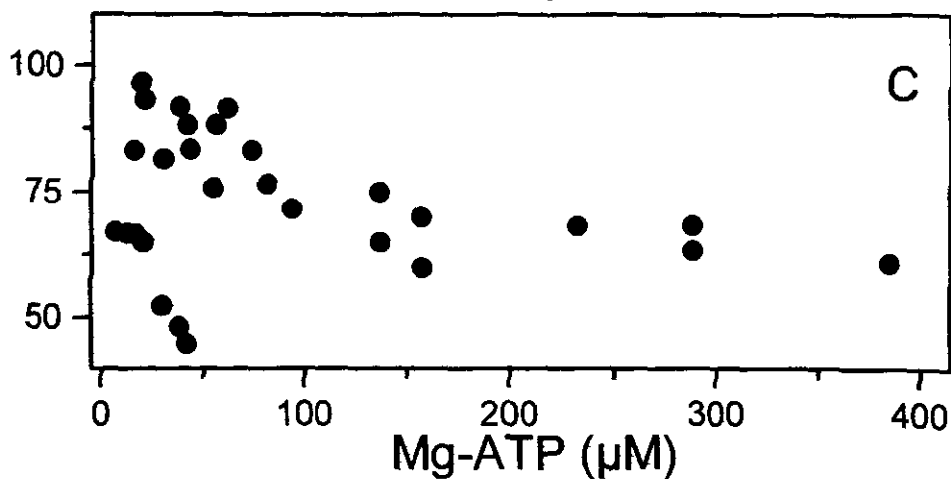
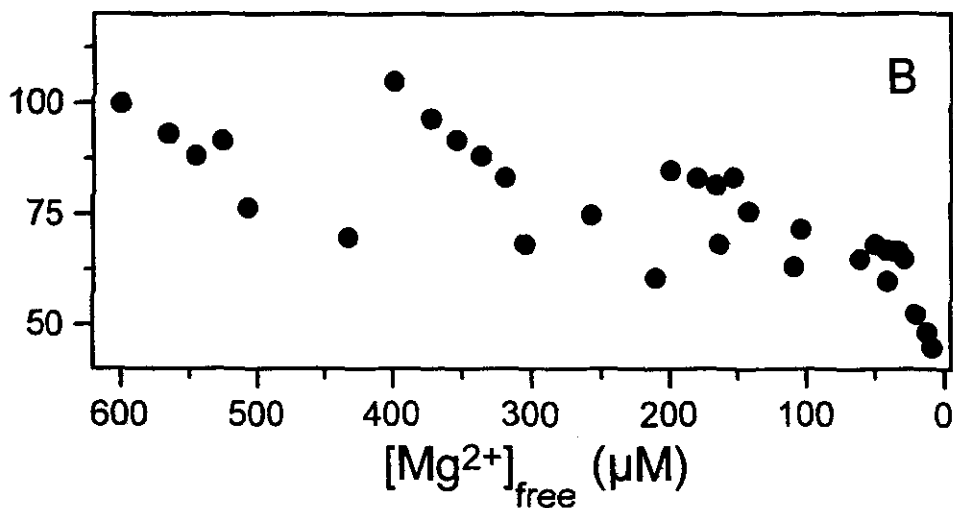
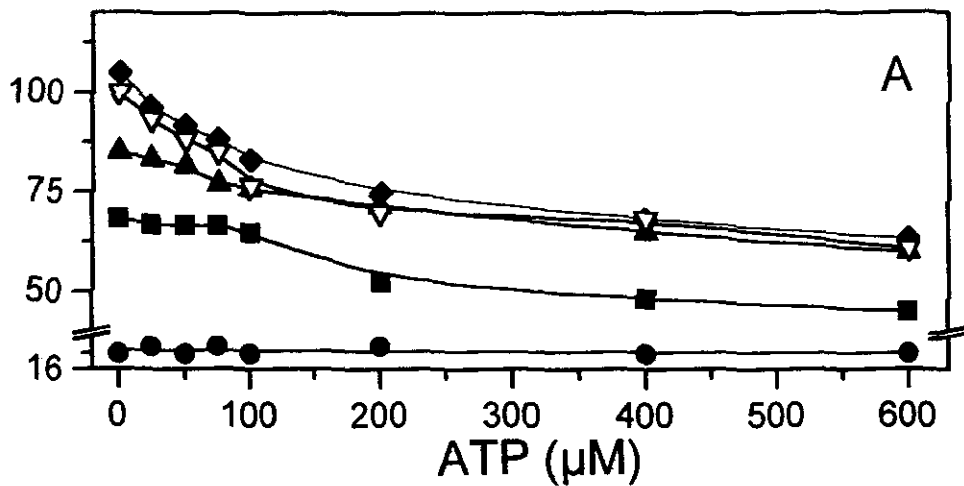


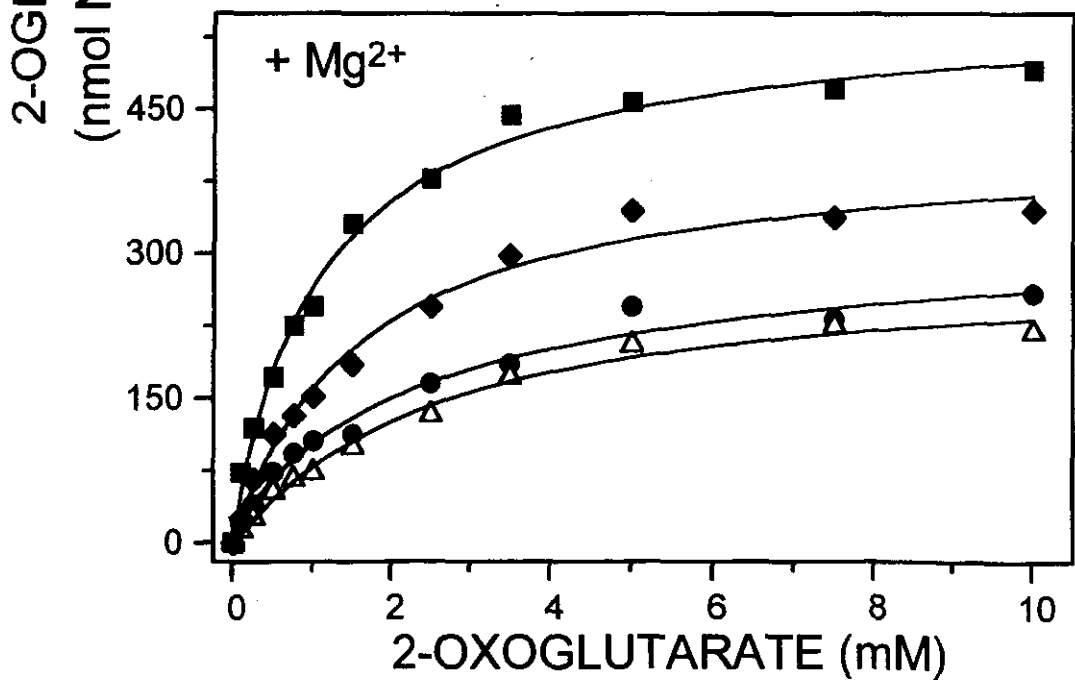
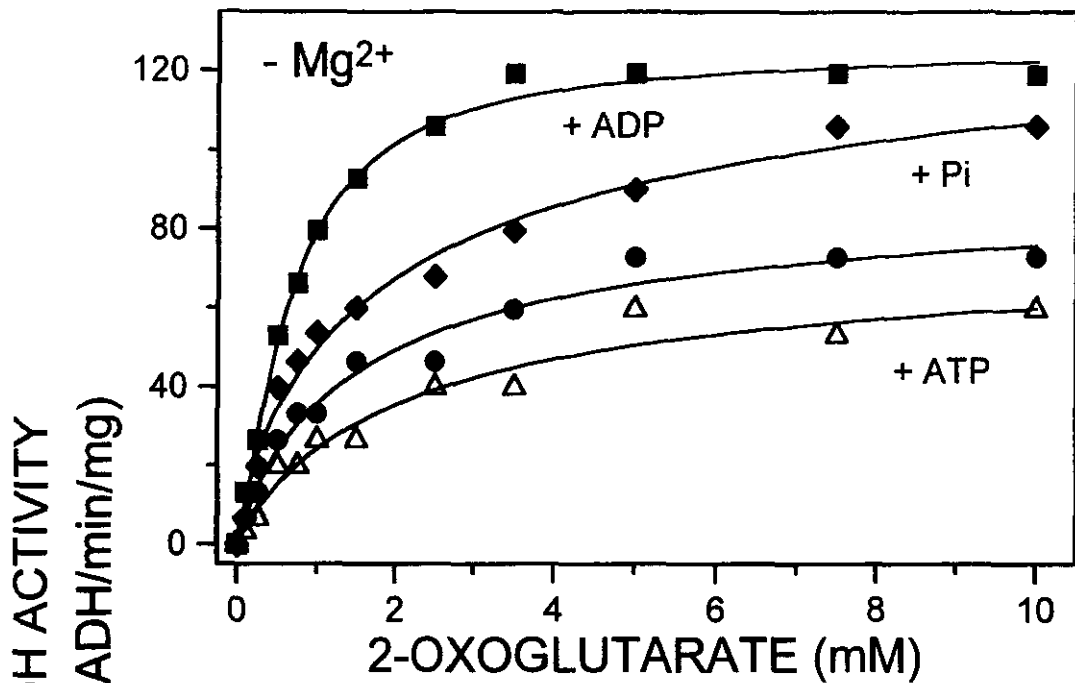
2-OGDH ACTIVITY  
(nmol NADH/min/mg)



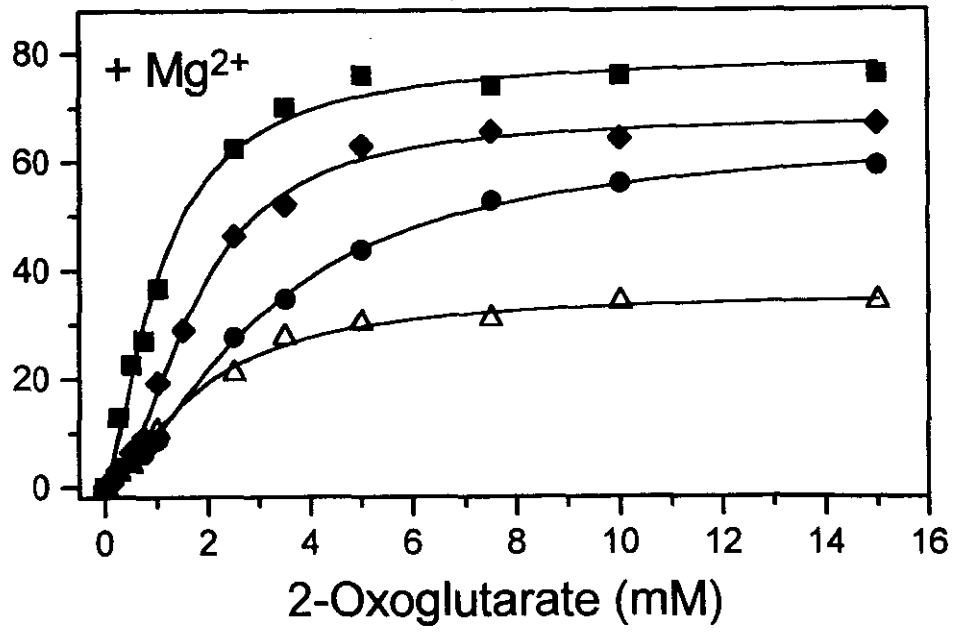
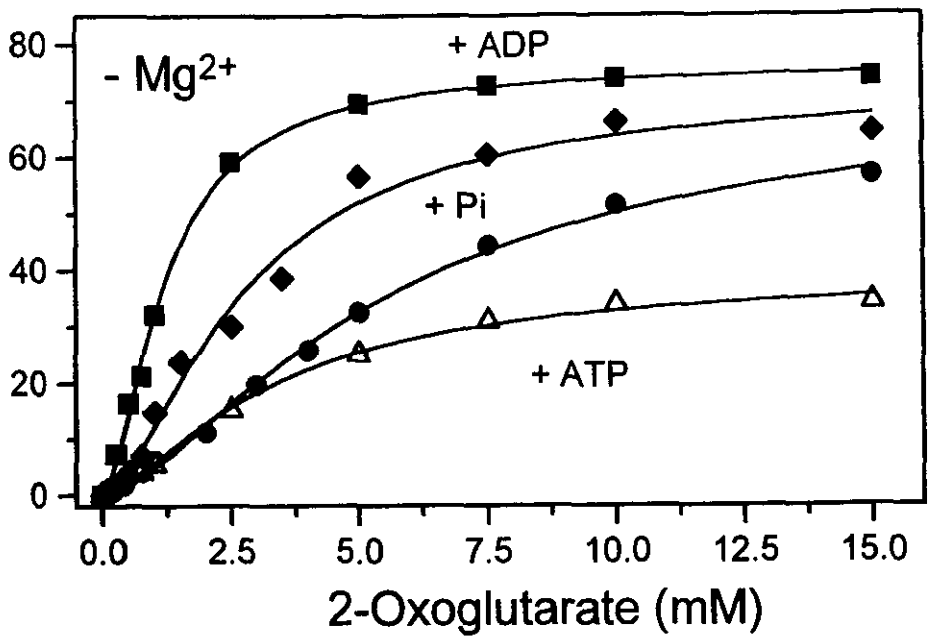


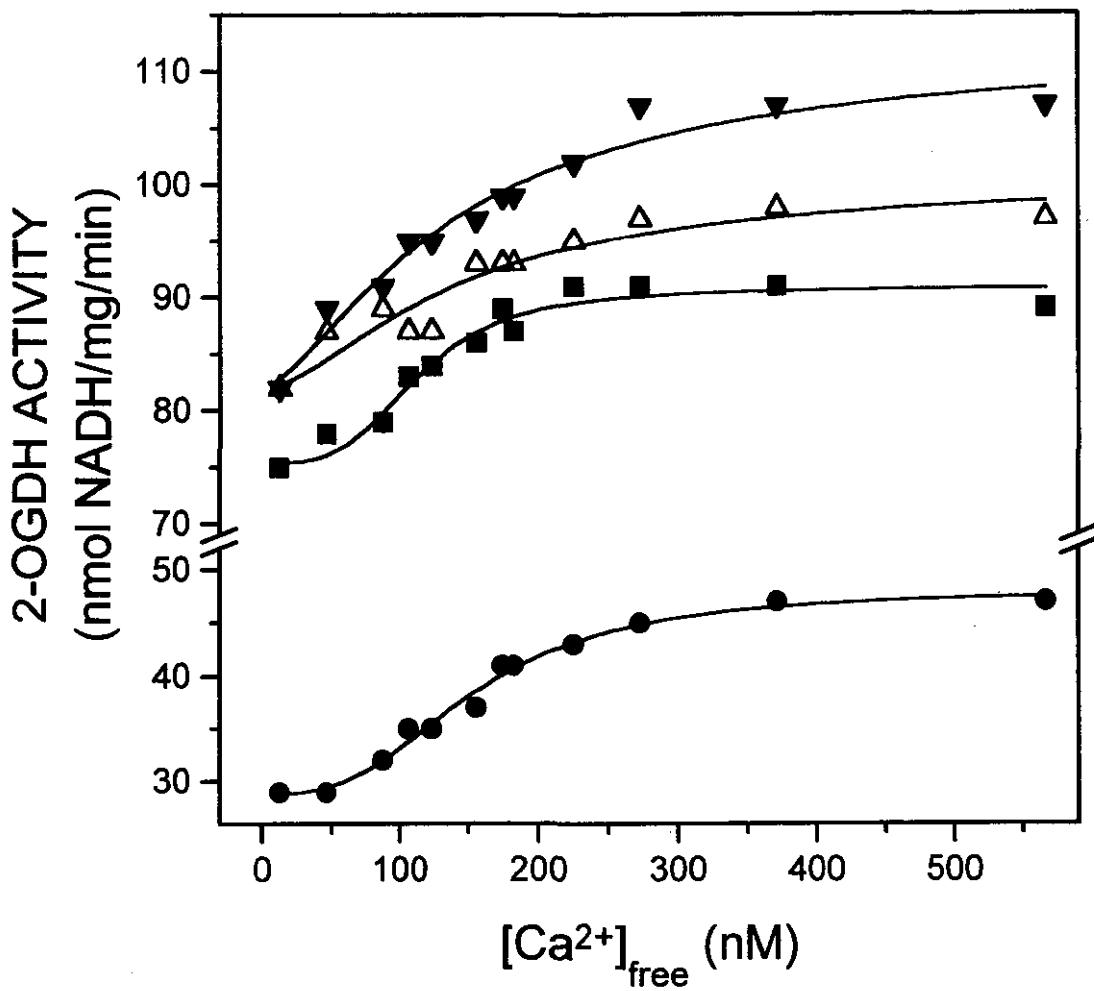
2-OGDH ACTIVITY  
(nmol NADH/min/mg)





2-OGDH ACTIVITY  
(nmol NADH/min/mg)





## 6. DISCUSION GENERAL

El hallazgo de que una de las enzimas claves del ciclo de Krebs sea un sitio de activación por cambios fisiológicos en la concentración de  $Mg^{2+}$ , apoya la hipótesis de que el  $Mg^{2+}$  tiene un papel de segundo mensajero. Esta hipótesis fue propuesta por algunos grupos, quienes observaron movimientos intracelulares de  $Mg^{2+}$  en respuesta a un estímulo hormonal. Los resultados de esta tesis sugieren que variaciones fisiológicas en la  $[Mg^{2+}]$  pueden ocurrir simultáneamente a los incrementos de la  $[Ca^{2+}]$ , sin que exista interferencia sobre la estimulación de la 2-OGDH. Sin embargo, el hecho de que el transporte de  $Mg^{2+}$  no sea muy rápido en las mitocondrias (Fig. 1, trabajo 1), nos indica que los flujos de  $Mg^{2+}$  no pueden ser el segundo mensajero en la mitocondria. De acuerdo con esta tesis, lo que sí podría ocurrir, son cambios en los contenidos mitocondriales de nucleótidos y de Pi, los cuales acarrearían cambios en la  $[Mg^{2+}]_m$ .

El aumento en la activación por  $Mg^{2+}$  de la 2-OGDH por concentraciones fisiológicas de Pi demostrado en este trabajo, aunado a la observación del incremento en la concentración del Pi citosólico y por lo tanto del Pi intramitocondrial después de la estimulación con epinefrina, implica que aún cuando la concentración de  $Mg^{2+}$  permanezca constante, un incremento en la concentración de Pi es capaz de potenciar la activación por  $Mg^{2+}$  de la 2-OGDH y por lo tanto la fosforilación oxidativa.

Las diferencias encontradas en el comportamiento cinético de la 2-OGDH en el extracto mitocondrial (forma sigmoideal de la curva, mayor respuesta a los ligandos en presencia de  $Mg^{2+}$  y disminución de la  $K_{2-OG}$  por el ATP) y la 2-OGDH aislada (forma hiperbólica de la curva, respuesta similar en presencia o en ausencia de  $Mg^{2+}$  y falta de efecto del ATP sobre la  $K_{2-OG}$ ), nos hace pensar que en el proceso de aislamiento y purificación de la enzima se pierde algún factor importante para la regulación del

comportamiento cinético de la 2-OGDH o que existen diferencias específicas de especie.

El complejo de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa está constituido por tres enzimas: la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (E1), la dihidrolipoamida acetil transferasa (E2) y la dihidrolipoamida deshidrogenasa (E3). La unidad mínima activa del complejo está formada por 12 E1, 24 E2 y 12 E3, en un arreglo octaédrico con un peso molecular de  $5 \times 10^6$  Daltones [a, b]. Los datos de reconstitución del complejo de la 2-OGDH de mamífero indican que los monómeros E1 y E3 del complejo pueden agregarse para formar homodímeros o heterodímeros, para luego unirse a la base ("core") formada por varias copias de la subunidad E2 [a]. La interacción física entre las subunidades E1 y E3 se demostró recientemente en la 2-OGDH de mamífero, en donde se propone que seis homodímeros de E1 unidos a la base formada por E2 y a otros seis homodímeros de E3 se encuentran formando el complejo [b], como fue sugerido para la 2-OGDH de *Escherichia coli*. Se ha demostrado que la subunidad E1 es la que cataliza el paso alejado del equilibrio [c] y que es además la que reacciona con el NADH y el succinil-CoA [d], para dar la inhibición (alostérica) por retroalimentación. Siendo entonces una enzima alostérica se ha propuesto también que es la enzima activada por  $\text{Ca}^{2+}$  [c, d], y por lo tanto, la enzima susceptible de ser modulada en el complejo. Por lo anterior, en adelante al hablar de activación de la 2-OGDH, nos referiremos a la subunidad E1 del complejo multienzimático.

En los experimentos de la figura 1 del trabajo 2, donde se evalúa la afinidad de la 2-OGDH por  $\text{P}_i$ , se puede observar además de las dos diferentes sensibilidades a  $\text{P}_i$ , un incremento en el coeficiente de Hill de la enzima al incrementar la concentración de  $\text{P}_i$ . En el extracto mitocondrial el coeficiente de Hill determinado a concentraciones de



Con el extracto mitocondrial (Fig. 6, trabajo 2), se determinó que el número de Hill en la presencia de diferentes activadores permanece alrededor de 2 (Tabla A), indicando que no existen cambios en la agregación de la enzima y la especie formada es un dímero o tetrámero. Además, parece que existen sitios independientes para la unión de Mg-ADP y Mg-Pi, ya que la combinación de los dos complejos tiene un efecto sinérgico sobre la activación de la enzima (Fig. 2, trabajo 2).

Tabla A. Coeficientes de Hill determinados de los experimentos de la figura 6 del trabajo 2.

EXTRACTO MITOCONDRIAL	
LIGANDO - Mg <sup>2+</sup>	COEFICIENTE DE HILL (n=4)
CONTROL	1.53 ± 0.63
ADP	1.5 ± 0.13
ATP	1.78 ± 0.78
Pi < 5 mM	0.97 ± 0.20
LIGANDO + Mg <sup>2+</sup>	
CONTROL	1.15 ± 0.33
ADP	1.41 ± 0.44
ATP	1.44 ± 0.36
Pi < 5 mM	1.43 ± 0.39

Los valores dados representan la media ± la desviación estandard de 4 experimentos.

Para la enzima aislada el coeficiente de Hill determinado en el mismo experimento no fue significativamente diferente de 1 (Fig. 7, trabajo 2), como se puede observar en la tabla B, indicando que la subunidad E1 se encuentra en el complejo como monómero.



Tabla B. Coeficientes de Hill determinados de los experimentos de la figura 7.

ENZIMA AISLADA	
LIGANDO - Mg <sup>2+</sup>	COEFICIENTE DE HILL (n=3)
CONTROL	0.89 ± 0.15
ADP	1.12 ± 0.17
ATP	0.91 ± 0.07
Pi	1 ± 0.49
LIGANDO + Mg <sup>2+</sup>	
CONTROL	0.89 ± 0.14
ADP	0.99 ± 0.17
ATP	0.96 ± 0.06
Pi	1.22 ± 0.63

ESTA TESTA NO BEBE  
SALIR... CA

Las diferencias en comportamiento cinético entre la 2-OGDH aislada y en el extracto mitocondrial se pueden explicar por las siguientes posibilidades: a) que la concentración de la subunidad E1 del complejo multienzimático, se encuentre disminuida en la preparación de la 2-OGDH aislada y esto impida que la asociación de E1 en el complejo llegue hasta octámero, como se propone para el extracto mitocondrial; b) que el Mg<sup>2+</sup> se encuentre fuertemente pegado a la 2-OGDH en el extracto mitocondrial y se pierda en el proceso de aislamiento de la enzima, haciendo que la última preparación sea mas sensible a la activación por Mg<sup>2+</sup> y c) la existencia de diferencias especie específicas entre las dos enzimas.

- a). Sanderson S. J., Khan S. S., McCartney R. G., Miller C. And Lindsay, J. G. (1996) Biochem. J. 319, 109-116.
- b). McCartney R. G., Rice J. E., Sanderson S. J., Bunik, V., Lindsay H. and Lindsay J. G. (1998) J. Biol. Chem. 273, 24158-24164.
- c). Nichols B. J. and Denton R. M. (1995) Mol. Cell. Biochem. 149/150, 203-212.
- d). Lawlis V. B. And Roche T. E. (1981) Biochemistry 20,2519-2524.

## 7. PERSPECTIVAS

Los estudios publicados con la 2-OGDH versan principalmente sobre su activación por  $\text{Ca}^{2+}$  y el efecto de los nucleótidos de adenina sobre esta activación, sin considerar el efecto del  $\text{Mg}^{2+}$ , el cual se utilizó siempre en concentraciones saturantes en esos estudios. Mas recientemente se han reportado trabajos relacionados con la determinación de la estructura del complejo multienzimático y la interacción entre las diferentes subunidades que lo componen. En este contexto, las contribuciones más importantes de este trabajo son las siguientes: a) la determinación de que el  $\text{Mg}^{2+}$  puede activar a la 2-OGDH en mitocondrias acopladas (activación *in situ*) y no solamente *in vitro* como se había reportado anteriormente para la enzima aislada de corazón de cerdo; b) la introducción de un nuevo modulador que en condiciones fisiológicas podría estar participando en la regulación de la 2-OGDH, como lo es el Pi; c) la propuesta de que en condiciones fisiológicas, las especies de ligandos que participan mayoritariamente en la modulación de la 2-OGDH, podrían ser aquellas acomplejadas con  $\text{Mg}^{2+}$  (Mg-ADP, y Mg-Pi); d) la observación de las diferencias cinéticas entre la 2-OGDH en el extracto mitocondrial y la enzima aislada. Sin embargo en este último inciso no se puede descartar una posible diferencia específica de especies ya que se está comparando el comportamiento cinético de dos enzimas obtenidas de fuentes diferentes y e) La modulación de la 2-OGDH por  $\text{Mg}^{2+}$  y Pi también afecta la velocidad de fosforilación oxidativa.

Experimentos que podrían continuar este trabajo son aquellos dirigidos a demostrar que el segundo sitio de regulación de la fosforilación oxidativa por  $\text{Mg}^{2+}$  es la ATP sintetasa. Estos experimentos podrían realizarse en condiciones en las cuales no exista participación de la translocasa de adenin-nucleótidos. Para tal efecto se pueden

realizar experimentos de arsenilación oxidativa, o estudios de fosforilación oxidativa en partículas submitocondriales (en estas partículas la membrana se encuentra invertida, lo cual permite descartar la participación del transportador de Pi y el translocador de adenin-nucleótidos). El inconveniente de la utilización de este sistema, radica en la dificultad que presenta la preparación de partículas submitocondriales bien acopladas.

Ya que todos los experimentos con la enzima aislada se realizaron en presencia de concentraciones saturantes de TPP, CoA y  $\text{NAD}^+$ , ahora se podría evaluar el efecto de la variación de la concentración de estos cofactores sobre la actividad de la enzima, ya que *in vivo* estos tres cofactores posiblemente no se encuentran en concentraciones saturantes. Se puede estudiar también el efecto del Pi y el  $\text{Mg}^{2+}$  sobre la afinidad de la 2-OGDH por los diferentes cofactores. La determinación del efecto del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre la afinidad de la 2-OGDH por TPP sería de gran ayuda, ya que se ha propuesto que el blanco de la activación por  $\text{Mg}^{2+}$  es la unión del TPP a la subunidad E1 del complejo (la 2-oxoglutarato deshidrogenasa) para iniciar la reacción.

El comportamiento bifásico de la cinética de la 2-OGDH con respecto a la activación por Pi puede deberse a la diferente agrupación de las enzimas que constituyen al complejo multienzimático al unir al Pi y a los otros ligandos. Para examinar esta posibilidad se pueden utilizar electroforesis en geles nativos, cromatografía de exclusión molecular o ultracentrifugación analítica en gradiente, en presencia y en ausencia de los diferentes efectores y determinar si se modifica la composición del complejo multienzimático, en cuanto a la estequiometría de las subunidades que lo componen. Otros posibles experimentos son la determinación de la termoestabilidad de la enzima con los diferentes ligandos y el entrecruzamiento de las

subunidades para determinar el efecto del diferente agrupamiento de los monómeros sobre los parámetros cinéticos del complejo multienzimático.

Otra línea de investigación sería la identificación del factor que se pierde en el proceso de aislamiento de la enzima, que pudiera explicar los cambios cinéticos observados entre la 2-OGDH aislada y la enzima en el extracto mitocondrial.