



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DEL  
COMPLEJO F11 ENDOGENO Y DEL COMPLEJO F11  
ENTRECRUZADO CON EEDQ (N-ETOXICARBONIL-2-  
ETOXI-1,2-DIHIIDROQUINOLINA).

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**LICENCIADO EN INVESTIGACION  
BIOMEDICA BASICA**

**P R E S E N T A :**  
**JULIO LENIN DOMINGUEZ RAMIREZ**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIETTA TUENA DE GOMEZ-PUYOU

286007

MEXICO, D.F.

DICIEMBRE 2000



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.

A mi madre, Hilda Lidia Ramírez, por no dejar de apoyarme cada vez que emprendo un reto.

A mis hermanas, Ludmila y Lubianka, por enriquecer mi vida con la suya. Siempre pienso en ustedes.

A Paulina Cortes, por acompañarme de manera incomparable.

A mis tíos, Elva Ramírez y Luis Manuel Palomino, porque con todas sus atenciones me han ayudado a madurar.

A los Doctores Marietta Tuena de Gómez-Puyou y Armando Gómez-Puyou, por todo el tiempo que me han dedicado, sus enseñanzas y experiencia.

Al Doctor Salvador Uribe, por enseñarme el mundo de la Bioenergética.

Al Doctor Antonio Peña Díaz, por enseñarme la belleza de la Bioquímica.

A los integrantes de los laboratorios 105 y 104 Oriente, por todo su compañerismo y amistad.

A todos mis compañeros de generación: Miguel E., Mariana, Ceí, Juan Ramón, Ivan, Luis, Adriana, Héctor y Erick por su grandiosa compañía.

A todos mis familiares y amigos, aunque nos los mencione a todos los tengo muy presentes.

## INDICE:

Resumen	4
1. Introducción.	5
1.1 <i>Bos taurus</i> .	10
1.1.1 Características del complejo IF <sub>1</sub> -F <sub>1</sub> nativo y reconstituido.	10
1.1.2 Efecto del pH sobre la estructura de la IF <sub>1</sub> y correlación con su capacidad inhibitoria	12
1.1.3 Efecto de diferentes fragmentos de la IF <sub>1</sub> en la inhibición.	14
1.1.4 Entrecruzamiento y modificaciones químicas por EEDQ (N-ethoxycarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina), DCCD (Diciclohexilcarbodiimida) y el anhídrido acético.	18
1.1.5 Mecanismo de inhibición de la IF <sub>1</sub> .	21
1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	22
1.2.1 Entrecruzamiento con EEDQ (N-ethoxycarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina).	22
OBJETIVOS.	
2. Material y métodos	25
2.1 Obtención de mitocondrias de corazón bovino.	25
2.2. Obtención de partículas Mg ATP (SMP-MgATP).	29
2.3 Obtención del complejo de F <sub>1</sub> I endógeno.	30
2.4 Activación de F <sub>1</sub> I.	32
2.5 Determinación de proteína por Ácido Bicinoninico (BCA).	34
2.6 SDS-PAGE de von Jagow.	35
2.7 Mezcla de Desnaturalización.	38

2.8 Tricine SDS-PAGE.	39
2.9 Tinción por azul de Coomasie para geles de poliacrilamida.	42
2.10 Tinción por plata para geles de poliacrilamida.	43
2.11 Electroforesis azul nativa.	44
2.12 Entrecruzamiento de $F_1I$ endógena con utilizando EEDQ.	46
2.13 Determinación de actividad de ATPasa en condiciones unisítio.	47
2.14 Inmunoréplicas tipo Western.	49
2.15 Determinación de proteína por el método de Biuret.	52
2.16 Purificación de $F_1I$ con columna de Superdex 200 en Fast Protein Liquid Chromatography.	54
3. Resultados.	56
3.1 Características del complejo $F_1I$ .	56
3.2 Entrecruzamiento de la $IF_1$ con el sector $F_1$ en el complejo endógeno $F_1I$ .	70
3.3 Identificación del producto de entrecruzamiento.	73
3.4 Propiedades cinéticas del complejo $F_1I$ entrecruzado	76
4. Discusión.	79
I. Conclusiones.	82
II. Perspectivas	83
5. Glosario	84
6. Referencias.	86

## Resumen.

La  $F_1F_0$ ATP sintasa es el complejo enzimático responsable de la síntesis del 95 % de ATP células eucariotes, células de plantas y bacterias. En éstas últimas también es responsable de mantener el potencial de membrana y la energización de transporte activo de varios metabolitos.

Los componentes principales de este complejo son proteínas conservadas a lo largo de la escala filogenética. Sin embargo, existen componentes de éste complejo particulares a cada reino e incluso a cada especie. Tal es el caso de la proteína inhibidora ( $IF_1$ ), característica de mitocondrias animales. Esta proteína previene la hidrólisis de ATP por el complejo  $F_1F_0$ ATP sintasa en condiciones que favorecen dicha actividad.

El estudio de las características cinéticas del complejo  $F_0F_1$  es difícil debido a que es capaz de unir seis nucleótidos en seis sitios diferentes de los cuales solo tres son catalíticos, además de que existe cooperatividad positiva en la catálisis y cooperatividad negativa en la unión de sustrato. El complejo  $F_0F_1$  también es capaz de catalizar la hidrólisis de ATP utilizando los tres sitios catalíticos ó un sólo sitio, modificando la concentración de sustrato.

El presente trabajo tiene como objetivo purificar el complejo enzimático denominado  $F_1I$  endógeno, obtener un complejo  $F_1I$  entrecruzado y la caracterización de la actividad enzimática de ambos. Se observó que la adición de un paso de purificación al protocolo previamente reportado resulta en un incremento de la pureza de la preparación. El complejo  $F_1I$  purificado con esta técnica exhibe mejores índices de activación en condiciones de catálisis multisitio que el purificado con anterioridad.

El entrecruzamiento del complejo  $F_1I$  produjo la desaparición de la activación de la catálisis multisitio que se observa en la  $F_1I$  no entrecruzada. En condiciones de catálisis unisitio se observó una actividad menor a la de la enzima no entrecruzada.

Utilizando pruebas histoquímicas se observó que el producto del entrecruzamiento (de 60  $\approx$ kDa) involucra a la  $IF_1$ ; desafortunadamente no fue posible mostrar la participación de la subunidad  $\beta$ .

## 1. Introducción:

El complejo enzimático conocido como la  $F_0F_1$ -ATP sintasa es el responsable del último paso de la fosforilación oxidativa o de la fotofosforilación acoplando la fuerza protonmotriz generada por la cadena respiratoria o fotosintética a la síntesis de ATP. El proceso de la síntesis de ATP se lleva a cabo en mitocondrias, bacterias oxidativas, bacterias fotosintéticas y en los cloroplastos de plantas superiores. El complejo de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa está formado por dos diferentes dominios:

**$F_1$** , el dominio que contiene los tres sitios catalíticos del complejo. Es susceptible de ser solubilizado.

**$F_0$** , integral a la membrana y responsable del paso de protones a través de ésta.

La Tabla 1 muestra las subunidades conocidas para los complejos de bacterias, cloroplasto y mitocondrias animales además de su equivalencia.

Debido a que el complejo de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa de *E. coli* es el más simple, en cuanto a su composición de subunidades, ha sido tomado como modelo. En él, el sector  $F_0$  está compuesto por las subunidades  $ab_2c_9.12$ , donde los subíndices indican la estequiometría de la subunidad por complejo, mientras que el sector  $F_1$  está compuesto por las subunidades  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon^1$ . La arquitectura tridimensional de las subunidades  $\alpha_3\beta_3\gamma$  en este último sector se conoce a través de la estructura cristalográfica del complejo de mitocondria de corazón bovino<sup>2</sup>, además existen estructuras de  $\alpha\beta\gamma$  de *Bacillus PS3*<sup>3</sup>,  $\alpha\beta\gamma$ ,  $\epsilon$  y  $\delta$  de *E. coli*<sup>4,5,6,7</sup>,

$\alpha\beta\gamma\delta c_{10}$  *Saccharomyces cerevisiae*<sup>8</sup>, y  $\alpha\beta\gamma$  de *Rattus norvegicus*<sup>9</sup>. También existen

**Tabla 1. Composición de los complejos  $F_0F_1$ -ATPasa de bacterias, cloroplastos, y mitocondrias.**

Dominio	<i>Escherichia coli</i>	Cloroplasto (y cianobacteria)	Mitocondrias animales
$F_1$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$
	$\beta$	$\beta$	$\beta$
	$\gamma$	$\gamma$	$\gamma$
	$\delta$	$\delta$	OSCP
	$\epsilon$	$\epsilon$	$\delta$
	-	-	$\epsilon^*$
$F_0$	a	a (ó IV)	a
	b	b y b' (ó I y II)	b
	c	c (ó III)	c
Supernumerarias	-	-	d
	-	-	e
	-	-	f
	-	-	g
	-	-	A $\delta$ L
	-	-	F <sub>6</sub>
	-	-	IF <sub>1</sub>

Composición de los complejos  $F_0F_1$ -ATPasa de bacterias, cloroplastos, y mitocondrias y su equivalencia relativa. Las letras griegas se asignan a las subunidades del sector  $F_1$  y las letras latinas al sector  $F_0$ <sup>23</sup>.

\* Debido a que la subunidad e de mitocondrias de animales no tiene contraparte en *E. coli*, se le considera supernumeraria.



datos de microscopía electrónica<sup>10, 11</sup>, para ambos sectores  $F_1$  y  $F_0$  por separado y juntos, que apoyan un modelo como el presentado para la  $F_0F_1$ -ATP sintasa por Engelbretch<sup>12</sup> y respaldado por la cristalografía del complejo  $c_{10}F_1$  de *S. cerevisiae*<sup>8</sup> (figura 1). Las consecuencias funcionales de este modelo se han reflejado en los mecanismos propuestos para el funcionamiento del complejo de la  $F_0F_1$ -ATP sintasa.<sup>13, 14, 15, 16, 17</sup>

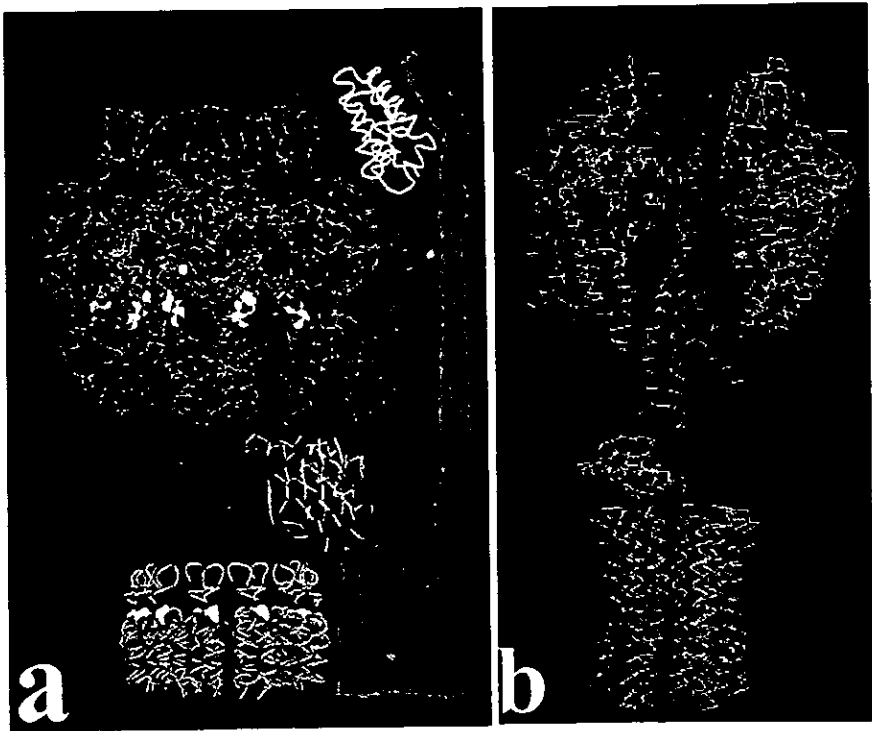


Figura 1. (a) Modelo de Engelbretch<sup>12</sup> (b) Trazo de carbonos alfa de la estructura cristalográfica de *S. cerevisiae*<sup>8</sup>.

Sin embargo, ni la cristalografía o la microscopia electrónica han podido definir las interacciones entre las subunidades numerarias y las supernumerarias que existen en los complejos  $F_0F_1$ -ATP sintasa de mitocondrias de animales (ver Tabla 1<sup>23</sup>). Para éste fin, se han utilizado varias técnicas de entrecruzamiento de proteínas, que también han servido para elucidar el mecanismo de la hidrólisis de ATP por el dominio  $F_1$ <sup>18, 19, 20, 21, 22, 80, 81</sup>.

La catálisis y sus características han sido estudiadas principalmente en el antes mencionado dominio  $F_1$ , también conocido como  $F_1$ -ATPasa.

La  $F_1$ -ATPasa puede catalizar la hidrólisis del ATP en dos modos distintos:

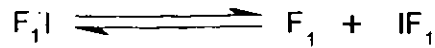
Con un sólo sitio catalítico (catálisis unisito) con una  $k_{cat}$  y  $K_m$  con valores de  $0.05\text{ s}^{-1}$  y  $10\text{ nM}$  respectivamente (valores característicos de la enzima de *Bos taurus*).

O, en modo multisito, en el cual los tres sitios catalizan simultáneamente.

A diferencia de la catálisis unisito, la multisito presenta una actividad  $10^5$  veces mayor debido a su cooperatividad positiva en la catálisis y cooperatividad negativa para la unión del sustrato en concordancia con el modelo del mecanismo de sitios alternantes cooperativos.<sup>24</sup> Existen inhibidores que anulan específicamente estas interacciones cooperativas deteniendo la catálisis multisito pero sin afectar significativamente a la unisito, por ejemplo, la azida de sodio y el cloruro de guanidina.<sup>25, 82, 83</sup> Gracias a dichos inhibidores se ha podido disecar cinéticamente la catálisis unisito así como las constantes catalíticas para la hidrólisis del MgATP.

Se ha descrito en las mitocondrias de corazón de bovino un péptido, conocido como  $IF_1$ <sup>26</sup>, capaz de inhibir la actividad de ATPasa tanto en el complejo  $F_1F_0$  como en el sector  $F_1$  soluble. La magnitud de la inhibición de la hidrólisis multisito por el  $IF_1$  es incierta, así como la naturaleza de la actividad residual. Es también controversial la existencia de actividad

un sitio en el complejo  $F_1I$  (también llamado  $IF_1-F_1$ ).<sup>27, 84</sup> Estos parámetros son difíciles de estimar dado que la asociación entre la  $IF_1$  y al  $F_1$ , por ser de naturaleza no covalente, obedece a un equilibrio de tipo:



A la fecha se han descrito proteínas inhibitoras en hígado de rata, levadura y cloroplasto.

Las recientes determinaciones de estructuras cristalográficas de complejos derivados de la  $F_0F_1$ <sup>3, 4, 5, 6, 7, 8, 9</sup>, las observaciones de la rotación de las subunidades  $\gamma$ ,  $\epsilon$  y el oligomero de c<sup>28, 29, 30, 31, 32, 33</sup> así como la necesidad de datos cinéticos precisos para la formulación de modelos que describan el comportamiento del complejo  $F_0F_1$  han incrementado el interés en el mecanismo de inhibición mediado por esta proteína así como en los modelos en los que se puede estudiar apropiadamente.

Los antecedentes relevantes al presente trabajo derivan de estudios realizados en los complejos  $F_1I$  de *Bos taurus* y *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1.1. *Bos taurus*.

### 1.1.1. Características del complejo $F_1F_0$ endógeno y reconstituido.

El complejo  $F_1F_0$  puede ser obtenido en dos formas:

El  $F_1F_0$  reconstituido, este complejo se obtiene de la purificación independiente del dominio  $F_1$  y de la proteína inhibidora, para después mezclar ambos y formar el complejo  $F_1F_0$ .

El  $F_1F_0$  endógeno, así llamado debido a que se purifica de manera que la disociación del complejo se minimiza.

Gran parte de los estudios acerca del complejo  $F_1F_0$  se han realizado con el complejo reconstituido. Sin embargo existen evidencias de que ambos complejos poseen características diferentes. A continuación se mencionan algunas características del complejo  $F_1F_0$  endógeno y algunas propiedades del complejo  $F_1F_0$  reconstituido que lo diferencian del endógeno.

Se ha mostrado que partículas submitocondriales de corazón bovino preparadas en presencia de  $Mg^{2+}$  y ATP (partículas submitocondriales Mg-ATP, que aun poseen proteína inhibidora unida a la ATP sintasa) incrementan su actividad de ATPasa de  $0.4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína a  $7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína después de ser incubadas a  $38^\circ \text{C}$  durante 5 horas. Con anticuerpos contra la  $F_1$  se observó que esta activación correlaciona con el desprendimiento de la proteína inhibidora <sup>58</sup>.

Por otro lado, con la  $F_1F_0$  endógena se observó que esta activación podría ocurrir en condiciones fisiológicas, ya que a  $37^\circ \text{C}$  y pH 8.0 la enzima alcanzó su máxima actividad de

hasta  $140 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína. Esta activación se favorece por ATP y se inhibe por  $\text{Mg}^{2+}$  probablemente al ser unidos al complejo, sin embargo la fuerza iónica no modifica la velocidad ni la magnitud de la activación sino que actúa impidiendo la reasociación de la proteína inhibidora.<sup>59</sup> Por otro lado, la  $F_1$  incubada en las mismas condiciones de temperatura, muestra una pérdida de actividad hidrolítica dependiente del tiempo de incubación y la temperatura a la que se realiza dicha incubación. Esto quiere decir que la interacción de la  $\text{IF}_1$  con la  $F_1$  en el complejo  $F_1\text{I}$  endógeno, además de inhibir la actividad, protege contra la inactivación por temperatura<sup>86</sup>.

Los complejos reconstituidos pierden la capacidad de ser activados por álcali, respuesta característica del complejo endógeno.<sup>59</sup>

Usando partículas de Mg-ATP expuestas a una presión de 1.7 kbar se observó una activación de 2.5 veces sobre la actividad basal, sugiriendo que esta presión induce la liberación de la proteína inhibidora. En las partículas submitocondriales Sephadex-amonio (SA), carecientes de proteína inhibidora, se observa una inactivación al ser incubadas en las mismas condiciones que las partículas Mg-ATP. Si estas partículas son reconstituidas con  $\text{IF}_1$  antes de ser sometidas a altas presiones, se protegen contra dicha inactivación en una magnitud semejante a la de las partículas Mg-ATP. Este mismo efecto se observa en  $F_1$  soluble, sin embargo, tanto para las partículas SA y como para la  $F_1$  soluble, se requirió una proporción 10:1  $\text{IF}_1$  contra  $F_1$  para igualar la protección a la de las partículas Mg-ATP.

Existen también datos de cambios en la fluorescencia (propiedad de las proteínas que refleja su estructura terciaria y cuaternaria) debidos a altas presiones que son diferentes para

la enzima  $F_1I$  reconstituida que para la endógena.<sup>60</sup>

Además se han reportado diferencias en la inhibición sobre la hidrólisis de  $Mg$ -ATP y el intercambio de  $ATP \rightarrow Pi$  entre los complejos endógenos y los reconstituidos.<sup>61, 62, 63</sup>

Otro ejemplo de las diferencias que pueden surgir al usar proteína exógena es que en las partículas submitocondriales reconstituidas con  $IF_1$  (a concentraciones de 1 a 20  $\mu g$  de proteína) se han observado grandes diferencias en la curva de termoactivación respecto al complejo  $IF_1$ - $F_1$  endógeno.<sup>64</sup>

Por las diferencias reportadas entre el complejo  $F_1I$  reconstituido y el  $F_1I$  endógeno, en este trabajo se decidió utilizar el complejo endógeno como el representativo de los complejos en condiciones fisiológicas: sin embargo, la mayoría de los trabajos que se mencionan a continuación se han realizado con el complejo reconstituido.

### **1.1.2 Efecto del pH sobre la estructura de la $IF_1$ y correlación con su capacidad inhibitoria.**

La  $IF_1$  de la mitocondria de corazón de bovino ha sido clonada y purificada. Su estructura ha sido estudiada en función del pH. En un intervalo de 4.6 - 8.5 se ha observado que mientras el pH del medio se torna ácido, decrece el contenido de  $\alpha$ -hélice de la proteína inhibitoria<sup>39, 45</sup>. Que el pH es un factor importante para favorecer estas interacciones se ha tomado como evidencia de que está involucrada una histidina en este proceso, pues un perfil de pH de la interconversión entre la forma activa y la inactiva de la

proteína sugiere la participación de un  $pK_a$  entre 6 y 7 que está en el intervalo de la histidina<sup>46</sup>, además de que la modificación química de varias de las histidinas destruye la capacidad inhibitoria de la  $IF_1$ <sup>47</sup>. También se han realizado experimentos de mutagénesis dirigida en la  $IF_1$ , mutando sólo la histidina 49. Dicho residuo fue sustituido por Q, E, K, V, L ó I, y sus respectivas actividades inhibitorias fueron caracterizadas respecto al pH. Todas las mutaciones destruyeron la sensibilidad del inhibidor al pH, esto es, tanto a pH ácido como a pH alcalino las  $IF_1$  mutantes son capaces de inhibir a la  $F_1$ , mientras que la silvestre sólo es capaz de inhibir a pH ácido.

Estos datos indican que la desprotonación de dicha histidina es necesaria para que la  $IF_1$  sea capaz de modular la inhibición que ejerce sobre la  $F_1$ -ATPasa.<sup>42</sup>

La secuencia del inhibidor de hígado rata, la cual contiene solamente una histidina más que la de corazón bovino (tabla 2), ha sido un modelo estudiado en su dependencia de estructura y función al pH, estos estudios han mostrado que un péptido derivado de la proteína inhibidora de rata, con la secuencia conservada del residuo F22 al L45 (numeración de la secuencia de bovino, tabla 2) es suficiente para inhibir la actividad de ATPasa<sup>48</sup>.

Por estas evidencias se ha propuesto que la  $IF_1$  puede existir en dos formas dependiendo del pH, una forma activa a pH ácido, y una inactiva a pH básico.<sup>49</sup> Y por estas mismas evidencias, se ha propuesto que la  $IF_1$  se divide en dos diferentes dominios funcionales, uno responsable de la actividad inhibitoria y otro dominio responsable de regular la actividad del primer dominio, en respuesta al pH.

Por estas evidencias se cree que la pérdida de la estructura secundaria de  $\alpha$ -helice de

la IF<sub>1</sub>, en respuesta a cambios de pH, es un requisito para que funcione como inhibidor.<sup>50</sup>

**Tabla 2**

	10	20	30	40	50	60
<i>B. taurus</i>	GSESGDNVRS	SAGAVRDAGGAF	<u>GKREQAEERY</u>	<u>FRARAKEQLAAL</u>	<u>KKHENEI</u>	SHHAKI
<i>R. norvegicus</i>	GSDSSEMDSGAGS	IREAGGAFG	KREKAEDRYFREKTREQLAAL	KKHHEDEIDHHSKEI		
<i>S. cerevisiae</i>	-SEGSTGTPRGS	-----	SEDSFVKRE	RATEDFFVQR	KEQLRHLKEQLEKQR	----KKI
Consenso	GSESS	SGAG R	AGGAFGKRE	AEEDRYFR R	KEQLAALKKHHE	EI HH KEI
	70	80				
<i>B. taurus</i>	ERLQKEIERH	KQSIK	KLKQSE	DD		
<i>R. norvegicus</i>	ERLQKQIERH	KKIKYL	KNSEH	--		
<i>S. cerevisiae</i>	DSL	ENKIDSM	TK-----			
Consenso	ERLQK	IERHKK	IK LK	SE -		

Alineamiento utilizando Clustal W<sup>87</sup>, de las proteínas inhibidoras (IF<sub>1</sub>) mitocondriales de corazón bovino, hígado de rata y levadura. La única histidina diferente en la secuencia de rata esta sombreada en gris. Subrayada la secuencia de bovino del residuo 22 al 45.

### 1.1.3. Efecto de diferentes fragmentos de la IF<sub>1</sub> en la inhibición.

Con el fin de diferenciar los dominios funcionales propuestos para la IF<sub>1</sub> se han utilizado péptidos sintéticos cuya secuencia correspondiese a diferentes regiones de la IF<sub>1</sub> de bovino (ver Tabla 3). El correspondiente a los residuos 42 al 58 de la IF<sub>1</sub> de bovino inhibe al complejo F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> en la membrana y a la forma F<sub>1</sub> soluble. Con este péptido, la inhibición exhibe dependencia al pH, que desaparece al sustituirse las histidinas por alaninas, además de reducir su capacidad de inhibición.



**Tabla 3 Fragmentos de la IF<sub>1</sub> y sus características.**

14      20      30      40      48 AVRDAGG AFGKREQAEE ERYFRARAKE QLAALKKH	Mínima región inhibitoria. <sup>38</sup>
21      30      40      47 FGKREQAEE ERYFRARAKE QLAALKK	Región conservada <sup>39</sup> , inhibe la F <sub>1</sub> pero no la F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ni la conducción pasiva de H <sup>+</sup> . <sup>40</sup>
42      50      58 LAALKKHHE NEISHHAK	Inhibe la hidrólisis de ATP en F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> , la conducción pasiva de H <sup>+</sup> y la F <sub>1</sub> . <sup>40</sup>
58    60      70      80    84 KEI ERLQKEIERH KQSIKCLKQS EDDD	No se une a F <sub>1</sub> . <sup>41</sup>
Histidina 49	Ha sido mutada por glutamina, glutámico, lisina, valina, leucina e isoleucina, alterando la sensibilidad de la proteína inhibitoria al pH. <sup>42</sup>
Serina 54, lisina 59 y lisina 65	Los residuos pueden ser acetilados tras unirse la proteína inhibitoria a la F <sub>1</sub> . <sup>43</sup>
Lisina 24	Se protege contra la acetilación tras unirse la inhibitoria a la F <sub>1</sub> . <sup>43</sup>
48 50      60      70      80 KKGHENEISHHAKIERLQKEIERHKQSIKCLKQSEDD	Ha sido entrecruzado a la subunidad β. <sup>44</sup>
10      20      30      40 GSESGDNVRSSAGAVRDAGGAFGKREQAEEERYFRARAKE 50 QLAALKKHHE N	Ha sido entrecruzado con la subunidad α. <sup>44</sup>
52    60      70      80 EISHHAKIEI ERLQKEIERH KQSIKCLKQS EDDD	No dio producto de entrecruzamiento. <sup>44</sup>
48    51 KKGHHE N	¿Mínima región capaz de entrecruzar con β?
42    47 LAALK	¿Mínima región capaz de inhibir F <sub>1</sub> ?
42      50      58 LAALKKHHE NEISHHAK	¿Mínima región capaz de inhibir F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> , F <sub>1</sub> y conducción pasiva de H <sup>+</sup> y además entrecruzar?

Fragmentos de IF<sub>1</sub> y sus características. Tanto la secuencia como la numeración se refieren a la proteína inhibitoria de mitocondria de corazón bovino.

Otro fragmento, correspondiente a la secuencia 22 a 46 inhibe a la  $F_1$  soluble pero no a la  $F_0F_1$  ATPasa de SMP<sup>40</sup>.

En contraposición, mutantes de la  $IF_1$  con ablación del extremo amino mostraron que una secuencia mínima capaz de inhibir corresponde a los aminoácidos 14 a 47, la cual no contiene a la histidina 49.

Los fragmentos correspondientes a los aminoácidos 10 a 40 y 23 a 84 no poseen esa actividad inhibitoria pero si son capaces de unirse a la ATPasa y evitar la subsecuente unión de la proteína inhibidora silvestre. Fragmentos del residuo 22 al 46 y 44 al 84 no son capaces de unirse a la ATPasa ni de inhibirla, mientras que de 1 a 9 y 57 a 84 parecen ser dispensables. Aunque estas evidencias sugieren que la mínima secuencia que contenga todos los amino ácidos que interaccionan de alguna manera con la ATPasa se encuentran en la región que va del residuo 10 a 57<sup>38</sup>, es difícil el obtener una conclusión clara. La tabla 3 muestra un compendio de las diferentes regiones de la  $IF_1$  de bovino y sus características, entre signos de interrogación se describen características especulativas.

Por otro lado, Jackson y Harris<sup>53</sup> utilizando anhídrido acético marcado con  $^{14}C$  o  $^3H$ , determinaron la exposición relativa de las lisinas y serinas (figura 1) de la  $IF_1$  de corazón bovino en complejo con la  $F_1$ , de la  $IF_1$  soluble y la  $IF_1$  soluble desnaturalizada. Desnaturalizando la proteína inhibidora soluble con cloruro de guanidina, mostraron que existen residuos de la  $IF_1$  en la forma nativa que están más protegidos frente al anhídrido

acético que en la forma desnaturalizada. En la forma nativa los residuos centrales, e.g. 54-58 muestran mayor ocultamiento frente al anhídrido, el cual decrece hacia los extremos amino y carboxilo. Por otro lado, la lisina 24 decrece levemente su reactividad al anhídrido cuando la IF<sub>1</sub> está en complejo con la F<sub>1</sub>, además que los residuos 54, 58 y 65 están disponibles para ser unidos a un anticuerpo.<sup>53</sup>

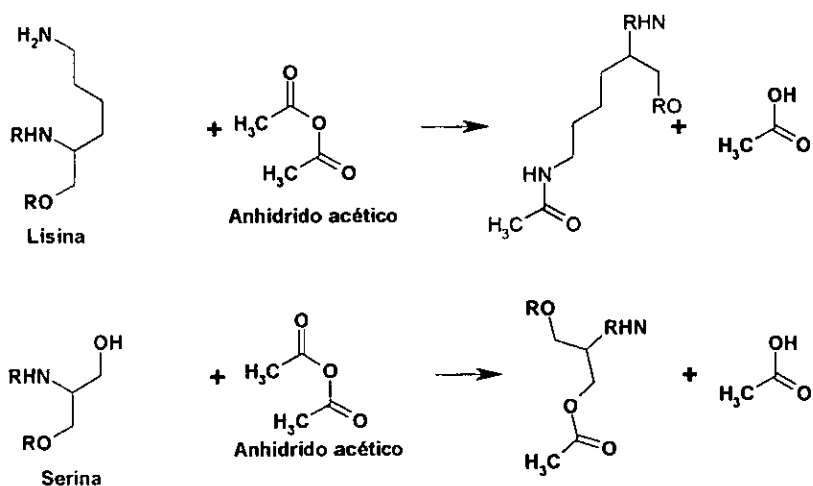
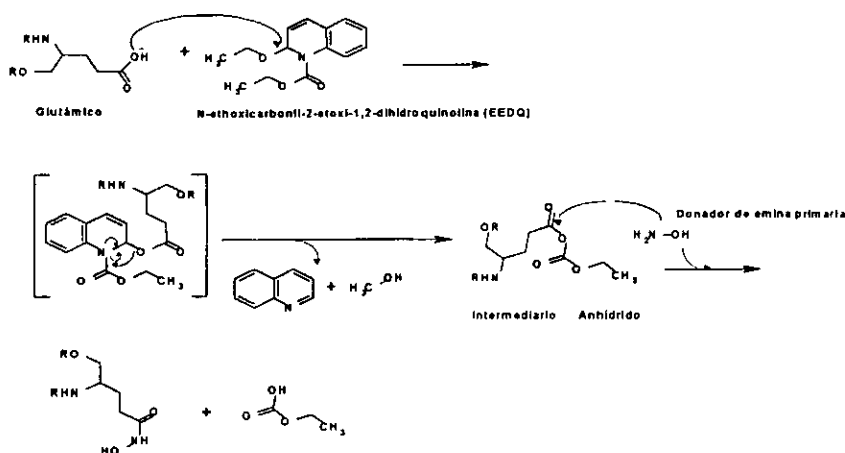


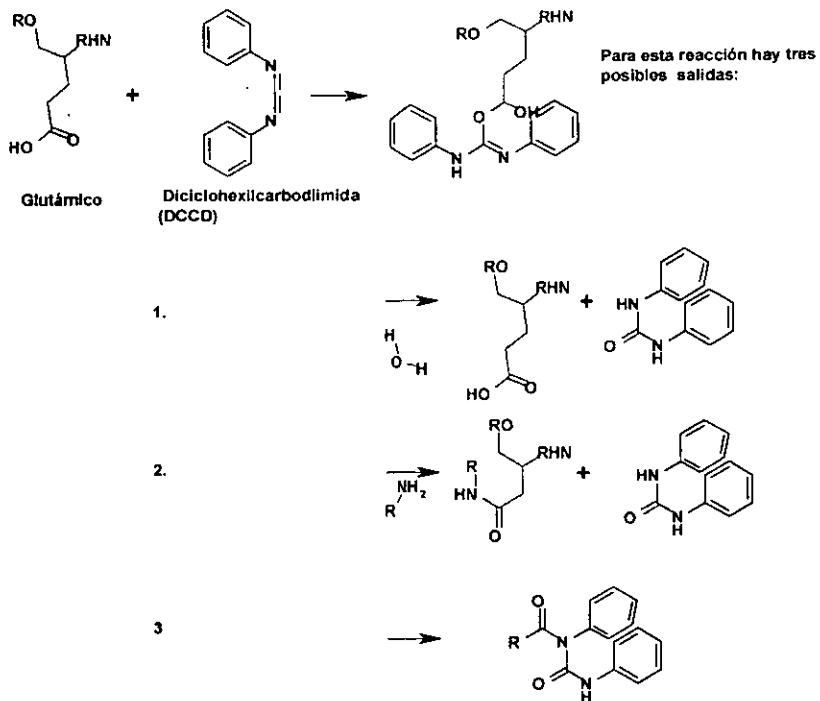
Figura 1. Derivatización de lisina y serina por el anhídrido acético.<sup>52</sup>

**1.1.4. Entrecruzamiento y modificaciones químicas por EEDQ (*N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina), DCCD (Diciclohexilcarbodiimida) y el anhídrido acético,**

Tanto en los estudios realizados por Keit et al.<sup>34</sup> así como por Beltrán et al.<sup>35</sup> (con IF<sub>1</sub> exógena y IF<sub>1</sub> endógena, respectivamente), se había determinado que el complejo IF<sub>1</sub>-F<sub>1</sub> tratado con EEDQ, se forma una única unión covalente, entre la IF<sub>1</sub> y la subunidad β. Este reactivo es un entrecruzador de distancia cero que activa residuos con grupo carboxilos cebándolos para reaccionar con donadores de aminas (como las lisinas) permitiéndoles unirse de manera covalente sin dejar ningún átomo proveniente del entrecruzador (figura 2). En el último trabajo mencionado también se muestra que la subunidad β que reacciona con la IF<sub>1</sub> es diferente de la que reacciona con el inhibidor DCCD (el complejo F<sub>1</sub>I fue tratado primero con DCCD (figura 3) y con EEDQ.)



**Figura 2.** Reacción de entrecruzamiento por el EEDQ.<sup>52</sup>



**Figura 3.** Reacciones de un grupo carboxilo, e.g. un glutámico, con el DCCD. (1) Regeneración del carboxilo, (2) entrecruzamiento con un donador amino y (3) estabilización de un derivado unido covalente.<sup>52</sup>

En estrecha relación con los experimentos anteriores Laikind, et al.<sup>43</sup> usaron el EEDQ en la F<sub>1</sub> y [<sup>3</sup>H]-alanina como donador de grupo amino y trataron de determinar con

cuales residuos reacciona el EEDQ y si éstos coincidían con el que derivatiza el DCCD. En presencia de EEDQ, la anilina se unió covalentemente a tres diferentes glutámicos:  $\alpha$ E399,  $\beta$ E199 y  $\beta$ E341, pero solo la unión covalente en  $\beta$ E199 correlaciona con la inactivación de la  $F_1$ . Lo anterior permitió concluir que ambos reactivos, el EEDQ y el DCCD, reaccionan con el mismo glutámico, el  $\beta$ E199. Sin embargo, no excluye la posibilidad de que la  $IF_1$  pudiese ser entrecruzada con cualquiera de los otros dos glutámicos,  $\alpha$ E399 ó  $\beta$ E341.

La dependencia al pH para la inactivación por EEDQ muestra que el residuo de glutámico debe estar protonado para hacer posible la reacción de entrecruzamiento.<sup>43</sup>

Es importante señalar que cuando se usa proteína inhibidora exógena junto con  $F_1$  y se entrecruzan con EEDQ se puede dar lugar a un producto covalentemente unido tanto a la subunidad  $\alpha$  como a la subunidad  $\beta$ .<sup>41</sup> En un caso en particular, se determinó que el entrecruzamiento de la  $IF_1$  con la  $\beta$  tuvo lugar en un glutámico de la región DELSEED<sup>85</sup>. Sin embargo, el uso de  $IF_1$  exógena puede producir complejos  $IF_1$ - $F_1$  con estequiometrias diferentes de la fisiológica de 1 mol de  $IF_1$ / 1 mol de  $F_1$ , lo cual hace estos resultados inciertos.

Con estos antecedentes se consideró importante continuar la caracterización de la interacción de la  $IF_1$  en complejo con la  $F_1$  utilizando como entrecruzador al EEDQ.

### 1.1.5. Mecanismo de inhibición de la IF<sub>1</sub>.

Hay dos mecanismos propuestos para la inhibición de la actividad de la ATPasa por la IF<sub>1</sub>:

- (i) La inhibición de la fijación del Mg-ATP.
- (ii) La inhibición de la liberación del Mg-ADP, producto de la hidrólisis de MgATP.

La inhibición de la salida del ADP-Mg es la más aceptable debido principalmente al hecho de que se requieren varios ciclos catalíticos para obtener la inhibición por la IF<sub>1</sub>.<sup>10</sup>, también se ha visto que la IF<sub>1</sub> es un inhibidor acompetitivo del Pi y de análogos del ATP.<sup>48</sup>,<sup>54</sup> Cabe mencionar que la inhibición histerética<sup>88, 89</sup> de la hidrólisis por ADP es aditiva a la de IF<sub>1</sub> en el caso de las mitocondrias de corazón de cerdo.<sup>55</sup>

El cómo interactúa la proteína inhibidora con la F<sub>1</sub> es aún especulativo ya que en las estructuras de rayos X disponibles de la F<sub>1</sub> sólo son visibles las subunidades  $\alpha_3\beta_3\gamma$  y no se ha cristalizado el complejo F<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub>. La determinación de la estructura cristalográfica de la proteína inhibidora se ha visto impedida por su tendencia a oligomerizarse. Se piensa que su interacción con el complejo F<sub>1</sub> está dada a través de una región DELSEED de la subunidad  $\beta$ <sup>53, 56</sup>. De cualquier manera, se sugiere que su asociación está íntimamente ligada a la estructura cuaternaria del complejo, ya que modificaciones de un residuo de triptofano en la subunidad  $\epsilon$  de F<sub>1</sub> de corazón bovino, el cual solo es derivatizable cuando la IF<sub>1</sub> se encuentra asociada a la F<sub>1</sub>, resulta en una activación de la hidrólisis, es decir que la presencia de la IF<sub>1</sub> modifica la conformación de la subunidad  $\epsilon$ .<sup>57</sup>

## 1.2. *Saccharomyces cerevisiae*.

En  $F_0F_1$ ATPasa de mitocondrias de levadura existen tres proteínas inhibidoras: el inhibidor (tabla 2) de la ATPasa, la proteína 9K y la proteína 15K. En este sistema, tanto la  $IF_1$  como la proteína 9K<sup>70</sup> se unen al sector  $F_1$  y lo inhiben. Ambas requieren la hidrólisis previa de Mg-ATP.<sup>65</sup> En el complejo  $F_0F_1$  la proteína 15K estabiliza la unión de 9K e  $IF_1$  al mismo tiempo y de manera no competitiva. La eliminación de cualquiera de éstas proteínas del genoma de la levadura previene la inhibición total y estable de la actividad hidrolítica de la  $F_0F_1$ ATPasa en condiciones desacoplantes<sup>66</sup>, pero no afecta la actividad de síntesis de ATP.<sup>67,68</sup>

En el modelo de *S. cerevisiae*, se ha podido determinar el residuo de la subunidad  $\beta$  donde está siendo entrecruzada con la  $IF_1$  utilizando EEDQ.

### 1.2.1 Entrecruzamiento con EEDQ (*N*-ethoxycarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina).

En la levadura también se ha utilizado el complejo  $F_1$  reconstituido así como el entrecruzamiento con EEDQ, para definir los residuos de interacción entre la  $IF_1$  y el dominio  $F_1$ .

Obteniendo fragmentos de la  $IF_1$  correspondientes a la secuencia que va de residuo 1 al 51, del 52 al 84 y del 46 al 84 (tabla 2), mediante proteólisis, se mostró que únicamente el primero es capaz de inhibir la actividad del  $F_1$ . Este fragmento solo entrecruza con la



subunidad  $\alpha$ . Ni el fragmento 46 a 84 o el 52 a 84 pudieron inhibir al  $F_1$ , el primero con la subunidad  $\beta$  mientras que el segundo no dió producto de entrecruzamiento. <sup>44</sup>

A pesar de que en este modelo el inhibidor ha sido entrecruzado con las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de  $F_1$ , esto parece ser consecuencia del uso de  $IF_1$  exógena.

Ichikawa et al. <sup>69</sup>, utilizaron un complejo reconstituido en el que emplean cerca de 6 molas de  $IF_1$  / mol de  $F_1$ , para definir el sitio de entrecruzamiento de la  $IF_1$  con la  $F_1$ . Secuenciando los productos de una digestión parcial se concluyó que es la región correspondiente a la secuencia  $\beta P334-D363$  (subunidad  $\beta$ , residuos 334 a 363), probablemente con el aspártico 363, donde sucede el entrecruzamiento. No se pudo determinar la secuencia de la región del  $IF_1$  donde se entrecruzó. Esta región corresponde a la secuencia  $\beta P320-D349$  de la enzima de mitocondria de corazón de bovino.

## OBJETIVOS:

### A. General.

Obtener un complejo  $F_1I$  endógeno de gran pureza para estudiar las interacciones de la  $IF_1$  con la  $F_1$  y los efectos de dichas interacciones.

### B. PARTICULARES.

1. Mejorar la eficiencia de la metodología existente de purificación del complejo  $F_1I$  endógeno.
2. Identificar las subunidades de la  $F_1$  que interaccionan con la  $IF_1$  en el complejo  $F_1I$  endógeno.
3. Estudiar las propiedades catalíticas del complejo  $F_1I$  en condiciones multisitio y unisitio.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### **2.1 Obtención de mitocondrias de corazón bovino.<sup>71, 72, 73</sup>**

Se limpia el corazón de tejido conectivo, grasa y coágulos de sangre y se corta el músculo en tiras de 2 a 4 cm de ancho. Se muele la carne en un molino de carne. Generalmente se obtienen de 400 a 600 g de carne de un corazón de tamaño regular.

Se adicionan 4 litros de amortiguador A por cada kg de carne molida y se ajusta el pH a 7.4 con Tris saturado (generalmente se requieren de 10 a 15 ml de Tris saturado por cada 2 kg de carne). Este paso se debe realizar burbujeando nitrógeno a las muestras. Se licua durante 90 segundos y se ajusta nuevamente el pH a 7.4 con Tris saturado, se requiere más o menos un volumen de 10 a 15 ml por cada 2 kg. de carne. Se coloca el licuado en botellas de centrifuga de 500 ml de capacidad y se centrifuga a 2500 r.p.m. (1100 x g) durante 10 minutos a 4 °C utilizando el rotor JA-10 ó el rotor GS- 3. El sobrenadante se decanta a través de una gasa triple colocada en un vaso de 5 litros. El precipitado se deshecha. El filtrado se centrifuga a 10000 r.p.m. (16000 x g) durante 10 minutos a 4 °C, utilizando el rotor JA-14 ó el rotor GSA para botellas de 250 ml. El precipitado obtenido son las mitocondrias, las cuales se resuspenden en 500 ml del amortiguador B por cada kg de carne molida. Se recentrifuga la suspensión a 2000 r.p.m. (600 x g) a 4 °C utilizando el Rotor JA-14 o el rotor GSA. Se descarta el precipitado blanco rojizo que contiene miosina. El sobrenadante se recentrifuga a 10000 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C. Se descarta el sobrenadante.

**Nota:** El precipitado está formado por una capa superior que son las mitocondrias ligeras y una pastilla fuertemente pegada al fondo de la botella y de color más oscuro, que son las mitocondrias pesadas. Las mitocondrias ligeras se obtienen agitando el contenido de la botella, decantando y enjuagando con unos mililitros de sacarosa 250 mM. Después de este paso, las mitocondrias pesadas se resuspenden en el mínimo volumen posible (2 a 5 ml por botella) de sacarosa 250 mM. Se homogeneizan por separado los dos tipos de mitocondrias y se determina proteína por método de Biuret con alícuotas de 20  $\mu$ l y en presencia de desoxicolato de sodio 0.33 %. Estas mitocondrias se pueden usar inmediatamente o almacenar en alícuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Si las mitocondrias se van a almacenar es recomendable que estén muy concentradas (50 a 70 mg/ml). En estas condiciones las mitocondrias pueden permanecer almacenadas por lo menos 6 meses sin perder sus propiedades.

**Notas:** La fracciones de mitocondrias pesadas, generalmente se usan para estudios directos en mitocondrias, así como para la preparación de partículas submitocondriales acopladas (como las Mg-ATP). Las mitocondrias ligeras se emplean con mas frecuencia para la extracción o purificación de componentes mitocondriales, o para la preparación de partículas submitocondriales desacopladas (como SMP-EDTA, SMP-Amonio-Sephadex, SMP-Klein, etc.).

Si se quiere tener una fracción de mitocondrias pesadas libre de ligeras, se deben lavar por resuspensión y por recentrifugación por lo menos 3 veces con 10 volúmenes de amortiguador B después de separarse, o hasta que no se detecten mitocondrias ligeras en el

precipitado. Un procedimiento similar se debe seguir si se requieren mitocondrias ligeras libres de mitocondrias pesadas.

**Precauciones:** El procedimiento mecánico para obtener mitocondrias de tejido debe ser tan suave como sea posible para preservar la integridad de la mitocondria y su grado de acoplamiento. Se sabe que aún las mitocondrias pesadas de corazón de res pierden parte del citocromo c y de la creatina cinasa. Es muy importante ajustar correctamente el pH del medio en que se preparan las mitocondrias, ya que de esto dependen las propiedades diferenciales de sedimentación entre mitocondrias ligeras y pesadas. A valores de pH ácidos la separación entre los dos tipos de mitocondrias es pobre, en tanto que a valores de pH alcalinos la separación es buena, pero se daña la actividad enzimática de las dos fracciones mitocondriales.

#### **REACTIVOS:**

##### **Amortiguador A :**

Sacarosa	250 mM	
Tris	5 mM	
EDTA	15 mM	pH 7.4 final, ajustado con HCl

##### **Amortiguador B:**

Sacarosa	250 mM
Tris	5 mM



<b>Medio I</b>		<b>Medio II</b>	
Sacarosa	250 mM	Sacarosa	250 mM
ATP	6 mM	MES-Tris	10 mM    pH 6.8
Acetato de Mg	6 mM	KCl	100 mM

### **2.3 Obtención del complejo F<sub>1</sub> endógeno.**

El paquete de SMP-MgATP (250 mg de proteína) se resuspende a 10 mg/ml en 25 ml de sacarosa 250 mM sin ajustar el pH y se sonica 30 minutos manteniendo la temperatura en un intervalo de 10-15 °C. Después de sonicar se añade MES-Tris pH 6.8 a una concentración final de 10 mM y ADP a concentración final de 200 µM tras lo cual se centrifuga a 45,000 r.p.m. por 30 minutos a 4 °C. Se guarda el sobrenadante (SN<sub>1</sub>). El paquete se resuspende en 20 ml de sacarosa 250 mM. Se sonica 15 minutos manteniendo la temperatura en un intervalo de 10-15 °C. Se centrifuga a 45,000 r.p.m. por 30 minutos a 4 °C. Se guarda el sobrenadante (SN<sub>2</sub>). Se juntaran los sobrenadantes SN<sub>1</sub> y SN<sub>2</sub> y se centrifugaran 60 minutos a 45, 000 r.p.m. El sobrenadante se aplica a una columna de Sepharosa-hexil amonio (de 5cm x 1cm) equilibrada previamente con 40 ml de Medio III, se lava con 100 ml de Medio III y se eluye con Medio III más 500 mM KCl y se colectan en fracciones (en tubos en hielo) de aproximadamente 3 ml por tubo. Posteriormente se determina la concentración de proteína de cada uno de los tubos con el método de Bradford leyendo a 595 nm, en celda de plástico. Se seleccionan y se juntan las fracciones que contienen proteína.

Mientras se agita la mezcla de las fracciones que contienen proteína en un baño frío, se les añade sulfato de amonio sólido a 50% de saturación (313 mg/ml).

Se centrifuga por 30 minutos a 15,000 r.p.m. a 4 °C y se resuspende en 200 µl de Medio III. Esta última resuspensión se centrifuga en tubos Eppendorf por cinco minutos. El sobrenadante se reparte en alícuotas de 50 µlitros y se guarda a -75 °C.

### ***Medio III***

Sacarosa	250 mM	
MES	10 mM	pH 6.8 con HCl
ADP	200 mM	

### ***2.4 Activación de F<sub>1</sub>I.***

La determinación de la curva de activación se realiza determinando la actividad de ATPasa de complejo F<sub>1</sub> ó F<sub>1</sub>I tras su incubación en medio de activación, a 40 ° C, durante diferentes tiempos. A los tiempos indicados se toma una alícuota de la enzima en medio de activación y se diluye en medio de actividad en una celda de espectro fotómetro. El medio de actividad contiene sustrato para la ATPasa así como sustratos para las enzimas acoplantes. La actividad se determina siguiendo la desaparición del NADH a 340 nm.



**Medio de Activación**

		Concentración Final
ATP	pH 8.0	10 mM
Tris-SO <sub>4</sub>	pH 8.2	50 mM
EDTA	pH 8.0	1.5 mM
KCl		100 mM

**Medio de Actividad:***Medio de ATPasa*

MgSO <sub>4</sub>	3 mM
Tris-SO <sub>4</sub> pH 8.0	20 mM
KSO <sub>4</sub>	30 mM

Por 2.9 ml de medio de actividad se  
añade:

	Concentración Final
ATP	3 mM
PEP	1.5 mM
NADH	15 mM
PK	3 unidades
LDH	3 unidades

El NADH se debe usar preferentemente fresco para cada experimento y además debe agregarse a la celda justo antes de iniciar la determinación.

**Nota:** Para determinar la actividad en el tiempo 0, se toman de 5 a 10  $\mu$ l del medio

más la enzima justo después de mezclarse y se agrega al Medio de Actividad.

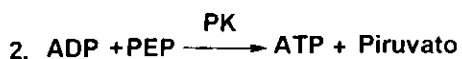
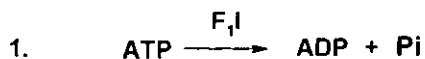
La actividad se calculó con la siguiente fórmula:

$$\mu\text{molas min}^{-1} \text{ mg}^{-1} = \frac{\Delta A_{340} / \text{min}}{\epsilon * \text{mg de enzima} / \text{ml de mezcla de reacción}}$$

$\Delta A^{340}$  significa cambio de absorbancia a 340 nm.

$\epsilon$  Coeficiente de extinción micromolar del NADH,  $6.22 \mu\text{mol ml}^{-1}$ .

**La determinación de actividad, a 340 nm ,se realiza mediante las siguientes reacciones acopladas:**



## **2.5 Determinación de proteína por Ácido Bicinconínico (BCA).**

Se utilizó el kit de Pierce.

Para la determinación de la concentración de proteína por este método se requiere realizar una curva de concentración estándar, utilizando una solución de proteína de

concentración conocida. Se utiliza albúmina de suero bovino (BSA) cuya concentración es de 2 mg/ml. Se determina la absorbancia de este estándar para 5 concentraciones diferentes de proteína (e.g. 5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{g/ml}$ ) y efectuando una regresión lineal sobre los valores de absorbancia obtenidos contra la concentración de proteína se obtiene una recta a la cual se puede interpolar la concentración de la muestra problema. Se tomó un volumen de la muestra o del estándar y se llevó a 50  $\mu\text{l}$  con  $\text{H}_2\text{O}$ . A este volumen se le agregó 1 ml de una mezcla 1:50 de los reactivos A y B, respectivamente, del kit. Después de esta adición se incubó a 30 °C durante media hora, o a temperatura ambiente por dos horas. Se leyó absorbancia a 562 nm.

## **2.6 SDS-PAGE de von-Jagow<sup>77</sup>.**

Esta técnica de SDS-PAGE permite separar a las proteínas en base a la carga que les confiere el dodecilsulfato de sodio (SDS) y de manera aproximada a su peso molecular. La resolución de esta técnica es alta para proteínas entre 50 y 5 kDa, pero baja arriba de 50kDa.

Para preparar este tipo de geles se montan los cristales de la cámara de electroforesis, procurando que sellen y no presenten fugas. Se prepara el gel separador y con ayuda de una pipeta Pasteur, se vierte la mezcla dentro de la cámara llenando  $\frac{3}{4}$  partes de ella. Con cuidado, se agrega una capa de  $\text{H}_2\text{O}$  a la superficie del gel para asegurar su gelificado horizontal. Se recomienda dejar gelificando toda la noche, a 4 °C.

Una vez gelificado el separador, se remueve el agua y se colocó sobre la cámara el

peine con los carriles deseados. El gel concentrador se vierte en la cámara con una pipeta Pasteur hasta que se alcanzó el borde de la cámara, se procuró no dejar burbujas. Una vez gelificado, se retira el peine y se monta la cámara de corrida. La cámara interna se llena de amortiguador superior y la externa de amortiguador inferior, se procura cubrir el filamento de platino. Las muestras se preparan mezclando volumen a volumen la muestra de proteína (concentración de entre 5  $\mu\text{g}$  a 25  $\mu\text{g}$ ) y la mezcla de desnaturalización. Cada muestra se vierte en el carril con ayuda de una jeringilla, la cual se enjuaga previamente tres veces en la mezcla de desnaturalización.

**Acrilamida 30% (100 ml):**

Acrilamida	30 gr.
-bis acrilamida	0.938 gr.

**Amortiguador de pH inferior,  
ánodo (+) (1 litro):**

Tris/HCl	24.06 gr.
pH	8.4

**Amortiguador de pH para el gel**

**(100 ml):**

Tris	36.34 gr
HCl	8.28 gr.
SDS	0.3 gr

**Amortiguador de pH superior,  
cátodo (-)  
(1 litro):**

Tris	12.11 gr.
Tricina	17.93 gr. pH 8.25
SDS	1 gr.

	<b>Gel 16 % (separador)</b>	<b>Gel 4 % (concentrador)</b>
<b>Acrilamida</b>	3.2 ml	0.533 ml
<b>Amortiguador</b>	2.0 ml	1 ml
<b>Glicerol</b>	0.8 ml	2.466 ml, H <sub>2</sub> O en lugar de glicerol
<b>Persulfato de amonio 10%</b>	30 µl	30 µl
<b>TEMED</b>	3 µl	3 µl

Los geles preparados con ésta técnica se corren a 80 mV por 1 hora y después se les aumenta el voltaje a 120 mV por 3 ó 4 horas. Esta técnica se emplea en los minigeles para las cámaras Mini Protean de BioRad.

### **2.7 Mezcla de Desnaturalización.**

H <sub>2</sub> O	3.0 ml
Tris-HCl pH 6.8	1.0 ml
Glicerol	1.6 ml
SDS 10%	1.6 ml
β-mercaptoetanol	0.8 ml
0.5 % Azul de bromofenol	0.4 ml
Urea 3 %	

Una vez juntas las muestras con la mezcla de desnaturalización se dejaron incubar entre 5 y 15 minutos antes de ser puestas en el gel. Esta mezcla de desnaturalización sirve para dar una mayor densidad a la muestra de proteína, además de desnaturalizarla gracias a la presencia de la urea, reducir puentes disulfuro por el 2-mercaptoetanol y el seguimiento del frente de la elución por el azul de bromofenol.

## **2.8 Tricine SDS-PAGE.<sup>74, 75, 76</sup>**

Los geles preparados con esta técnica poseen alta resolución para proteínas entre 70 y 5 kDa.

Para preparar este tipo de geles, se montan los cristales de la cámara de electroforesis, procurando que sellen y no presenten fugas. Se prepara el gel separador y con ayuda de una pipeta, se vierte la mezcla dentro de la cámara llenando  $\frac{3}{4}$  partes de ella. Con cuidado, se agrega una capa de isobutanol a la superficie del gel para asegurar su gelificado horizontal. Se recomienda dejar gelificando toda la noche, a 4 °C. Una vez gelificado el separador, se remueve el isobutanol y se coloca sobre la cámara el peine con los carriles deseados. El gel concentrador se vierte en la cámara con una pipeta hasta que se alcanza el borde de la cámara, procurando no dejar burbujas. Una vez gelificado, se retira el peine y se monta en la cámara de corrida. La cámara interna se llena de Amortiguador Superior y la externa de Amortiguador Inferior, procurando cubrir el filamento de platino. Las muestras se prepararan mezclando volumen a volumen la muestra de proteína (concentración de entre 15  $\mu\text{g}$  a 25  $\mu\text{g}$ ) y la mezcla de desnaturalización. Cada muestra se vierte en un carril con ayuda de una jeringilla, enjuagada previamente en la mezcla de desnaturalización.

## **Materiales**

**AB mix (mezcla acrilamida-  
bisacrilamida)**

49.5 % T, 3 % C

48 g acrilamida, 1.5 g bis. a 100 ml.

**Amortiguador de pH del cátodo**

a. Tris 0.1 M pH 8.25

b. Tricina 0.1 M

c. SDS 0.1 %

**Amortiguador de pH del ánodo**

a. Tris 0.2 M pH 8.9

**Amortiguador de pH del gel**

a. Tris 3.0 M pH 8.45

b. SDS 0.3 %

	<b>Gel concentrador</b> 4% T, 3 % C	<b>Gel espaciador</b> 10 % T, 3% C	<b>Gel separador</b> 16.5%T, 3%C
<b>Solución 49.5% T, 3% C</b>	1 ml	6.1 ml	10 ml
<b>Amortiguador del gel</b>	3.1 ml	10 ml	10 ml
<b>PSA 10 %</b>	100 µl	100 µl	150 µl
<b>TEMED</b>	10 µl/ 12.5 ml	10 µl/ 30 ml	15 µl/ 30 ml
<b>Glicerol</b>			4 gramos
<b>Agregó H<sub>2</sub>O para volumen final de:</b>	12.5 ml	30 ml	30 ml

% T = concentración de acrilamida.

%C = concentración de bisacrilamida.

Estos geles se corren a 50 mA. Se corren durante 12 o 14 horas a 4° C.

Estos geles se preparan en el formato "slab" de mayor tamaño que los minigeles, dando mayor resolución para las bandas de alto peso molecular. Se utilizan para las inmunotransferencias.

### ***2.9 Tinción por azul de Coomasie para geles de poliacrilamida.***

Inmediatamente después de sacar el gel de la cámara de electroforesis, se sumerge en la solución de azul de Coomasie y se deja en agitación por una hora. Después de esto, para desteñir el fondo y dejar las bandas de proteína intactas, se pasa a ácido acético al 10% y se agita durante toda una noche.

#### ***Azul de Coomasie (1 litro):***

Coomassie Brilliant Blue R-250	500 mg
Isopropanol	250 ml
Ácido Acético Glacial	100 ml
H <sub>2</sub> O	650 ml



## 2.10 Tinción por plata para geles de poliacrilamida.

El gel se fija con solución fijadora por 10 minutos. Después se lava dos veces con agua destilada por 5 minutos. Posteriormente se sumerge en solución de pretratamiento durante 1 minuto. Se enjuaga dos veces con agua destilada y se somete a un baño en solución de plata durante 15 minutos. Se enjuaga con agua destilada y sumerge en un baño de solución reveladora. La reacción se detiene con ácido cítrico 2.3 M. Después se lava con agua destilada por 10 minutos y se deja secar en solución 10 % EtOH + 4 % glicerol.

### Solución fijadora (1 litro):

MeOH 40 %            400 ml

Formaldehido 5%    50 ml

### Solución de

### Pretratamiento (1 litro):

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.02 % 0.2 g

### Solución de Plata (1 litro):

$\text{AgNO}_3$  0.1 %            1 g

### Solución Reveladora (1 litro):

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  3 %            30 g

Formalina 0.05 % 1 ml (se agregó fresca).

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0004 %

Nota: Este protocolo solo sirve para minigeles.

## 2.11. Electroforesis azul nativa.<sup>78, 79</sup>

Esta técnica permite separar proteínas o complejos de proteínas en su estado nativo de manera proporcional a el peso molecular de dichas proteínas o sus respectivos complejos.

### **Materiales**

#### **AB mix (mezcla acrilamida-bisacrilamida)**

48 g Acrilamida en 100 ml  
1.5 g de bisacrilamida en 100ml

#### **Amortiguador de pH del cátodo A (4°)**

Tricina                    50 mM  
Bis-tris HCl            15 mM  
Serva Blue G            0.02%  
pH 7.0

La cámara se armó de acuerdo a la sección 2.6 y 2.8.

#### **Amortiguador de pH del gel (4°)**

Bis-Tris                    150 mM  
pH 7.0

#### **Amortiguador de pH del ánodo**

(4°)

Bis-Tris HCl            50 mM  
pH 7.0

#### **Mezcla de carga**

15% glicerol  
49 mM Bis-Tris HCl  
50 pH 7.0

	Sample gel 4%	6%	13%
<b>AB mix</b>	0.5 ml	2.5 ml	4.7 ml
<b>Buffer del gel</b>	2 ml	7 ml	6 ml
<b>Glicerol</b>	-	-	3.6 g
<b>PSA 10%</b>	50 $\mu$ l	90 $\mu$ l	60 $\mu$ l
<b>TEMED</b>	6 $\mu$ l	9 $\mu$ l	6 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	6 ml	21 ml	18 ml

La electroforesis se inicia a 100 V hasta que el frente del colorante alcance el gel separador y luego se lleva hasta 500 V y 15 mA por 3 ó 6 horas. Puede dejarse a 200 V toda la noche.

### **2.12 Entrecruzamiento de F<sub>1</sub>l endógena utilizando EEDQ.**

El medio unisitio con ATP y la enzima se incuban por 30 minutos. Se adiciona el EEDQ, disuelto en metanol, y se incuba por 30 minutos más. La reacción se detiene centrifugando la muestra por 30 segundos a 3,000 r.p.m., en columnas de Penefsky (hechas con una jeringilla de insulina de 1 ml, cargada con Sephadex 50 fine) equilibradas con Medio Unisitio. Una vez descongelada y filtrada la enzima, se deja a 4° C excepto donde se indique.

**Materiales:**

		Concentración final	
Medio unisito		ATP	3 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 mM	EEDQ	10 mM
MOPS	40 mM		
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	Enzima	60 µg
pH 6.8			

**2. 13 Determinación de actividad de ATPasa en condiciones unisito.**

La reacción de ATPasa se arranca con la adición de la proteína a un tubo de ensayo que contenga el Medio Unisito a 25 ° C, el ATP marcado radiactivamente, y en caso necesario, el (los) inhibidores. La reacción de hidrólisis de ATP se detiene, a diferentes tiempos, con la adición de ácido tricloroacético (12% final).

**Medio de reacción**

<i>Medio de unisito</i>		ATPγ <sup>32</sup> P	0.3 µM
	Concentración final	Proteína	37 µg/ 100 µl (1µM)
		<i>Inhibidores:</i>	Concentración final
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 mM	Azida	25 mM
MOPS	40 mM	Guanidina	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM		
pH 6.8			

**Nota:** Cuando se incluye azida en el ensayo, la azida, el medio unisitio y la enzima (F<sub>1</sub>, F<sub>1</sub>I ó F<sub>1</sub>I entrecruzada) se mezclan y se incuban por 15 minutos antes de iniciar la reacción de hidrólisis. La reacción se inicia con la adición de ATP radiactivo.

Cuando se incluyó guanidina, esta se mezcla con el medio unisitio y la enzima, 5 segundos después de mezclarlos se arranca la reacción con el ATP radiactivo.

Cuando se usaron ambos inhibidores , la azida, la enzima y el medio unisitio se incuban juntos por 15 minutos, se agrega después la guanidina y 5 segundos después se inicia la reacción con la adición del ATP radiactivo.

Para determinar el ATP hidrolizado, se procede como se indica a continuación.

La fase acuosa se extrae de 3 a 4 veces con el medio de extracción, esta fase es la que contiene el ATP<sup>32</sup>P remanente de la hidrólisis. Una alícuota de la fase se aplica sobre papel filtro y se seca con luz roja. Posteriormente se colocan los papeles con la muestra en viales con líquido de centelleo procurando que cubra por completo el papel. Las cuentas por minuto representan el ATP que no se hidrolizó.

#### **Medio de Extracción de Pi:**

Molibdato de NH <sub>4</sub> 3.3% en H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 3.75 N	500 µl.
Acetona	200 µl.
Isobutanol-benceno 1:1 saturado con H <sub>2</sub> O	1 ml.

### **Líquido de centelleo (Bray)**

PPO 0.55%

POPOP 0.0125%

Tolueno

El porcentaje de hidrólisis se calculó tomando como 100% las cuentas totales de la mezcla de reacción sin enzimas, extraídas en paralelo con las muestras con enzima.

### **2. 14 Inmunorélicas.**

Se realiza con un gel de poliacrilamida SDS, con 20 a 30  $\mu\text{g}$  de proteína, ya sea F<sub>1</sub>I, IF<sub>1</sub> ó F<sub>1</sub>I entrecruzada. Se incuba en amortiguador de transferencia, durante 30 minutos o una hora. Usando guantes, se saca el gel del amortiguador, se corta en tiras, una por carril marcando el borde inferior. Un carril se tiñe con Coomassie como control. Se corta papel de nitrocelulosa o inmobilón del tamaño de las tiras del gel. Dicho papel se moja en el amortiguador de transferencia. En la rejilla de transferencia se coloca una esponja gruesa previamente empapada de amortiguador de transferencia y encima un papel filtro mojado. Sobre este papel se colocan las tiras del gel y encima del gel se colocan las tiras de papel de nitrocelulosa a las que se transferiran las bandas de proteína, procurando no dejar burbujas

entre el gel y el papel. Se pone otro papel filtro, otra esponja y se cierra la rejilla. La rejilla se inserta en la cámara de transferencia y se llena de amortiguador hasta la señal de llenado. La cámara de transferencia se conecta a un baño de temperatura a 4° C. En el fondo de la cámara se coloca un agitador magnético y se pone en funcionamiento.

La transferencia se realiza a 400 mA durante cuatro horas.

Usando guantes, se sacan las tiras del gel y se lavan las tiras de papel de nitrocelulosa con TBS por cinco minutos, dos veces, agitándolas.

Las tiras de nitrocelulosa se sumergen en 3% de gelatina en TBS (para solubilizar la gelatina se calienta brevemente, después de lo cual debe dejarse enfriar antes de usarse) durante 5 horas, o toda la noche, en agitación. Se lava dos veces con TTBS cinco minutos cada tira de papel. Posteriormente se coloca el primer anticuerpo (ya sea anti- $\beta$  ó anti-IF<sub>1</sub>) en una solución de 1% de gelatina en TTBS y se incuba 5 horas (la dilución a la que se usó cada anticuerpo dependió del origen de cada uno así como de su título). Se lavan con TTBS dos veces por cinco minutos. Se adiciona el segundo anticuerpo (Ig anti-conejo acoplada a fosfatasa alcalina, dilución 1:3000) en una solución de 1% de gelatina en TTBS, y se agita durante 4 o 5 horas. Las tiras de nitrocelulosa se lavan dos veces en TTBS cinco minutos. Se agrega a cada tira de 20 a 30 ml de una solución de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M, MgCl<sub>2</sub> 1mM, pH 9.8, después se le agrega de 200 a 300 ml de BCIP y de 200 a 300 ml de NBT. Se espera a que aparecieran las bandas, debido a la reacción de la fosfatasa alcalina, y en cuanto se obtiene la coloración adecuada se lava dos veces con agua bidestilada.

Las tiras reveladas se guardan en la obscuridad y en refrigeración.

**Amortiguador de Transferencia**

	Concentración final
Tris	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20%
SDS	0.1 %

**TBS (Tris buffer solution)**

	Concentración final
Tris-HCl(pH 7.5)	20 mM
NaCl	0.5 M

**TTBS (Tris-Tween buffer****solution)**

Tris-HCl(pH 7.5)	20 mM
NaCl	0.5 M
Tween-20	0.05%

**BCIP**

30 mg en 4 ml de DMF

**NBT**

60 mg en 2,8 ml de DMF y 1.2 de H<sub>2</sub>O.

**2.15 Determinación de proteína por el método de Biuret.**

El reactivo de Biuret se prepara disolviendo 1.5 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O más 6 gr de tartrato de sodio-potasio en 500 ml de H<sub>2</sub>O hervida por lo menos 20 minutos. Se le añaden 300 ml de NaOH al 10% preparado también con H<sub>2</sub>O hervida. Se afora a un litro.

Se utiliza como estándar una solución de albúmina calibrada previamente. La calibración del estándar de albúmina (BSA) se realiza leyendo proteína a 280 nm (UV, usando celdas de cuarzo) tomando 10 µlitros de la solución de albúmina. Se utiliza el valor de  $\epsilon = 0.667$  mg/ml. Se lee primero el blanco de agua y luego la albúmina, a la lectura de



esta última se le resta la del blanco y se usó  $\epsilon$  para saber la concentración de proteína.

Para la determinación de proteína se agregó primero un volumen de la muestra (entre 25 y 100  $\mu$ l).

Se agregan 0.2 ml de DOC 1%

Se afora a 0.8 ml con H<sub>2</sub>O

Se agregan 2 ml de reactivo de Biuret, al mismo tiempo para todos los tubos.

Como estándar se utilizó BSA de 18.25 mg/ml, se lee absorción a 540 nm después de 20 o 30 minutos

### ***2.16 Purificación de F<sub>1</sub> con columna de Superdex 200 en Fast Protein Liquid Chromatography.***

En un FPLC system de Pharmacia© Biotech se utilizó una columna de filtración en gel Superdex 200, con límites de exclusión de  $1.3 \times 10^6$  para proteínas globulares y un intervalo de separación de 10,000-600,000 Daltones (recomendado por el fabricante, Pharmacia©).

El flujo durante los lavados de la columna, durante el paso de los estándares y la muestra fue de 1 ml/min. Se colectan fracciones de 0.6 ml.

El amortiguador usado, Mes-Tris pH 6.8 50 mM, de filtrado previamente. La

columna se equilibra con 100 ml del amortiguador. Para asegurar una basal confiable así como una resolución óptima de la proteína a purificar, los estándares de peso molecular para la columna se aplican antes de cada corrida de muestra y su perfil de elución se comparó contra el perfil reportado por los fabricantes de la resina.

La sensibilidad del detector de UV (280 nm) durante las corridas de los estándares y la muestra se fija en 0.2. Los datos de la absorbancia de UV y el volumen de elución se exportan de FPLCdirector V.1.10 y se graficaron en Microcal Origin 5.0.

Las fracciones colectadas correspondientes a los picos de absorbancia a 280 nm, se concentran usando microconcentradores de Amicon® (Centricon™ 10) centrifugando de 1000 a 5000 X g (de 2500 hasta 5500 rpm, para el rotor 11174592), durante treinta minutos en una centrifuga Jouan MR1812. La muestra se recupera después de concentrarla invirtiendo el concentrador y recentrifugando 1000 X g durante 2 minutos.

### 3. Resultados

#### 3.1 Características del complejo F<sub>1</sub>I.

##### a) Purificación del complejo F<sub>1</sub>I endógeno.

El complejo F<sub>1</sub>I se purificó como se ha reportado previamente pero con el fin de mejorar la calidad del complejo obtenido, se agregó un paso más de purificación que consistió en pasar la muestra obtenida de la columna de Sepharosa-hexil amonio por una columna de Superdex 200 en un FPLC (figura 4). Un perfil típico en dicha columna, de una muestra de F<sub>1</sub>I de 100 µg seguido a 280 nm, se muestra en la figura 5. Aunque se observen 3 picos, solamente los dos primeros contienen proteína, mientras que el tercero parece deberse al ADP que contenía la muestra inicial. De los dos picos proteicos sólo el primero, al ser corrido en un SDS-PAGE (sección 2.6), muestra el patrón típico de la F<sub>1</sub>I tanto por su número de componentes así como por sus pesos moleculares relativos. Siguiendo ese mismo criterio, el segundo pico no contienen ningún componente que corresponda a alguna de las subunidades del complejo (no se muestra).

La figura 6 compara el perfil de SDS-PAGE de la F<sub>1</sub>I antes y después de la columna de Superdex 200. En dicho gel se aprecia que, en comparación, la F<sub>1</sub>I después de la columna de Superdex 200 pierde algunas bandas de peso molecular mayor al de la subunidad  $\alpha$  y de pesos entre las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$ .

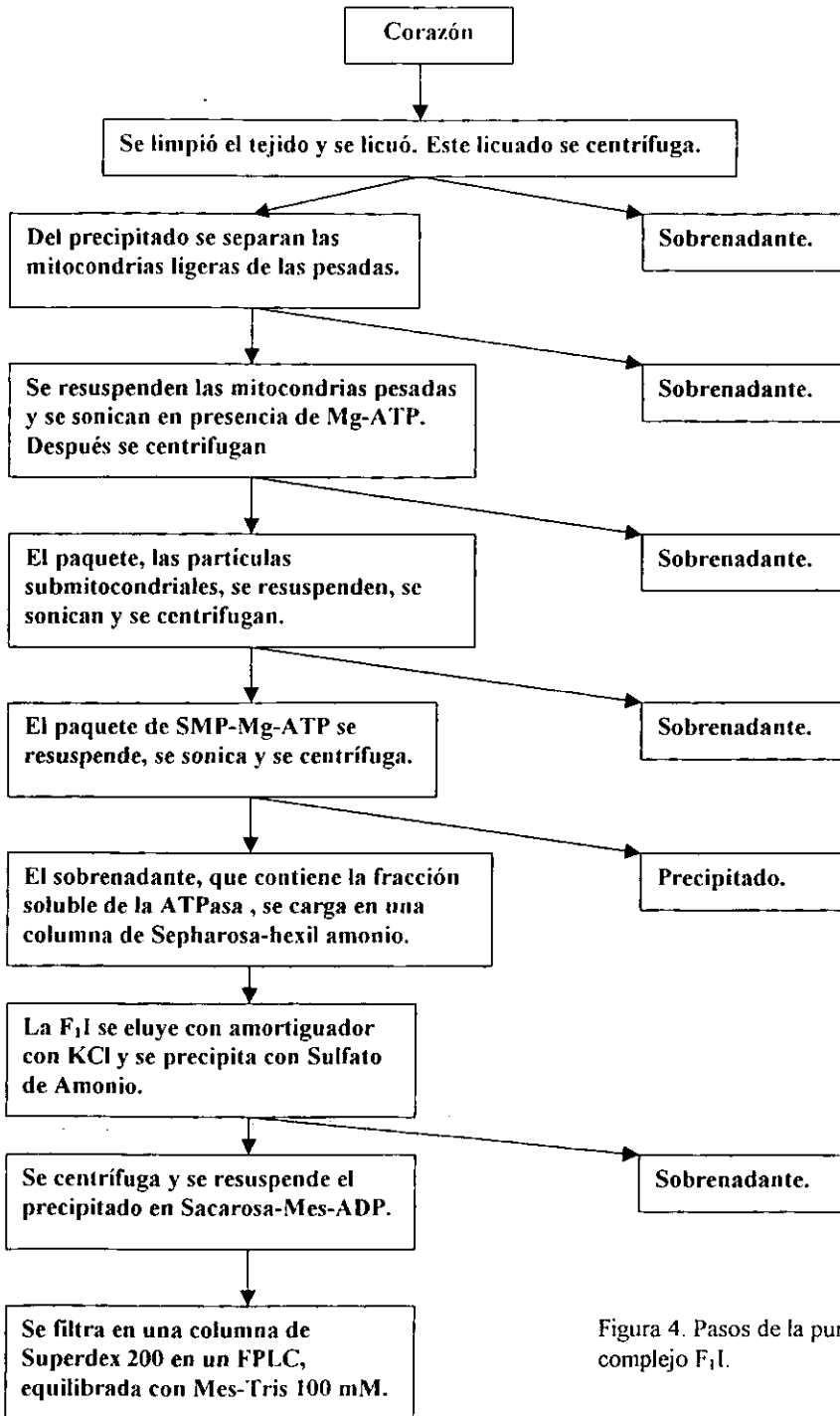


Figura 4. Pasos de la purificación del complejo F<sub>1</sub>I.

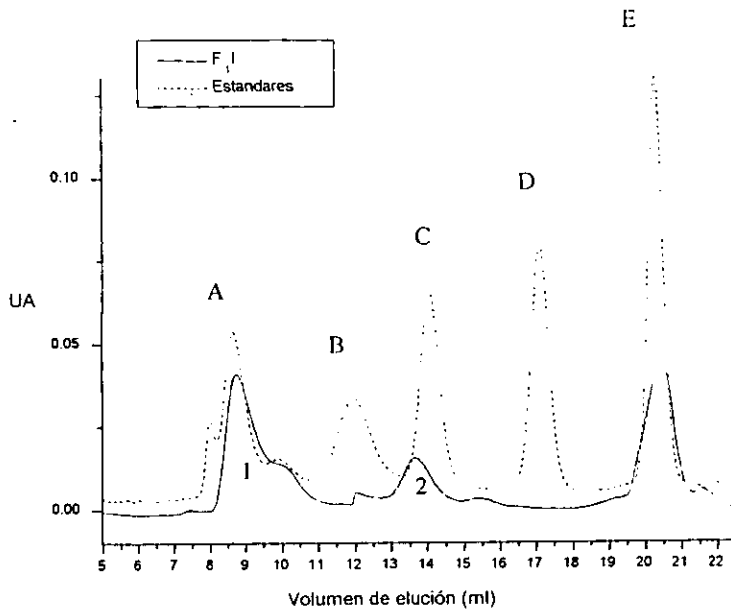


Figura 5. Perfil de elución de la F<sub>1</sub>I a través de una columna de Superdex 200 en FPLC. Línea sólida, 100 µg de F<sub>1</sub>I, a un flujo de 1 ml/min, Mes-Tris 50 mM pH 6.8. Línea punteada, perfil de los estándares de peso molecular: A, 670 kDa, B, 158 kDa, C, 44 kDa, D, 17 kDa, E, 1.3 kDa. Línea sólida, perfil del complejo F<sub>1</sub>I de Sepharosa-hexilamónio: 1, F<sub>1</sub>I, 2, contaminación. UA, unidades de absorbancia a 280 nm.

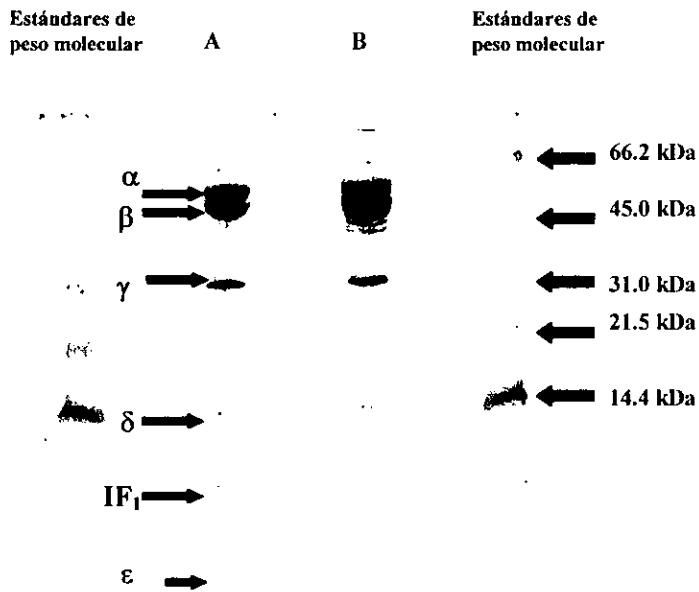


Figura 6. SDS-PAGE de von Jagow. Carril A,  $F_1I$  después de la columna de Superdex 200. Carril B  $F_1I$  después de la columna de Sepharosa-hexil amonio. Se utilizó el método de tinción por plata. Cada carril tiene 15  $\mu$ g de proteína.

Los pesos de las subunidades de la  $F_1I$  son:  $\alpha$  55 kDa,  $\beta$  52 kDa,  $\gamma$  30 kDa,  $\delta$  15 kDa,  $\epsilon$  5 kDa e  $IF_1$  10 kDa.

Con el objetivo de escalar este paso de analítico a preparativo, se utilizaron 2 mg de  $F_{1I}$  en la columna de FPLC. El perfil obtenido se muestra en la figura 7. Resalta que en estas condiciones el primer pico de la figura 5 se descompone en un pico y dos hombros, así como la aparición de un “valle” donde la señal de 280 nm no regresa a 0.

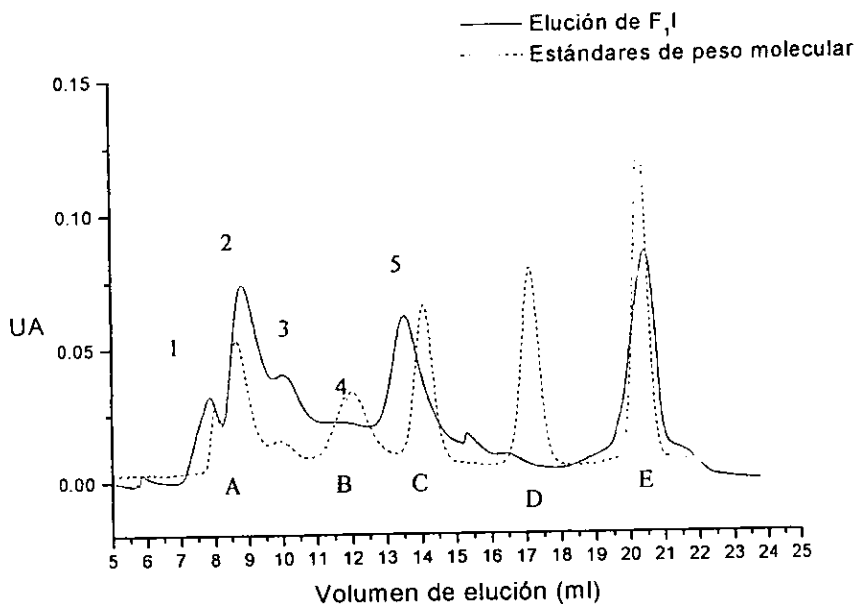


Figura 7. Perfil de elución de la  $F_{1I}$  a través de una columna de Superdex 200 en FPLC. Línea sólida, 2 mg de  $F_{1I}$ , a un flujo de 1 ml/ml, Mes-Tris 50 mM pH 6.8. Línea punteada, perfil de los estándares de peso molecular correspondientes a los mencionados en la figura 5. Línea sólida, perfil del complejo  $F_{1I}$  de Sepharosa-hexilamonio: 1, primer hombro, 2,  $F_{1I}$ , 3, segundo hombro, 4 y 5, contaminación.

Usando un gel "slab", y la técnica de Tricine SDS-PAGE (sección 2.8, figura 8), la cual permite cargar más proteína al gel sin perder resolución a altos pesos moleculares se observa que el primer pico (2, figura 7) así como sus hombros (1 y 3, figura 7) contienen componentes característicos de la F<sub>1</sub>I pero solo el pico 2 los tiene todos.

El "valle" (4) contiene varios componentes, además que parece tener un componente que corresponde al peso de la subunidad β.

EL pico 5 posee también muchos componentes y el que parece ser la subunidad β es más conspicuo.

En la figura 8 se muestran los perfiles de la F<sub>1</sub>, F<sub>1</sub>I purificada por Sepharosa hexilamónio y la F<sub>1</sub>I purificada por Superdex 200. Al comparar las purificaciones de F<sub>1</sub>I se observa que existen dos componentes de bajo peso molecular aparente presentes en la purificación obtenida de la primera columna pero ausentes en la purificación obtenida de la segunda.

En la figura 9 se muestran geles nativos en los que se corrió F<sub>1</sub>, F<sub>1</sub>I purificada hasta el paso de la columna de Sepharosa-hexilamónio y F<sub>1</sub>I purificada hasta el paso de la columna de Superdex 200. En ésta figura se ve que el paso de purificación en FPLC enriquece de la banda del complejo F<sub>1</sub>I además de que elimina dos bandas de bajo peso molecular.

La tabla 4 agrupa los datos de las fracciones en términos del volumen, proteína total así como rendimiento en los diferentes pasos de purificación descrita en la figura 4. Resalta la caída dramática del rendimiento, en la última columna.

Más significativos son los datos de la tabla 5, que muestra las actividades específicas de tiempo cero de estos mismos pasos así como las actividades específicas de estos pasos



después de incubar a dos tiempos diferentes en 40° C y pH 8.0 condiciones que remueven la inhibición de la actividad de ATPasa de la IF<sub>1</sub> sobre la F<sub>1</sub>.

Para visualizar claramente las diferencias entre las actividades iniciales las actividades a 3 y 7 horas, de cada una de las fracciones, en la tabla 5 se muestra el cociente de activación. El primer cociente, de la actividad a 3 horas entre la actividad inicial, es muy similar para las tres primeras fracciones pero muestra un incremento de cerca de 4 veces en la última fracción. El segundo cociente, de la actividad de 7 horas entre la actividad inicial, también muestra este incremento.

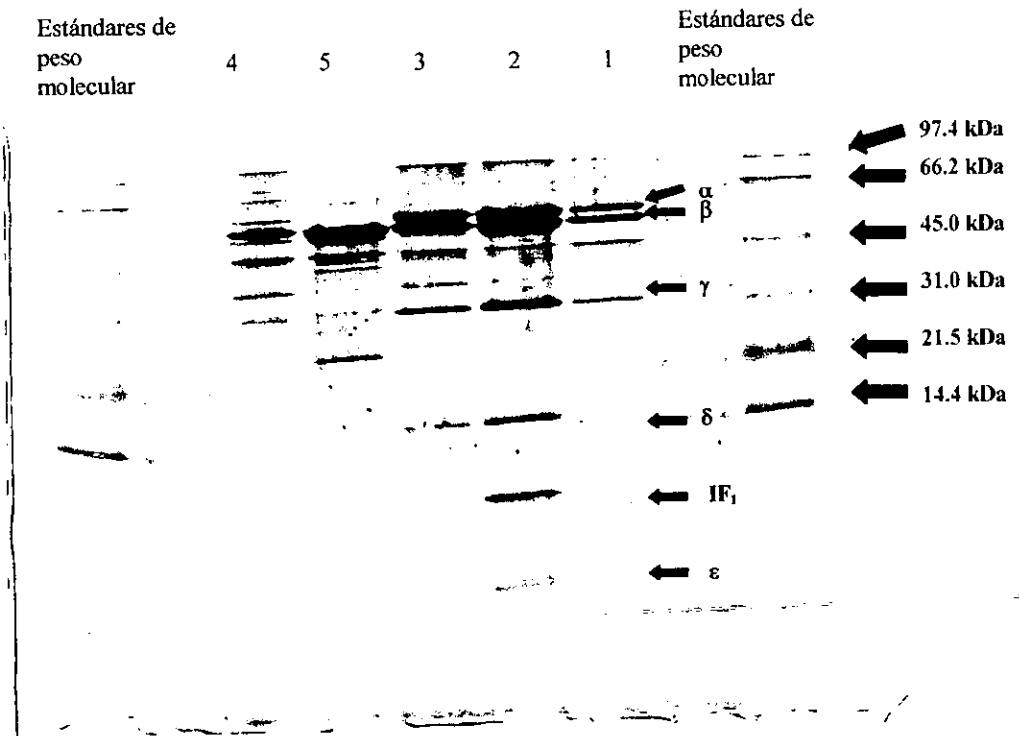


Figura 8. Tricine SDS-PAGE. Los números sobre los carriles corresponden a los

picos y hombros del perfil de elución de la  $F_1I$  que se muestra en la figura 7. El carril 2 es el único que muestra todas las subunidades del complejo  $F_1I$ . A ambos extremos, derecho e izquierdo, se muestran los estándares de peso molecular.

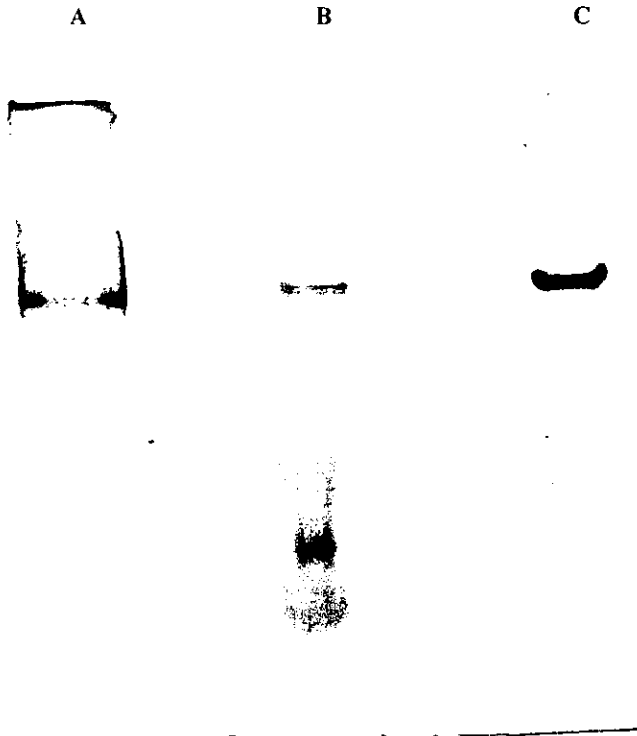


Figura 9 Gel azul nativo (sección 2.11). El carril A muestra el patrón de la electroforesis en condiciones nativas de la  $F_1I$ , en el carril B se muestra el patrón de la  $F_1I$  purificada en la columna de Sepharosa hexilamonio, mientras que el carril C muestra la  $F_1I$  purificada por la columna de Superdex 200 de FPLC. Todos los carriles se corrieron utilizando 25  $\mu\text{g}$  de proteína.

**Tabla 4 Rendimientos de la purificación de F<sub>1</sub>I**

Fracción	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Rendimiento %
SMP-MgATP	29	290	100
SN sonicación	42	18.9	6.5
Columna Sepharosa-hexil-amonio	0.58	6.3	2.2
FPLC Superdex 200	0.8	0.4	0.14

**Tabla 5 Actividades específicas y cocientes de activación.**

Fracción	Actividad inicial, T <sub>0</sub>	Actividad <sup>a</sup> a 3 horas	3h/T <sub>0</sub>	Actividad <sup>a</sup> a 7.5 horas	7h/T <sub>0</sub>
SMP-MgATP	0.48	5.81	12	4.74	10
SN sonicación	1.43	14.3	10	42.9	30
Columna Sepharosa-hexil-amonio	3.53	48.1	14	72.6	21
FPLC Superdex 200	0.66	53	80	54.6	83

\* Actividad específica,  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

Parámetros de pureza de las diferentes fracciones obtenidas durante el protocolo de purificación de la F<sub>1</sub>I. Las actividades 3h/T<sub>0</sub> y 7h/T<sub>0</sub>. Representan el cociente entre las actividades después de tres y siete horas de activación y la actividad inicial, T<sub>0</sub>.

**b) Algunas propiedades cinéticas del complejo  $F_1I$  en el paso de Sepharosa hexilamonio.**

La figura 10 muestra la curva de activación de la  $F_1I$  endógena purificada por la columna de Sepharosa hexilamonio: La enzima alcanza una actividad máxima de  $\sim 70 \mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  a las tres horas. Esta actividad es muy cercana a las máximas activaciones reportadas de hasta  $80 \mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ .

En la figura 11 se muestran las actividades en condiciones unisitio para la  $F_1$  y la  $F_1I$  endógena. La curva correspondiente a  $F_1$  en presencia de 1 mM de azida es superponible a la curva de la  $F_1$  en ausencia de azida. Sin embargo, para la  $F_1I$  que exhibe un porcentaje de hidrólisis de ATP del 80% (porcentaje de ATP hidrolizado del total presente en el ensayo) en ausencia de azida, en presencia de azida este porcentaje es de sólo el 30%. Claramente, en condiciones unisitio la preparación de  $F_1I$  en ausencia de azida presenta actividad multisitio. El cloruro de guanidina, en concentraciones subdesnaturalizantes, ha sido reportado como inhibidor de la actividad multisitio pero no de la unisitio. La figura 12A muestra el efecto de la concentración de guanidina sobre la actividad de hidrólisis de ATP en la  $F_1$  en condiciones multisitio. A 50 mM de cloruro de guanidina la actividad multisitio es nula. En condiciones unisitio, la  $F_1I$  en presencia de 50 mM de cloruro de guanidina tiene una actividad de hidrólisis del ATP menor, confirmando la actividad multisitio residual antes mencionada. La máxima hidrólisis de ATP en presencia de cloruro de guanidina es de 45%.

En la figura 13 se muestra el efecto de la ambos inhibidores sobre la hidrólisis en

condiciones unisito, en presencia de ambos la hidrólisis máxima es de 20 %, mostrando un efecto aditivo de ambos inhibidores sobre la actividad hidrolítica de la enzima.

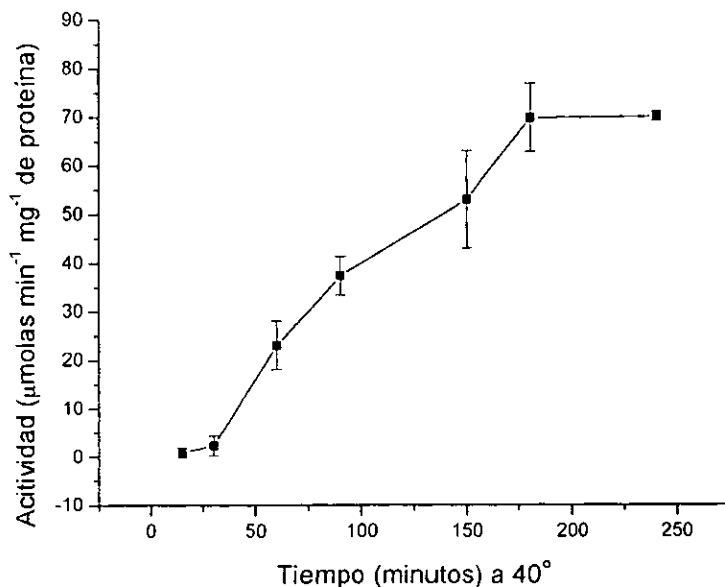


Figura 10. Curva de activación de la F<sub>1</sub>I endógena (sección 2.4). Se utilizó la F<sub>1</sub>I endógena purificada hasta el paso de la columna de Sepharosa hexilamonio. La incubación se realizó a 40 °. La actividad se siguió por la desaparición de NADH a 340 nm con un ensayo acoplado. Las barras representan la desviación estándar de 3 experimentos.

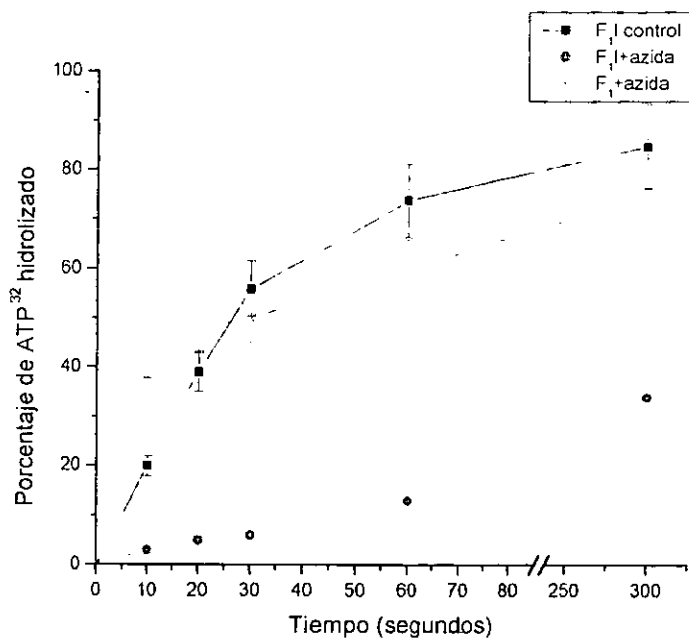


Figura 11. Actividad de hidrólisis de ATP en condiciones unisito (sección 2.13) La actividad para la F<sub>1</sub> en presencia de azida (cruces) se sobrepone a la actividad de la F<sub>1</sub> en ausencia de azida. La actividad de ATPasa de la F<sub>1</sub>I endógena en ausencia (cuadros) y presencia (círculos) de azida. Las barras representan la desviación estándar de 3 experimentos.

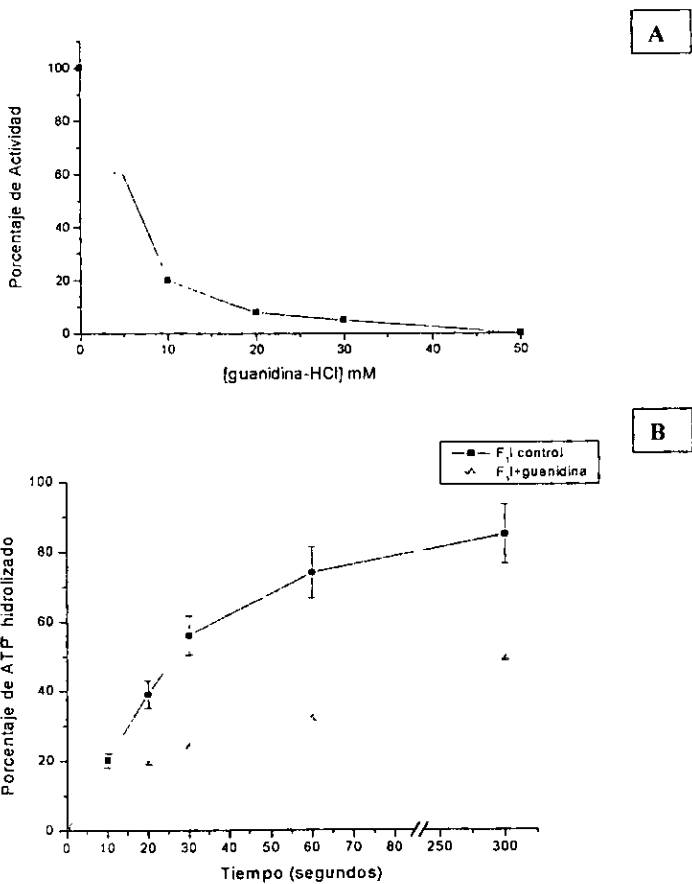


Figura 12. Efecto del cloruro de guanidina sobre la actividad de hidrólisis multisubstrato de ATP de la F<sub>1</sub> (A) y sobre la actividad de hidrólisis de ATP en condiciones unisubstrato de la F<sub>1</sub>I (B). (A) La actividad inicial fue de 37  $\mu\text{moles min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína. La F<sub>1</sub> y la guanidina se incubaron juntas 5 minutos y la actividad se determinó durante 5 minutos. Se realizó un control donde en las mismas condiciones las enzimas acoplantes no son afectadas en su actividad. (B) F<sub>1</sub>I en ausencia (cuadros) y en presencia (triángulos) de cloruro de guanidina (50 mM). Las barras representan la desviación estándar de 3 experimentos.

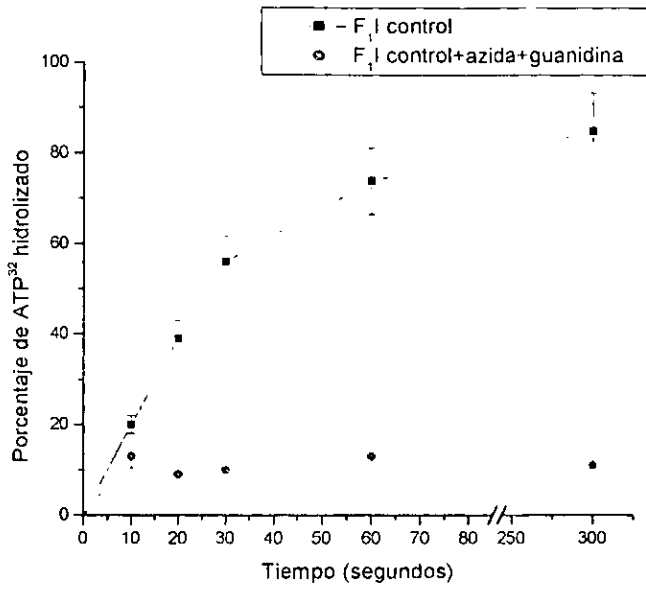


Figura 13. Actividad de hidrólisis de ATP en condiciones unisito en presencia ó ausencia de cloruro de guanidina y azida (sección 2.13). La actividad se determinó en ausencia de cloruro de guanidina y azida (cuadros) y en presencia de 25 mM de azida de sodio y 50 mM de cloruro de guanidina (círculos). Las barras representan la desviación estándar de 3 experimentos.



### 3.2 Entrecruzamiento de la IF<sub>1</sub> con el sector F<sub>1</sub> en el complejo endógeno F<sub>1</sub>I.

Dadas las dificultades en obtener una preparación de IF<sub>1</sub>-F<sub>1</sub> estable que permita caracterizar funcionalmente un complejo F<sub>1</sub>I en solución se decidió obtener un complejo donde la proteína inhibidora no se disocie del complejo F<sub>1</sub>. Se utilizó una metodología que involucra la formación de un enlace covalente entre la IF<sub>1</sub> y el sector F<sub>1</sub> (sección 1.1.3). El entrecruzamiento utilizando el EEDQ produce un enlace covalente final que no involucra más que átomos de las proteínas. El entrecruzamiento se realizó como se describe en la sección 2.1.1, utilizando EEDQ (sección 1.1.3) en condiciones de catálisis multisitio y de pH ácido que se sabe favorecen la asociación de la IF<sub>1</sub> y el sector F<sub>1</sub>. La IF<sub>1</sub> ha sido entrecruzada con anterioridad con ciertas modificaciones con los complejos F<sub>1</sub>I de levadura, de bovino y de rata, a una subunidad β por lo que el producto esperado de entrecruzamiento debe pesar cerca de 62 kDa. En nuestro caso la reacción de entrecruzamiento se detuvo con el uso de una columna de Penefsky, en la que además de retirar los solutos de bajo peso molecular la muestra se eluyó en medio unisitio (sección 2.1.2), para poder medir catálisis después del entrecruzamiento. En la figura 14 se puede apreciar el patrón electroforético en SDS de un gel de poliácridamida (Tricine SDS-PAGE, sección 2.7) donde se muestra el complejo entrecruzado, el no entrecruzado y la proteína inhibidora pura. La proteína entrecruzada mostró un patrón idéntico a la no entrecruzada aunque se observó disminución en las bandas de varias subunidades, esta se dio de manera

importante en la de la IF<sub>1</sub>. De igual manera apareció una banda poco definida de alto peso molecular (~ 62 kDa) equivalente al complejo β-IF<sub>1</sub>.

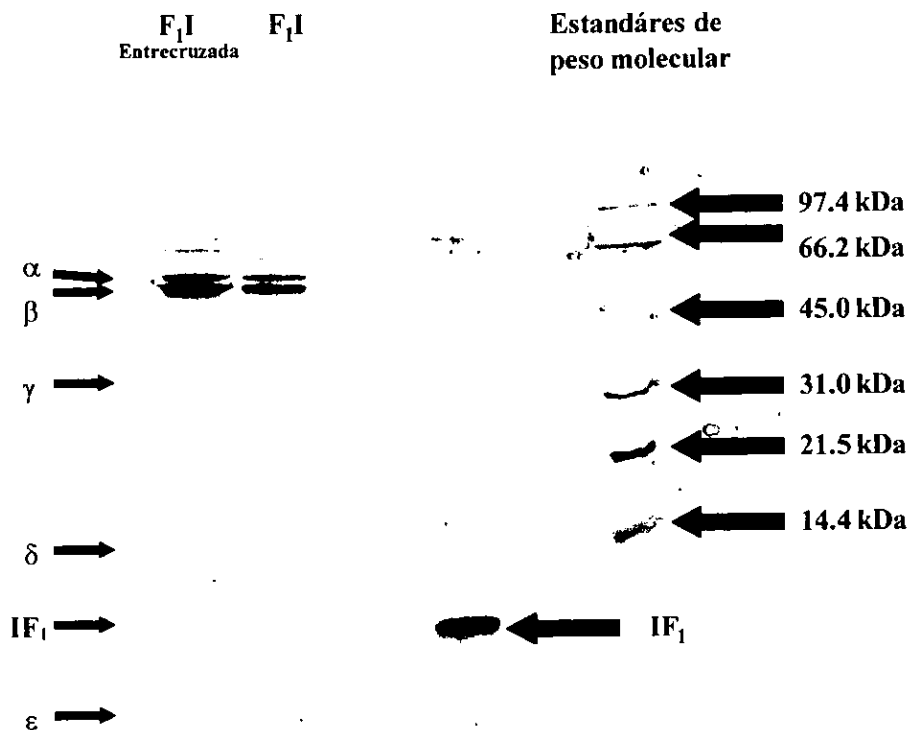


Figura 14. Tricine SDS-PAGE (sección 2.7) de la F<sub>1</sub>I endógena, de la F<sub>1</sub>I endógena entrecruzada y de la IF<sub>1</sub> pura. A la izquierda se muestran los estándares de peso molecular.

### 3.3 Identificación del producto de entrecruzamiento.

Una manera de identificar a las subunidades involucradas en el entrecruzamiento es utilizando anticuerpos específicos para las subunidades implicadas en el complejo,  $\beta$  e  $IF_1$ . La figura 15 muestra un inmunoblot de  $IF_1$  pura revelado con anti- $IF_1$ , la cual se revela como una banda discreta (A). Se observó que el anticuerpo contra  $IF_1$  reconoce a la  $IF_1$  en el complejo  $F_1I$ .

En la figura 16 se muestra un inmunoblot utilizando los mismos anticuerpos contra la  $F_1I$  pero ésta purificada por FPLC tanto control como entrecruzada con EEDQ. El anticuerpo contra  $IF_1$  (B) en el carril de la  $F_1I$  entrecruzada da reacción con una banda de peso molecular aproximado de 62 kDa así como con una banda que no entra en el gel y que probablemente sea proteína precipitada. En el control (A) no aparece esa banda. La  $F_1I$  control y entrecruzada se reveló con el anticuerpo contra  $\beta$ , a la dilución usada (1:100) da reacción contra  $\alpha$  y  $\beta$ , pero no contra la banda entrecruzada, la cual es visible en el gel control (E).

Se trató de identificar la subunidad  $\beta$  en la banda de 66 kDa con anticuerpos para subunidades  $\beta$  de otros organismos, como *E. coli* y *Polytomella spp.* Los resultados se observan en las figuras 17 y 18, en la primera (Figura 17) se muestra la reacción del anticuerpo contra  $\beta$  de *E. coli* sobre la  $\beta$  de bovino con la  $F_1I$  control y entrecruzada (A), a la izquierda se muestra el gel control con la  $F_1I$  (B). Este anticuerpo tampoco dió señal de la banda entrecruzada. El anticuerpo contra  $\beta$  de *Polytomella* (Figura 18) da señal a un título

menor que el anticuerpo contra  $\beta$  de bovino, como se observa en la figura 18 (A, B y C), todos los anticuerpos dan reacción para la misma banda que identifica a la subunidad  $\beta$  en la F<sub>1</sub>I control, pero ninguno da señal de la banda entrecruzada. Cabe resaltar que al título usado para el anticuerpo contra  $\beta$  de bovino no dio reacción cruzada contra  $\alpha$ .

De estos datos es posible concluir que en la F<sub>1</sub>I entrecruzada aparece una banda de 62 kDa que tiene el peso molecular del complejo  $\beta$ -IF<sub>1</sub>, que contiene a la IF<sub>1</sub> identificada por anticuerpos y que no es reconocida por los anticuerpos contra  $\beta$  homólogos, anti- $\beta$  de *E. coli* y anti- $\beta$  de *Polytomella spp.*, pero sí reconocen a la  $\beta$  en la enzima F<sub>1</sub>I control. Esto podría indicar que los epítopes que reconocen la subunidad  $\beta$  en la F<sub>1</sub>I se ocultan cuando se forma el complejo  $\beta$ -IF<sub>1</sub>.

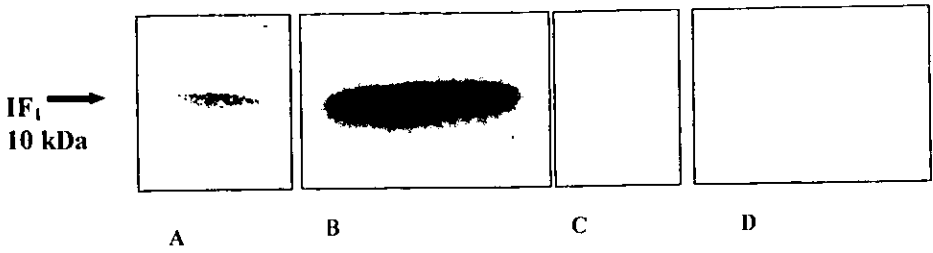


Figura 15. Inmunoblot utilizando anticuerpos contra IF<sub>1</sub>. Se utilizó IF<sub>1</sub> pura transferida de un gel de poliacrilamida (B) a una membrana donde se reveló con un anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (A). También se utilizó F<sub>1</sub>I (D) transferida y revelada de igual manera (C).

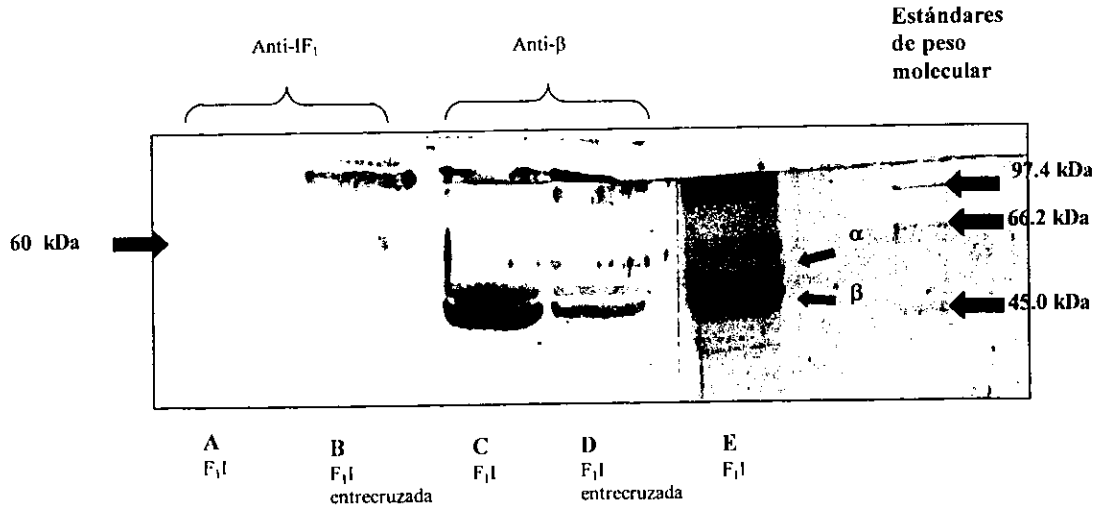


Figura 16. Inmunoblot de F<sub>1</sub>I endógena y entrecruzada utilizando anticuerpos contra IF<sub>1</sub> y contra β. Se utilizó F<sub>1</sub>I endógena purificada por una columna de Superdex 200 de FPLC. F<sub>1</sub>I endógena (A y C) y F<sub>1</sub>I entrecruzada (B y D) fueron transferidos de un gel de poliacrilamida, tratados con anti IF<sub>1</sub> (A y B) ó con anti-β (C y D) y revelados con un anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina. (E) Electroforesis en gel de F<sub>1</sub>I endógena.

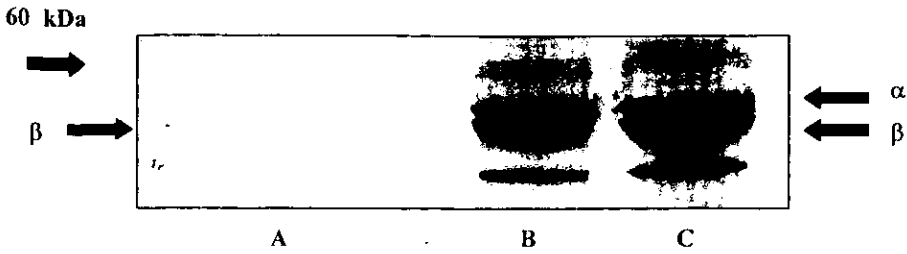


Figura 17. Inmunoblot de F<sub>1</sub>I entrecruzada usando anticuerpos contra-β de *E. coli*. F<sub>1</sub>I entrecruzada (B) se transfirió de un gel de poliacrilamida, se trató con anti-β y se reveló con anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina (A). F<sub>1</sub>I endógena purificada por la columna de Sepharosa hexilamino(C) de la que se partió para entrecruzar.

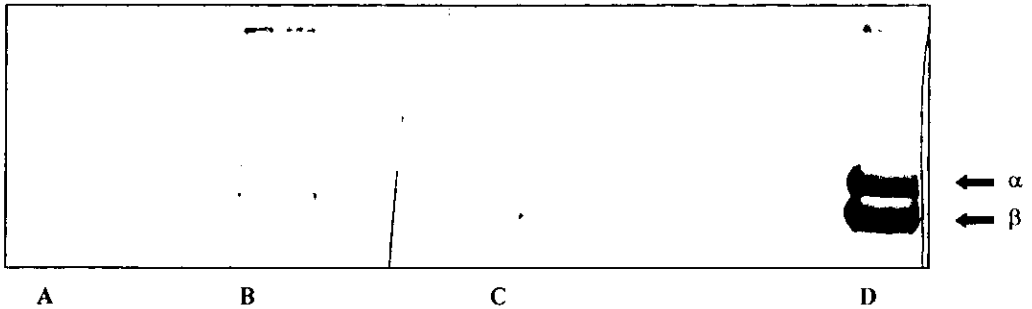


Figura 18 Inmunoblot de F<sub>1</sub>I endógena y entrecruzada utilizando anticuerpos contra β de *B. taurus* y contra β de *Polytomella spp.* F<sub>1</sub>I endógena (A y C) purificada por la columna de Sepharosa hexilamónio y F<sub>1</sub>I entrecruzada (B) se trataron con anticuerpos contra β de *B. taurus* (A y B) ó con anticuerpos contra β de *Polytomella spp.* (C). F<sub>1</sub>I endógena.

### 3.4 Propiedades cinéticas del complejo F<sub>1</sub>I entrecruzado.

En la Figura 19 se ilustra la curva de activación de la F<sub>1</sub>I entrecruzada en condiciones multisitio y muestra que, a diferencia de la F<sub>1</sub>I endógena control, la enzima entrecruzada no se activa gradualmente durante el tiempo de la activación. La actividad a lo largo de la determinación no fue cero, sino que osciló entre 0.6 y 1.5  $\mu\text{molas min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . En condiciones unisitio (figura 20) la F<sub>1</sub>I entrecruzada muestra una hidrólisis máxima de casi 50%, menor que el 80% que muestra el control (F<sub>1</sub>I endógena, figura 13) pero muy semejante a la de la F<sub>1</sub>I control en presencia de 50 mM de cloruro de guanidina (figura 12B). Esta enzima entrecruzada también posee actividad multisitio residual; además tanto la F<sub>1</sub>I y la F<sub>1</sub>I entrecruzada, en presencia de azida y cloruro de guanidina, tienen la misma actividad máxima unisitio (~12 % de ATP hidrolizado).

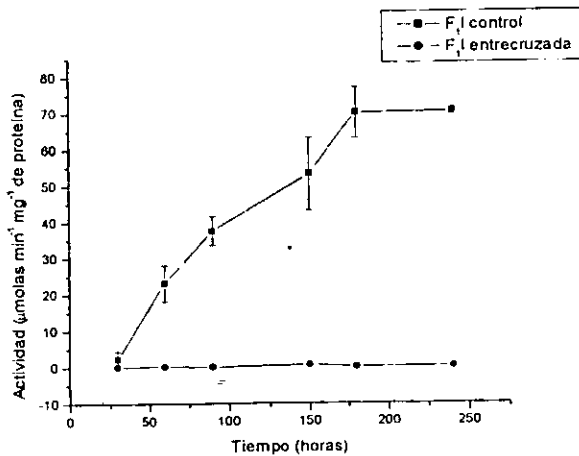


Figura 19. Perfiles de activación de la F<sub>1</sub>I endógena y la F<sub>1</sub>I entrecruzada. La actividad se determinó como se indica en la sección 2.4. Desviación estándar de 3 experimentos.

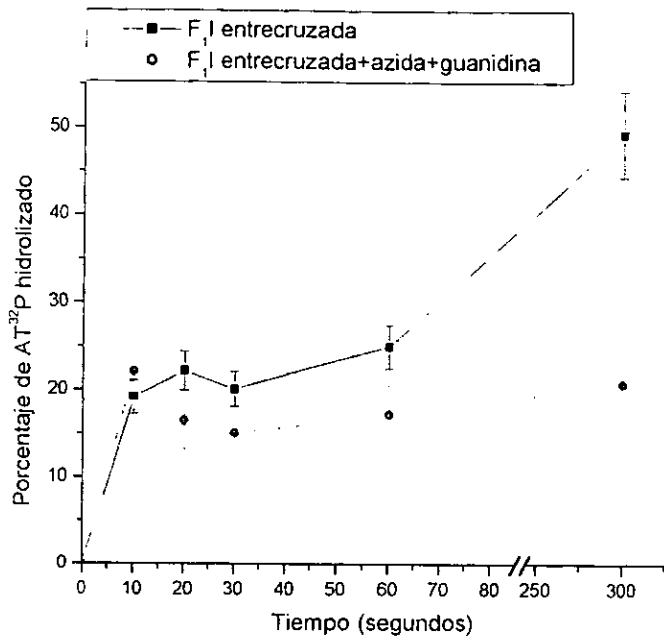


Figura 20. Actividad de hidrólisis de ATP en condiciones unisito de la F<sub>1</sub>I entrecruzada. La actividad se determinó como se indica en la sección 2.13, para la F<sub>1</sub>I entrecruzada, así como para la F<sub>1</sub>I entrecruzada en presencia de 25 mM de azida y 50 mM de guanidina. Las barras respresentan la desviación estándar de 3 experimentos.



#### 4. Discusión.

El complejo enzimático  $F_1$  ha sido muy utilizado para determinar las propiedades catalíticas del complejo  $F_0F_1$  sintasa. A diferencia de los complejos  $F_1$  de procariontes, los de mitocondrias de organismos superiores poseen subunidades supernumerarias cuyas funciones no se conocen con detalle. La proteína inhibidora ( $IF_1$ ) es una de ellas.

Dada la incertidumbre de los resultados obtenidos con complejos  $F_1I$  reconstituidos se abordaron dos estrategias para caracterizar el complejo  $F_1I$  endógeno:

Mejorar la purificación del complejo  $F_1I$  endógeno.

Unir covalentemente la  $IF_1$  al complejo  $F_1$ , utilizando el complejo  $F_1I$  endógeno.

La primera estrategia está enfocada a la obtención de un complejo  $F_1I$  libre de contaminantes, como lo son la  $F_1$  que se genera al disociarse el complejo  $F_1I$ . Esto se llevó a cabo agregando a la purificación previamente reportada un paso de filtración en gel en una columna de FPLC.

Los perfiles de elución muestran claramente que la muestra obtenida con el método anterior es heterogénea. El complejo  $F_1$  y el  $F_1I$  sólo se diferencian en 10 kDa de peso molecular. El análisis en un gel desnaturizante de poliacrilamida de las fracciones de dicha columna indica que la muestra es separada en complejos derivados de la  $F_1I$  que difieren en las subunidades que los conforman. Sin embargo, esto es difícil de cuantificar debido a que no fue posible utilizar iguales concentraciones de proteína para cada fracción.

Otro de los contaminantes que fue separado por el nuevo paso de purificación fue lo que parece ser la subunidad  $\beta$ , pues el peso molecular interpolado con los estándares de la columna de FPLC es de poco más de 44 kDa. Dicha subunidad ha sido reportada como la más lábil dentro del complejo

Los resultados, en términos de actividad, muestra que el complejo  $F_1I$  obtenido gracias a la filtración en FPLC tiene una proporción entre la actividad a 7 horas contra la actividad inicial cuatro veces mayor que cualquier otra de las fracciones de los pasos anteriores de la purificación. De igual manera sucede con la proporción entre 3 horas y la actividad inicial. Estas diferencias pueden deberse a que en la preparación obtenida de la columna de Sepharosa hexilamonio existe un población de  $F_1I$  contaminada con  $F_1$ , mientras que la preparación obtenida de la columna de Superdex 200 la  $F_1I$  se encuentra enriquecida y libre de  $F_1$ .

Debido a que la técnica se estandarizó utilizando una columna de FPLC de tipo analítico, el rendimiento de éste paso de purificación es muy bajo. Por ello se usó la preparación de la columna de Sepharosa hexilamonio en los demás experimentos. Esta preparación tiene una curva de activación y una actividad de hidrólisis máxima semejantes a las reportadas previamente. La hidrólisis unisito, aunque parece un poco mayor que la del complejo  $F_1$ , en realidad tiene un componente importante de actividad multisito, como lo muestran las diferencias entre la actividad en presencia y ausencia de azida (o guanidina). Por los resultados de la purificación reportada en este trabajo, se sabe que esta preparación contiene más de un componente con actividad de hidrólisis de ATP. Por ello es difícil

asignar la actividad multisito remanente a la  $F_1I$  o a la posible contaminación de  $F_1$ .

Para resolver esta dificultad, se empleó la estrategia de unir covalentemente la  $IF_1$  al complejo  $F_1$ . Aunque el método empleado fue derivado de otros reportados previamente, los resultados no son concluyentes. La electroforesis de la  $F_1I$  entrecruzada muestra la aparición de una banda, posiblemente de los productos de entrecruzamiento, no muy definida. Su peso está en un intervalo de 60 a 66 kDa. Los entrecruzamientos reportados con anterioridad mostraban que el producto de entrecruzamiento involucra a la subunidad  $\beta$  y la  $IF_1$ . Utilizando anticuerpos contra estas subunidades, se determinó que mientras que la  $IF_1$  sí se localizaba en esta nueva banda, no se pudo identificar a la subunidad  $\beta$  como el otro componente de dicho entrecruzamiento.

Por otra parte, el entrecruzamiento previene la activación característica de la  $F_1I$  en condiciones multisito, manteniendo la actividad de la  $F_1I$  entrecruzada en un intervalo semejante a la actividad de tiempo cero de la  $F_1I$ . En condiciones unisito, tanto la  $F_1I$  como la  $F_1I$  entrecruzada, tienen la misma actividad unisito en presencia de los dos inhibidores químicos de la actividad multisito. Esto indica que el efecto del EEDQ no es una derivatización inespecífica.

Sin embargo, para elucidar el mecanismo por el que la  $IF_1$  inhibe la actividad de hidrólisis de ATP de la  $F_1$  en este complejo entrecruzado, se deben identificar todos los componentes involucrados directamente en el entrecruzamiento.

## ***I. Conclusiones.***

1. La adición de un paso de purificación al protocolo de la  $F_1I$ , que consiste en el paso de la enzima por una columna de FPLC con límite de exclusión de  $1.3 \times 10^6$ , aumenta la proporción de complejo  $F_1I$  referido al cociente de su actividad después de 7.5 horas de activación contra el  $T_0$ .
2. El entrecruzamiento del complejo  $F_1I$  con EEDQ, inhibe la activación del complejo  $F_1I$  en condiciones de catálisis multisitio y reduce la catálisis multisitio observable en condiciones unisitio.
3. Al menos uno de los componentes del producto del entrecruzamiento ha sido identificado como  $IF_1$ . Por el peso molecular de este producto se infiere que el otro componente debe ser la subunidad  $\beta$ .
4. El enriquecimiento del complejo  $F_1I$  purificado por el método descrito anteriormente, así como la técnica de entrecruzamiento hacen del complejo  $F_1I$  entrecruzado un modelo útil para la determinación de las interacciones entre la proteína inhibidora y el complejo  $F_1$  y entre la subunidad con la que entrecruza.

## ***II. Perspectivas:***

Escalar la purificación de la F<sub>1</sub>I mediante FPLC, para incrementar su rendimiento.

Determinar el sitio de entrecruzamiento entre la subunidad  $\beta$  y la proteína inhibidora, para definir su sitio de interacción.

Determinar las características estructurales del complejo F<sub>1</sub>I entrecruzado mediante Dicroísmo Circular y Fluorescencia para contrastar dichas características con las del complejo F<sub>1</sub>.

## 5 Glosario:

ATP $\gamma$ <sup>32</sup>P Adenosin trifosfato cuyo fosfato  $\gamma$  es el isotopo <sup>32</sup>P.

BCA Ácido bicinconínico (Bicinchoninic acid).

BCIP 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato.

Bis-Tris Bis(2-hidroxietil)imino-tris(hidroximetil)metano.

BSA Albumina de suero bovino (Bovine Serum Albumin).

Clustal W. Programa para alinear multiples secuencias de proteínas o DNA.<sup>87</sup>

DCCD. Diciclohexilcarbodiimida.

DELSEED. Secuencia conservada en las subunidades  $\beta$ , que en *B. Taurus* comprende del residuo 394 al 400.

DMF Dimetilformamida.

DOC Deoxicolato.

EDTA Ácido tetracético etilendiamina.

EEDQ N-ethoxycarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina.

F<sub>1</sub>I Complejo enzimático formado por la F<sub>1</sub> y la IF<sub>1</sub>; equivalente a F<sub>1</sub>-IF<sub>1</sub>.

FPLC Cromatografía líquida rápida de proteínas (Fast Protein Liquid Chromatography).

Histéresis Fenómeno en el que una enzima responde lentamente, en términos cinéticos, a cambios en la concentración de ligando.

IF<sub>1</sub> Proteína inhibidora.

k<sub>cat</sub> Constante catalítica.

K<sub>m</sub> Concentración de sustrato a la que una enzima dada alcanza la mitad de su V<sub>max</sub>

LDH Deshidrogenasa lactica.

MES Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

## 6. Referencias.

1. Foster, D. L. y Fillingame, R. H. (1982) Stoichiometry of subunits in the  $H^+$ -ATPase complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 257, 2009-2015.
2. Abrahams, J.P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., Walker, J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of  $F_1$ -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621-628.
3. Shirakihara, Y., Leslie, A. G., Abrahams, J. P., Walker, J. E., Ueda, T., Sekimoto, Y., Kambara, M., Saika, K., Kagawa, Y. (1997) The crystal structure of the nucleotide-free  $\alpha, \beta$  subcomplex of  $F_1$ -ATPase from the thermophilic *Bacillus PS3* is a asymmetric trimer. *Structure (London)* 5, 825-836.
4. Hausrath, A.C., Gruber, G., Matthew, B.W., and Capaldi, R. A. (1999) Structural features of the gamma subunit of the *Escherichia coli*  $F_1$  ATPase revealed by a 4.4 Å resolution map obtained by X-Ray crystallography *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96, 13697-13702.
5. Girvin, M. E., Rastogi, V. K., Abildgaard, F., Markley, J. L., Fillingame, R. H. (1998) Solution Structure of the transmembrane  $H^+$ -transporting subunit C of the  $F_1F_0$  ATP synthase. *Biochemistry* 37, 8817-8824.
6. Wilkens, S., Dunn, S. D., Chandler, Dahlquist, F. W., Capaldi, R. A. (1997) Solution structure of the N-terminal domain of the  $\delta$  subunit of the *E. Coli* ATPsynthase. *Nat. Struct. Biol.* 4, 198-201.
7. Schulenberg, B., Capaldi, R. A. (1999) The  $\epsilon$  subunit of the  $F_1F_0$  complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274, 28351-28355.
8. Stock, D., Leslie, A. G. W., Braig, K., Walker, J. E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286, 1700-1705.
9. Bianchet, M. A., Hüllihen, J., Pedersen, P. L., Amzel, L. M. (1998) The 2.8 Å structure of the rat liver  $F_1$ -ATPase: Configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 11065-11070.
10. Karrasch, S., Walker, J. E. (1999) Novel features in the structure of bovine ATP synthase *J. Mol. Biol.* 290, 379-384
11. Böttcher, B., Bertsche, I., Reuter, R., and Gräber, P. (2000) Direct visualisation of conformational changes in  $EF_1F_1$  by electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 296: 449-457.
12. Engelbrecht, S., and Junge, W. (1997) ATP synthase: a tentative structural model *FEBS Lett* 414, 485-491.
13. Elston, T., Wang, H., and Oster, G. (1998) Energy transduction in ATP synthase.

MOPS 3-(N-morfolino)propansulfónico.

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  Carbonato de sodio.

NBT Azul nitro de tetrazolio.

OSCP Proteína que confiere sensibilidad a la oligomincina (Olygomycin sensitivity conferring protein).

PEP Fosfoenolpiruvato.

PK Piruvato cinasa.

POPOP 1,4-bis(5-fenil-2-oxazolil)-benceno; 2,2'-p-Fenileno-bis(5-feniloxasol).

PPO 2,5-difeniloxasol.

PSA Persulfato de amonio.

rpm Revoluciones por minuto.

SDS Dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (Sodiumdodecyl sulfate poliacrilamide gel electrophoresis).

SMP Partículas Submitocondriales (SubMitochondrial Particles).

TEMED N, N, N', N'-tetrametiletildiamina.

Tris Tris-(hidroximetil)aminometano

$V_{\max}$  Velocidad máxima, en condiciones de sustrato saturante, a la que una enzima cataliza una reacción.



*Nature* 391, 510-513.

14. Wang, H., and Oster, G. (1998) Energy transduction in the  $F_1$  motor of ATP synthase. *Nature* 396, 279-282.

15. Kaim, G., and Dimroth, P. (1999) ATP synthesis by F-type ATP synthase is obligatory dependent on the transmembrane voltage. *EMBO J.* 18, 4118-4127.

16. Cheprepanov, D. A., Mulikidjanian, A. Y., Junge, W. (1999) Transient accumulation of elastic energy in proton translocating ATP synthase. *FEBS Lett* 449, 1-6.

17. Pänke, O., and Rumberg, B. (1999) Kinetic modeling of rotatory  $CF_1F_1$ -ATP synthase: storage of elastic energy during energy transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 1412, 118-128.

18. Capaldi, R. A., Schulenberg, B., Murray, J., and Aggeler, R. (2000) Cross-linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the Escherichia coli ATP synthase. *J. Epx. Biol.* 203, 29-33

19. Altendorf, K., Staltz, W.-D., Greie, J.-C., and Deckers-Hebestreit, G. (2000) Structure and function of the  $F_0$  complex from Escherichia coli. *J. Epx. Biol.* 203, 19-28.

20. Dmitriev, O. Y., Jones, P. C., and Fillingame, R. H. (1999) Structure of the subunit c oligomer in the  $F_1F_0$ ATP synthase: Model derived from solution structure and cross-linking in the native enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96, 7785-7790.

21. Rastogi, V. K., Girvin, M. E. (1999) Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase. *Nature* 402, 263- 268.

22. Fillingame, R. H., Jiang, W. Dmitriev, O. Y. (2000) Coupling  $H^+$  transport to rotatory catalysis in F-type synthases: structure and organization of the transmembrane rotatory motor. *J. Epx. Biol.* 203, 9-17.

23. Weber, J. and Senior, A. E. (1997) Catalytic mechanism of  $F_1$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1319, 19-58.

24 Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem.* 66, 717-49.

25. Harris, D. A. (1989) Azide as a probe of co-operative interactions in the mitochondrial  $F_1$ -ATPase *Biochem. Biophys. Acta* 974, 156-162.

26. Pullman, M. E. & Monroy, G. C. (1963) A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase *J. Biol. Chem.* 238, 3762-3769.

27. Kalashnikova, T. Y., Milgrom, Y. M., and Postanogova, N. V. (1988) The complex of mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase with the natural inhibitor protein is unable to catalyze single-site ATP hydrolysis. *FEBS Lett* 230, 163-166.
28. Kato-Yamada, Y., Noji, H., Yasuda, R., Kinoshita, K., Yoshida, M. (1999) Direct observation of the rotation of ε subunit in the F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* 273, 19375-19377.
29. Noji, H., Häslner, K., Junge, W., Kinoshita, K., Yoshida, M., and Engelbrecht, S. (1999) Rotation of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase *Biochem. Biophys. Res. Com.* 260, 597-599.
30. Hisabori, T., Kondoh, A., Yoshida, M. (1999) The gamma subunit in chloroplast F(1)-ATPase can rotate in a unidirectional and counter-clockwise manner. *FEBS Lett.* 463, 35-8.
31. Sambongi Y, Iko Y, Tanabe M, Omote H, Iwamoto-Kihara A, Ueda I, Yanagida T, Wada Y, Futai M (1999) Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>): direct observation. *Science* 286, 1722-1724.
32. Kato-Yamada Y, Noji H, Yasuda R, Kinoshita K Jr, Yoshida M (1998) Direct observation of the rotation of epsilon subunit in F<sub>1</sub>-ATPase. *J Biol Chem* 273, 19375-19377
33. Noji H, Yasuda R, Yoshida M, Kinoshita K Jr (1997) Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* 386, 299-302.
34. Keit, G., Satre, M., Dianoux, A. C., and Vignais, P. V. (1980) Radiolabeling of natural adenosine triphosphatase inhibitor with phenyl (<sup>14</sup>C) isothiocyanate and study of its interaction with mitochondrial adenosine triphosphatase. Localization of binding sites and stoichiometry of binding. *Biochemistry* 19, 2919-2925.
35. Beltran, C., Gomez-Puyou, A., and Tuena de Gomez-Puyou, M. (1988) Binding of dicyclohexylcarbodiimide to a native F<sub>1</sub>-ATPase - Inhibitor protein complex isolated from bovine heart mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 152(2), 867-873.
36. Crinton, N. M., Hüllihen, J., Schwerzmann, K., and Pedersen, P. L. (1982) Proton-Adenosinetriphosphatase complex of rat liver mitochondria: effects of its inhibitory peptide on adenosine 5'-triphosphate hydrolytic and functional activities of the enzyme. *Biochemistry* 21, 1878-1885.
37. Yakov M. Milgrom (1991) When beef-heart mitochondria F<sub>1</sub>-ATPase is inhibited by IF1 a nucleotide is trapped in one of the catalytic sites. *Eur. J. Biochem.* 200, 789-795.
38. Van Raaij, M. J., Orriss, G. L., Montgomery, M. G., Runswick, M. J., Fearnley, I. M., Skeher, J. M., and Walker, J. E. (1996) The ATPase inhibitor protein from bovine heart

# ESTA TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

mitochondria: the minimal sequence. *Biochemistry* 35, 15618-15625.

39. Lebowitz, M. S., and Pedersen, L. P. (1993) Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex: cDNA cloning, sequence, overexpression, and secondary structure characterization of a functional protein inhibitor. *Arch. Biochem. Biophys* 301, 64-70.

40. Papa, S., Zanotti, F., Cocco, T., Perrucci, C., Candita, C., and Minuto, M. (1996) Identification of functional domains and critical residues in the adenosintriphosphatase inhibitor protein of mitochondrial  $F_1F_0$ ATP synthase. *Eur. J. Biochem* 240, 461-467.

41. Mimura, H., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Ichiwa, N. And Tagawa, K. (1993) Binding of intrinsic ATPase inhibitor to the interface between  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of  $F_1F_0$ ATPase upon de-energization of mitochondria. *J. Biochem.* 113, 350-354.

42. Shnizer, R., Van Heeke, G. Amaturro, D., Schuster, S. M. (1996) Hystidine 49 is necessary for the pH-dependent transition between active and inactive states of the bovine  $F_1$ -ATPase inhibitor protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1292, 241-248.

43. Laikind, P. K., Hill, F. C., and Allison, W. S. (1985) The use of [ $^3$ H] aniline to identify the essential carboxyl group in the bovine mitochondrial  $F_1$ -ATPase that reacts with 1-(ethoxycarbonyl)-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline. *Arch. Biochem. and Biophys.* 240 (2), 904-920.

44. Hashimoto, T. Yamamoto, Y. Toshida, Y., and Tagawa, K. (1995) Cleavage of bovine mitochondrial ATPase inhibitor with endopeptidases, and binding of the resulting peptides to the interface between the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of  $F_1$ ATPase. *J. Biochem.* 117, 641-647.

45. Sah, J. F., Kumar, C., and Mohanty, P. (1993) pH dependent conformational changes modulate functional activity of the mitochondrial ATPase inhibitor protein *Biochem. Biophys. Res. Comm* 194, 1521-1528.

46. Pachenko, M. V., and Vinogradov, A. D. (1985) Interaction between the mitochondrial ATP synthase and ATPase inhibitor protein. Active/inactive slow pH-dependent transitions of the inhibitor protein *FEBS Letters* 184, 226-230.

47. Guerrieri, F., Zanotti, F. Che, Y. W., Scarfó, R., and Papa, S. (1987) Inactivation of the mitochondrial ATPase inhibitor protein by chemical modification with diethylpyrocarboboate. *Biochem. Biophys. Acta* 892, 284-293.

48. Stout, J. S., Partridge, B. E., Diboern, D. A., Schuster, S. M. (1993) Peptides analogs of the beef heart mitochondrial  $F_1$ -ATPase inhibitor protein. *Biochemistry* 32, 7496-7502.

49. Van Heeke, G., Deforce, L., Schnizer, R. A., Shaw, R., Couton, J. M., Shaw, S., Song, P.-S., Schuster, S. M. (1993) Recombinant bovine heart mitochondrial  $F_1$ -ATPase inhibitor protein: Overproduction in *Escherichia coli*, purification and structural studies.

- Biochemistry* 32, 10140-10149.
50. Lebowitz, M. S., and Pedersen, P. L. (1996) Protein inhibitor of mitochondrial ATP synthase: Relationship of inhibitor structure to pH-dependent regulation. *Arch Biochem. Biophys.* 330, 342-354.
51. Guerrieri, F., Scareo, R., Zanotti, F., Wu Che, Y., and Papa, S. (1987) Regulatory role of the ATPase inhibitor protein on proton conduction by mitochondrial H<sup>+</sup>-ATPase complex. *FEBS Letters* 213, 67-72.
52. Wong, S. S. (1993) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking. CRC Press pp. 197, 239, 258.
53. Jackson, P. J., and Harris, D. A. (1986) Sites of protein-protein interaction on the mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase inhibitor protein. *Biochem. J.* 235, 577- 583.
54. Krull, K. W. and Schuster, S. M. (1981) Control of beef heart submitochondrial particle-catalyzed Pi→ATP exchange by nucleotides and the ATPase inhibitor protein. *J. Biol. Chem* 256, 6641-6645.
55. Di Pietro, A., Penin, F., Julliard, J. H., Godinot, C. And D. C. Gautheron. (1988) IF<sub>1</sub> inhibition of mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase is correlated to entrapment of four adenine- or guanine- nucleotides including at least one triphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 152, 1319-1325
56. Walker, J. E. (1994) The regulation of catalysis in ATP synthase. *Curr. Op. Struct. Biol.* 4, 912-918.
57. Solaini, G., Baracca, A., Gabellieri, E., and Lenaz, G. (1997) Modificaion of the mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase ε subunit. enhancement of the ATPase activity of the IF<sub>1</sub>-F<sub>1</sub> complex and IF<sub>1</sub>-binding dependence of the conformation of the ε subunit. *Biochem. J.* 327, 443-448.
58. Beltrán, C., de Gómez-Puyou, M. T., Gómez-Puyou, A., and Darszon, A. (1984) Release of inhibitory action of the natural ATPase inhibitor protein on the mitochondrial ATPase. *Eur. J. Biochem.* 144, 151-157.
59. Feinstein, D. L., and Moundrianakis, E. N. (1984) Response of adenosine triphosphatase activity of the soluble latent F<sub>1</sub> enzyme from beef-heart mitochondria to changes in Mg<sup>2+</sup> and H<sup>+</sup> concentrations. *J. Mol. Biol.* 259, 4230-4236.
60. Fornells, L. A. M. G., Guimaraes-Motta, H., Nehme, J. S., Martins, O. B., and Silva, J. L. (1998) Presssure Effects on the interaction between natural inhibitor protein and mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* 349, 304-312.

61. Sakamoto, J. and Tonomura, Y. (1983) Synthesis of enzyme-bound ATP by mitochondrial soluble  $F_1$ -ATPase in the presence of dimethylsulfoxide. *J. Biochem* 93, 1601-1614.
62. Krull, K. W., and Schuster, S. M. (1981) Kinetic studies of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase: Interaction of the inhibitor protein and adenosine triphosphate analogs. *Biochemistry* 20, 1592-1598.
63. Galante, Y. M., Wong, S.-Y., and Hafezi, Y. (1981) Mitochondrial adenosinetriphosphatase inhibitor protein: Reversible interaction with complex V (ATP synthetase complex). *Biochemistry* 20, 2671-2678.
64. Saad-Nehem, J., Bezerra, A. L., Fornells, L. A. M., Silva, J. L., and Meyer-Fernandes, J. R. A contribution of the mitochondrial adenosinetriphosphatase inhibitor protein to the thermal stability of the  $F_0F_1$ ATPase complex. (1997) *Z. Naturforsch* 52c, 459-465.
65. Hashimoto, T., Yoshida, Y., and Tawaga, K. (1987) Binding of 9K protein to  $F_1$ -ATPase: A counterpart ligand to the ATPase inhibitor. *J. Biochem.* 102, 685-692.
66. Hashimoto, T., Yoshida, Y., Tagawa, K. (1990) Regulatory proteins of  $F_0F_1$ -ATPase: Role of ATPase inhibitor. *J. Bionenerg. Biomem.* 22, 27-38.
67. Ichiwa, N., Yoshida, Y., Hashimoto, T. Ogasawara, N., Yoshikawa, H., Imamoto, F., and Tagawa, K. (1990) Activation of ATP hydrolysis by an uncoupler in mutant mitochondria lacking and intrinsic ATPase inhibitor in yeast. *J. Biol. Chem.* 265, 6274-6278.
68. Yoshida, Y., Sato, T., Hashimoto, F., Ichikawa, N., Nakai, S., Yoshikawa, H., Imamoto, F., and Tagawa, K. (1990) Isolation of a gene for a regulatory 15 kDa subunit of mitochondrial  $F_0F_1$ -ATPase and construction of mutant yeast lacking the protein. *Eur. J. Biochem.* 192, 49-53.
69. Ichikawa, N., Yoshida, Y., Hashimoto, T., and Tagawa, K. (1996) An intrinsic ATPase inhibitor binds near the active site of yeast mitochondria  $F_1$ -ATPase. *J. Biochem* 119, 192-199
70. Ichiwa, M., Yoshida, Y., Hashimoto, T., Ogasawara, N., Yoshikawa, H., Imamoto, F., and Tagawa, K. (1990) Activation of ATP hydrolysis by an uncoupler in mutant mitochondria lacking an intrinsic ATPase inhibitor in yeast *J. Biol. Chem.* 265, 6274-6278.
71. Claude, A. (1946) *J. Exp. Med.* 84, 51-89.
72. Low, H. y Vallin, I (1963) *Biochem. Biophys. Acta* 69, 361-374.
73. Luzikov, V. N. (1985) Mitochondrial Biogenesis and Breakdown Consultants Bureau.

New York and London.

74. Schagger, H., Cramer, W.A., von Jagow, G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. (1994) *Anal. Biochem.* 217, 220-230.
75. Schagger, H., von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 223-231.
76. Schagger, H., von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
77. Schagger, H., Aquila, H., von Jagow, G. (1988) Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis. *Anal. Biochem.* 173, 201-5.
78. Schagger, H., Cramer, W. A., von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 217, 220-230.
79. Schagger, H., von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199, 223-231.
80. Abrahams, J. P., Buchanan, S. K., van Raaij, M. J., Fearnley, I. F., Leslie, A. G. W., and Walker, J. E. (1996) The structure of bovine  $F_1$ -ATPase complexed with the peptide antibiotic efrapeptin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9429-9424.
81. van Raaij, M. J, Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., and Walker, J. E. (1996) The structure of bovine  $F_1$ -ATPase complexed with the antibiotic inhibitor aurovertin B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6913-6917.
82. Tommasino, M., Capaldi, R.A. (1985) Effect of dicyclohexylcarbodiimide on unisite and multisite of adenosinetriphosphatase of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 24, 3972-3976.
83. Tuena de Gómez-Puyou, M., Domínguez-Ramírez, L., Reyes-Vivas, H., and Gómez-Puyou, A. (2000) Structural alterations and inhibitions of unisite and multisite ATP hydrolysis in soluble mitochondrial  $F_1$  by guanidinium chloride. *Biochemistry* (sometido a publicación).
84. Vazquez-Laslop, N., Dreyfus, G. (1990) The native mitochondrial  $F_1$ -inhibitor

protein complex carries out uni-site and multisite ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 265, 19002-19006.

85. Jackson, P. J., and Harris, D. A. (1988) The mitochondrial ATP synthase inhibitor protein binds near the C-terminus of the F<sub>1</sub> β-subunit. *FEBS Lett.* 229, 224-228.

86. Horstman, L. L., and Racker, E. (1970) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation XXII. *J. Biol. Mol.* 245, 1336-1344.

87. Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Ac. Res.* 22:4673-4680.

88. Baubichon, H., Godinot, C., Di Pietro, and Gautheron, D.C (1981) Competition between ADP and nucleotide analogues to occupy regulatory site(s) related to hysteretic inhibition of mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 100: 1032-1038.

89 Di Pietro, A. Penin, F, Godinot, C, and Gautheron D.C. (1980) "Hysteretic" behavior and nucleotide binding sites of pig heart mitochondrial F<sub>1</sub> adenosine 5'-triphosphatase. *Biochemistry* 19: 5678-5671.