

03062



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

15
24

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y
DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

CARACTERIZACION FUNCIONAL DEL COMPLEJO
F₀F₁ INHIBIDOR ENDOGENO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
**MAESTRO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA**
P R E S E N T A :
EDGAR VAZQUEZ CONTRERAS

MEXICO, D. F.

MAYO DE 1995

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Georges Dreyfus Cortés, en el Depto. de Bioenergética, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A quienes lo son todo:

**Elizabeth
Josefina
Jano
Jesús
María Elena.**

Por una árida llanura, entre álamos marchitos, a solas, con su sombra y su locura, va el loco hablando a gritos.....

..... el loco vocífera a solas, con su sombra y su químera.....

..... no fue por una trágica amargura esta alma errante desgajada y rota. Purga un pecado ajeno, la cordura, la terrible cordura del idiota.

(A. Machado)

Tan loco como siempre y sin olvidar jamás que hay millones de de niños y mujeres que no tienen que comer.

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Al Dr. Georges Dreyfus, por tantos años de paciencia.

A los integrantes de mi comité tutorial: Dra. Marieta Tuena, Dr. Juan Pablo Pardo, Dr. Georges Dreyfus, por su atenta colaboración a mi trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Heliodoro Celis, Dr. Edmundo Chávez, Dr. Georges Dreyfus, Dr. Antonio Peña, Dra. Marieta Tuena, por la revisión y paciencia de este trabajo.

A los técnicos académicos: Jorge Ramírez, Teresa Ballado, Marcela Sosa, Jorge Sepúlveda y Rodolfo Paredes, por su incondicional colaboración, y sin quienes este trabajo no se hubiese realizado.

A los compañeros del laboratorio: Bertha González, Ernesto Maldonado, Teresa Ballado, Gerardo Pérez, Marcela Sosa, Mariana Peinbert, Eugenia Silva y Andrés Campos, por tanto tiempo juntos y tantas y tantas cosas.

A la Dra Federica Dabbeni-Sala, por las atenciones que me brindó para el trabajo en el departamento de farmacología de la universidad de Padova, Italia

A la unidad de cómputo: Gerardo, Ana, Juan, Rodrigo y Gerardito, por toda la lata.

A mi brother pre M. en C. Ariel González, no hay palabras, sólo actos.

A Jorge Ramírez, Alejandro Sosa, y Elena Hilario, por todo.

A Bertha y Ernie, por su gran amistad y comprensión.

A mi tía Rosa y a mi primo Orly, por su cariño.

Muy especialmente a Hilario y Leticia Zamudio, por su amistad.

Con un muy especial afecto a: Espe, Domy, Jeny, Lupita y Maru, por todas sus atenciones.

A Nora Cecilia Vázquez-Laslop y Silvia Devars, mis maestras.

A los camaradas: Ernie, José, Alejandro Fernández, Santiago, Pedro, Gerardo, Hilario, Héctor Ceceña y Charles Pollit, por tantos y tantos inolvidables momentos.

Con cariño a los doctores: Diego González, Gómez-Puyou, Tuena de Gómez-Puyou, Gómez-Lojero, Celis, Ruy Pérez-M. Irma, Georgina Garza, Lety. A Ember, Saavedra Lira, Isa, Miriam, Oscar, Horacio y Guillermo.

A mis amigos: Héctor Cabrera, Jorge Pedrajo y Sole; Manuel Romero; Francisco Hernández; Roberto y Julieta; Cuahuteemoc, Caro y Citlali; Alejandro Montes; Carlos, Claudia, Carlitos y Alfredo. Doña Josefina Cárdenas, Lalo, Germán y Daniel, por tantos momentos agradables.

A toda la gente del Freire y a en especial a las prácticas de campo.

..... al Saboo.

ABREVIATURAS

AMP	Adenosín 5'-difosfato.
AMP	Adenosín 5'-monofosfato.
ATP	Adenosín 5'-trifosfato.
ATPasa	Adenosin Trifosfatasa.
BSA	Albumina de suero de bovino.
cmp	cuentas por minuto.
$\Delta\mu_{H^+}$	Gradiente electroquímico de protones.
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida.
DL	Dehidrogenasa Láctica.
D.O.	Densidad Optica.
DTT	Ditiotreitól.
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético.
FCCP	<i>p</i> -trifluorometoxicarbonilcianurofenilhidrazona.
F ₁	Sector hidrofóbico y catalítico de la ATPsintasa/ATPasa.
F ₀	Sector hidrofóbico y canal iónico de la ATPsintasa/ATPasa.
F ₀ F ₁	ATPsintasa/ATPasa. ATPasa tipo F. En el caso de este trabajo, corresponde al complejo activo i.e. carente de la regulación del I.F ₁ .
F ₀ F ₁ -I	Complejo F ₀ F ₁ que contiene física y funcionalmente al péptido inhibidor.
F ₁ -I	Sector hidrofóbico y catalítico de la ATPsintasa/ATPasa con su inhibidor endógeno.
F _a	Subunidad del complejo ATPsintasa/ATPasa llamada Factor 6.
F _b	Subunidad del complejo ATPsintasa/ATPasa llamada Factor B.
IF ₁	Inhibidor natural de la ATPsintasa/ATPasa.
LDAO	Lauril dimetilamino óxido.
LM	<i>n</i> -Dodecil β -D- maltósido, Lauril Maltósido.
μ mol	Micro molas.
mg/ml	Miligramos por mililitro.
min	Minutos.
NADH	Nicotínamida Adenin Dinucleótido (reducido).
nm	Nanómetros.
P-ATPasa	ATPasa tipo E ₁ E ₂ .
PSM	Partículas Submitocondriales.
PEP	Fosfoenolpiruvato.
Pi	Fosfato inorgánico.
PK	Piruvato Cinasa.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecil sulfato de Sodio.
TCA	Acido tricloroacético.
TRIS	Tris (hidroximetil)aminometano.
TX100	Tritón X100.
V-ATPasa	ATPasa tipo vacuolar.

INDICE

INTRODUCCION.	1
<i>La estructura y composición de la ATPsintasa/ATPasa.</i>	1
<i>Generalidades.</i>	1
<i>Estructura cristalográfica de la F_1.</i>	3
<i>La polémica</i>	3
<i>Una posibilidad para explicar las diferencias: las condiciones de cristalización</i>	5
<i>Arreglo e interacción de las subunidades γ, δ y ϵ de la F_1.</i>	7
<i>Otros enfoques para conocer la estructura de la ATPsintasa/ATPasa</i>	10
<i>Cristalización de las subunidades de la F_1.</i>	10
<i>Estudios de la estructura del sector F_0.</i>	10
<i>Relaciones estructura-función</i>	11
<i>La hidrólisis del ATP</i>	12
<i>La síntesis de ATP</i>	15
<i>Transducción y transferencia de energía en el complejo F_0F_1.</i>	16
<i>Proteínas reguladoras de las F-ATPasas</i>	18
<i>El inhibidor de la ATPsintasa/ATPasa dependiente del potencial</i>	18
<i>Estructura e interacción con la ATPsintasa/ATPasa</i>	18
<i>Efecto del estado energético sobre la acción inhibitoria de IF_1.</i>	21
<i>Efectos en la hidrólisis de ATP</i>	21
<i>Efectos sobre la síntesis de ATP</i>	22
<i>El mecanismo de liberación del IF_1.</i>	23
<i>El papel fisiológico del IF_1.</i>	24
<i>La proteína inhibitoria dependiente de calcio</i>	25
<i>Estructura e interacción con la ATPsintasa/ATPasa</i>	25
<i>Proteínas inhibitorias de ATPasas P y V</i>	26
<i>Inhibidores de las P-ATPasas</i>	26
<i>Inhibidores de las V-ATPasas</i>	26
JUSTIFICACION	28
OBJETIVO	30

MATERIALES Y METODOS	31
<i>Aislamiento de las mitocondrias de corazón de res</i>	31
<i>Preparación de las particulas submitocondriales de Klein</i>	31
<i>Preparación de las particulas submitocondriales Mg-ATP</i>	32
<i>Aislamiento del complejo F_0F_1</i>	32
<i>Aislamiento del complejo F_0F_1</i>	33
<i>Determinación de la concentración de proteína</i>	34
<i>Bluret</i>	34
<i>Bradford o de Azul de Coomassie</i>	34
<i>BCA</i>	34
<i>Determinación de la hidrólisis de ATP</i>	35
<i>Acoplado a la oxidación del NADH</i>	35
<i>Cuantificación del fosfato liberado por el método colorimétrico de Fiske-Subbarow</i>	35
<i>Cuantificación del fosfato liberado con verde de malaquita</i>	36
<i>Cuantificación del ^{32}P liberado</i>	36
<i>Estimulación de la hidrólisis de ATP</i>	37
<i>Recambio ATP-^{32}P</i>	38
<i>Electroforésis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida en presencia de SDS</i>	38
<i>Inmudetección de F_1 en el complejo F_0F_1 con anticuerpos policlonales anti-F_1</i>	39
<i>Reconstitución del complejo ATPsintasa/ATPasa en liposomas, por elución-centrifugación</i>	04
<i>Reconstitución del F_1 en el complejo F_0F_1</i>	40
<i>Micrografías electrónicas de los proteoliposomas</i>	41
RESULTADOS	42
<i>Modificación de la preparación de F_0F_1</i>	42
<i>Existen complejos F_0F_1 en una preparación de F_0F_1</i>	43
<i>Reconstitución del complejo F_0F_1 en liposomas</i>	43
<i>Hidrólisis</i>	43
<i>Recambio ATP-^{32}P</i>	47
<i>Relación Hidrólisis/Recambio</i>	47
<i>Efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP en la relación hidrólisis/recambio</i>	49
<i>Complejo F_0F_1</i>	49
<i>Complejo F_0F_1</i>	49
<i>Efecto de concentraciones crecientes de Mg^{2+} en la relación hidrólisis/recambio</i>	55
<i>Complejo F_0F_1</i>	55
<i>Complejo F_0F_1</i>	55

<i>Efecto de concentraciones crecientes de ADP en la hidrólisis y el recambio</i>	58
<i>Recambio</i>	58
<i>Hidrólisis</i>	59
<i>Caracterización de la composición polipeptídica</i>	61
<i>Inmunodetección de IF₁</i>	62
DISCUSION	64
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS	73
PERSPECTIVAS	84
APENDICE	86

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Localización de las subunidades del complejo ATPsintasa/ATPasa.	3
<i>Figura 2.</i> Estructura cuaternaria de la F_1 de mitocondrias de hígado de rata.	6
<i>Figura 3.</i> Topografía de la F_1 de corazón de res.	6
<i>Figura 4.</i> Reconstitución de IF_1 en el complejo F_0F_1 .	44
<i>Figura 5.</i> Efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) en la hidrólisis llevada a cabo por el complejo F_0F_1 en el cual se ha reconstituido al IF_1 .	45
<i>Figura 6.</i> Regráfico de Lineaweaver-Burk para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) en la hidrólisis llevada a cabo por el complejo F_0F_1 con el IF_1 reconstituido.	45
<i>Figura 7.</i> Micrografía electrónica de proteoliposomas conteniendo a la ATPsintasa/ATPasa.	46
<i>Figura 8.</i> Efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) sobre las reacciones de hidrólisis y recambio llevadas a cabo por el complejo F_0F_1I .	51
<i>Figura 9.</i> Regráfico de Lineaweaver-Burk para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) en el recambio llevado a cabo por el complejo F_0F_1I .	51
<i>Figura 10.</i> Regráfico de Lineaweaver-Burk para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) en la hidrólisis llevada a cabo por el complejo F_0F_1I .	52
<i>Figura 11.</i> Relación hidrólisis/recambio para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) en el complejo F_0F_1I .	52
<i>Figura 12.</i> Efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) sobre las reacciones de hidrólisis y recambio llevadas a cabo por el complejo F_0F_1I .	53
<i>Figura 13.</i> Regráfico de Lineaweaver-Burk para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) en el recambio llevado a cabo por el complejo F_0F_1I .	53
<i>Figura 14.</i> Regráfico de Lineaweaver-Burk para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) en la hidrólisis llevada a cabo por el complejo F_0F_1I .	54
<i>Figura 15.</i> Relación hidrólisis/recambio para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) en el complejo F_0F_1I .	54
<i>Figura 16.</i> Efecto de concentraciones crecientes de $MgCl_2$ sobre las reacciones de hidrólisis y recambio llevadas a cabo por el complejo F_0F_1I .	56
<i>Figura 17.</i> Relación hidrólisis/recambio para el efecto de concentraciones crecientes de $MgCl_2$ en el complejo F_0F_1I .	56

<i>Figura 18.</i> Efecto de concentraciones crecientes de $MgCl_2$ sobre las reacciones de hidrólisis y recambio llevadas a cabo por el complejo F_0F_1 .	57
<i>Figura 19.</i> Relación hidrólisis/recambio para el efecto de concentraciones crecientes de $MgCl_2$ en el complejo F_0F_1 .	57
<i>Figura 20.</i> Efecto de concentraciones crecientes de ADP sobre la reacción de recambio llevada a cabo por los complejos F_0F_1 y F_0F_1I .	58
<i>Figura 21.</i> Regráfico de Lineaweaver-Burk para el efecto de concentraciones crecientes de ADP en el recambio $ATP \rightarrow Pi$ llevado a cabo por los complejos F_0F_1 y F_0F_1I .	59
<i>Figura 22.</i> Efecto de concentraciones crecientes de ADP sobre la reacción de hidrólisis de $ATP \rightarrow P$ llevada a cabo por los complejos F_0F_1 y F_0F_1I .	60
<i>Figura 23.</i> Relación hidrólisis/recambio para el efecto de concentraciones crecientes de ADP en los complejos F_0F_1 latente y activo.	60
<i>Figura 24.</i> Electroforesis en gel desnaturalizante en presencia de SDS en segunda dimensión para el complejo F_0F_1I .	61
<i>Figura 25.</i> Inmunodetección de IF ₁ en el complejo ATPsintasa/ATPasa.	63

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.</i> Comparación de las características funcionales de los complejos F_0F_1 activo y latente.	29
<i>Tabla 2.</i> Características del complejo F_0F_1 aislado por la metodología de Dreyfus y cols. (1984)	44
<i>Tabla 3.</i> Características obtenidas después de reconstituir a los complejos F_0F_1 y F_0F_1I por el método de elución-centrifugación de Garret y Penefsky (1975).	46
<i>Tabla 4.</i> Pruebas de orientación de la ATPsintasa/ATPasa en proteoliposomas reconstituidos por elución-centrifugación.	48
<i>Tabla 5.</i> Recambio $ATP \rightarrow Pi$ en proteoliposomas de los complejos F_0F_1 o F_0F_1I obtenidos por sonicación o por cambio de presión.	50
<i>Tabla 6.</i> Pesos moleculares asignados a las proteínas presentes en la preparación de F_0F_1I .	62
<i>Tabla 7.</i> Resumen de los parámetros cinético de los complejos latente y activo	68

INTRODUCCION

LA ESTRUCTURA Y COMPOSICION DE LA ATPsintasa/ATPasa.

Generalidades.

Las enzimas F_0F_1 -ATPsintasa/ATPasas se encuentran en la membrana plasmática de los procariontes, en la membrana interna mitocondrial de las células animales, y en las membranas tilacooidal e interna mitocondrial de las células vegetales. Esta enzima clave sintetiza ATP en respuesta al gradiente de protones generado a través de la transferencia de electrones en las membranas transductoras de energía, y en la dirección contraria produce este gradiente a partir de la hidrólisis del ATP. Como su nombre lo indica, están formadas por dos sectores, F_1 y F_0 .

En todas las especies examinadas a la fecha, la porción F_1 , que es la región hidrofílica y catalítica de la enzima, está compuesto por cinco subunidades que se encuentran en una relación molar de $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$. En la eubacteria *Escherichia coli*, la masa molecular de cada una de ellas es 55.3, 50.2, 31.4, 19.6 y 14.9 kDa respectivamente [Senior y Wise, 1983], y en el caso de la enzima mitocondrial, la masa molecular de cada una de éstas es 55.2, 51.6, 30.1, 15.1, y 5.7 kDa respectivamente, con una masa molecular total de 317 kDa en el caso de la enzima de corazón [Walker y cols., 1985]. Además en la F_1 mitocondrial se encuentra un péptido de bajo peso molecular (9.6 kDa) [Frangione y cols., 1981], conocido como "inhibidor natural de la ATPsintasa/ATPasa" o IF₁.

La composición del F_0 , que es la región membranal e hidrofóbica de la enzima, varía según la especie. El F_0 más simple se encuentra en *E. coli* y está compuesta por tres subunidades con estequiometrías de a_2c_{10-12} y masas moleculares de 30.3, 17.3, y 8.3 kDa respectivamente [Senior y Wise, 1983; Fillingame, 1990]. El F_0 más complejo es el de las mitocondrias de mamíferos, con tal vez hasta siete subunidades. Las subunidades del F_0 mitocondrial son *a* (ATPasa-6), *b*, OSCP (proteína que confiere sensibilidad al antibiótico oligomicina tipo "C", secretado por el hongo *Streptomyces diastatochromogenes*), *d*, F_6 , A6L (subunidad 8 en las levaduras) y *c* (subunidad 9 en levaduras), con masas moleculares de 24.8, 24.7, 21.0, 18.6, 9.0, 8.0, y 7.4 kDa respectivamente [Knowles y cols., 1971; Ovchinnikov y cols., 1984 y Walker y cols., 1987]. Recientemente el grupo de Walker ha reportado la existencia de tres subunidades más para el F_0 de las mitocondrias de corazón de res, se les ha asignado el nombre de *e*, *f* y *g*; sus pesos moleculares por secuencia de aminoácidos son de 8,189, 10,209 y 11,328 daltones respectivamente; su función, así como su estequiometría están aún por definirse [Collinson y cols., 1994]. En la

ATP sintasa/ATPasa mitocondrial de res hay una copia de cada una de las subunidades *a*, *d*, OSCP y A6L, dos copias de *b* y F_0 y varias copias de *c*.

Las subunidades A6L y 6 en el caso de las mitocondrias de los mamífero están codificadas por el DNA mitocondrial y son sintetizadas en la mitocondria. Las otras subunidades son productos citorribosomales que se importan a la membrana interna mitocondrial [Hatefi, 1993].

En *E. coli*, la subunidad *b* está inmersa en la membrana por medio de una α hélice que se intercala en la membrana por el *N-terminal*. El resto de la molécula es extramembranal y se considera que forma dos α hélices elongadas que se introducen en el sector F_1 . La subunidad *a* está ampliamente intercalada en la membrana por medio de α hélices. La subunidad *c* está compuesta de dos α hélices unidas a la mitad de la molécula por un segmento hidrofílico muy pequeño. La forma de la molécula es de horquilla con dos α hélices que se extienden por la membrana y sobresalen levemente de la membrana, la vuelta hidrofílica central sale de la membrana hacia donde se orienta la F_1 [Fillingame, 1992]. Las 10 ó 12 copias de la subunidad *c* están dispuestas rodeando a las α hélices de las subunidades *a* y *b* [Fillingame, 1990 y Penefsky y Cross, 1991].

En las mitocondrias de res, las subunidades *b*, *d*, F_0 , A6L (incluyendo su *C-terminal*) y OSCP están expuestas hacia la matriz; este dato se ha obtenido mediante la utilización de proteasas y anticuerpos específicos para cada una de las subunidades [Hekman y cols., 1991]. La mayor parte de la masa de estas subunidades que es sensible a las proteasas y a los anticuerpos no está expuesta en el lado citosólico de la membrana interna. La exposición de las subunidades 6 y *c* no se detectan por estas metodologías, en ninguno de ambos lados de la membrana interna, lo que señala que están inmersas completamente en la membrana.

Joshi y Burrows (1990) han investigado las relaciones de vecindad entre las subunidades de la ATP sintasa/ATPasa por medio de experimentos de entrecruzamiento. Sus resultados demuestran la vecindad entre α/β con OSCP y un polipéptido de 24 kDa; entre F_0 con α , γ y polipéptidos de 8, 20 y 24 kDa; entre γ con δ y ϵ y de un polipéptido de 24 kDa con OSCP y otro de 20 kDa.

Las subunidades α , β y γ mitocondriales, tienen una similitud de secuencia considerable con sus contrapartes en el cloroplasto y *E. coli* [Penefsky y Cross, 1991]. La subunidad δ mitocondrial es análoga a la de los cloroplastos y a la subunidad *e* de *E. coli*. Además las subunidades OSCP, *b*, *c*, y 6 de las mitocondrias de res son consideradas como análogas de las subunidades δ , *b*, *c*, y *a* de *E. coli* respectivamente [Fillingame, 1992]. Estas similitudes están basadas en los perfiles de hidropatía, porque la identidad en las secuencias es limitada.

En las mitocondrias de mamífero y en *E. coli* hay una región llamada "cuello" entre la F_1 y el sector membranal de la ATPsintasa/ATPasa. Las dimensiones de este cuello son de aproximadamente 4.5 nm de largo y 2.5 nm de diámetro. En *E. coli* las hélices extramembranales de las dos subunidades b y las subunidades pequeñas de la F_1 contribuyen a formar el cuello [Capaldi y cols., 1992]. En las mitocondrias de res los candidatos para la composición del cuello son OSCP, F_6 , la subunidad b y una o más de las subunidades pequeñas de la F_1 (Figura 1).

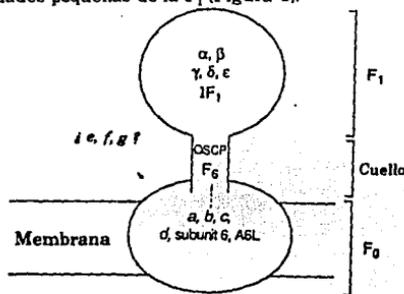


Figura 1. Localización de las subunidades del complejo ATPsintasa/ATPasa. Se muestran las subunidades pertenecientes a cada uno de los sectores de la enzima (tomado de Hatefi, 1993)

ESTRUCTURA CRISTALOGRÁFICA DE LA F_1 .

La Polémica.

Aunque el complejo F_1 puede dissociarse del sector membranal F_0 y tratado como una proteína soluble, por su gran tamaño y numerosas subunidades es un verdadero reto para la cristalografía.

Los primeros datos estructurales de la enzima se obtuvieron por medio de algoritmos para predecir su estructura secundaria, y a estos resultados, se sumaron estudios de mutagénesis dirigida. Por medio de estos análisis, se sabe por ejemplo,, que existen grandes semejanzas entre la estructura de los sitios catalíticos en las subunidades de la F_1 y otras trifosfatasa de nucleótidos, incluyendo proteínas cuya estructura ha sido definida a una alta resolución como $p2f^m$ [Berchtold, 1993], y el factor de elongación γ (EF-Tu) [Tong y cols., 1991], la región de unión de nucleótidos en estas dos proteínas, y por analogía, de la F_1 , es una estructura compuesta por

cinco estructuras de β plegada paralelas y una antiparalela, rodeadas por α hélices, todas ellas se conectan por medio de asas que varían en longitud.

En cuanto a la información de la estructura tridimensional de la F_1 , se cuenta actualmente con el reporte de dos estructuras cristalinas de diferente fuente y a diferente resolución. Por un lado, la estructura de la F_1 aislada a partir de las mitocondrias de hígado de rata [Bianchet y cols., 1991; Amzel y cols., 1992] y por otro los datos de Abrahams y cols., (1993) de la estructura cristalina de la F_1 de las mitocondrias de corazón de res. La F_1 de las mitocondrias de corazón de res es esencialmente la misma que el complejo aislado a partir de hígado de rata (la homología de las secuencias de las subunidades α y β es 98 y 95% respectivamente [Penefsky y Cross, 1991]).

La información de la estructura tridimensional de la F_1 de hígado de rata se obtuvo a partir de cristales trigonales con los cuales se logró una resolución de 0.36nm y se reportaron las siguientes dimensiones para la molécula 12X12X7.4 nm. Las tres subunidades α y las tres β tienen una forma elipsoidal, e interdigitaciones alrededor de un eje central (con simetría en tres). Las subunidades α están inclinadas 30° con respecto al eje central; interactúan en el centro, y se extienden 1.5 nm más allá de las subunidades β hacia un extremo de la F_1 . Las subunidades β están casi paralelas al eje central (con simetría en tres), interactuando con las subunidades α , pero no con ellas mismas, y se extienden 1.5 nm al final de las subunidades α hacia el lado opuesto de la molécula. A partir de los resultados generados por este estudio, se ha concluido que la estructura del complejo F_1 es básicamente *simétrica*. En este estudio no se indica la localización de las subunidades pequeñas de la F_1 (Figura 2).

Diffiriendo significativamente de los resultados de Amzel y cols., (1992) de la estructura de la F_1 de las mitocondrias de hígado de rata, están los datos de Abrahams y cols., (1993) de la estructura cristalina de la F_1 de las mitocondrias de res. Por medio de un cristal ortorrómbico de celda unitaria (P2₁2₁2₁) se ha definido la estructura de la enzima a 0.65 nm de resolución (ver apéndice 1). Estos datos indican que la F_1 de res es una partícula esférica con un diámetro de 10±1.0 nm, que tiene un tallo de 4.0 nm de longitud el cual se ha sugerido como parte del cuello de la enzima. En seguida de este tallo existe una cavidad que se extiende 3.5 nm dentro de la esfera. Se cree que esta cavidad está ocupada en la ATPsintasa/ATPasa por la subunidad OSCP y/o la subunidad *b*. En el lado opuesto de la esfera hay una hendidura de 1.5 nm de profundidad. Se supone que las paredes de esta hendidura están formadas por la alternancia de las subunidades α y β . Dentro de la esfera hay una barra de 9.0 nm que se extiende desde el tallo en un lado de la esfera hasta el inicio de la hendidura en el lado opuesto. Se ha sugerido que esta barra es una α hélice de alrededor de 60 aminoácidos de cualquiera de las subunidades α y β . Los autores aseguran que aunque existen características simétricas en la molécula (en

tres y en seis), hay partes en las subunidades homólogas α y β que no lo son, por ello, a partir de los resultados obtenidos por este estudio, se concluye que la estructura de la F_1 es asimétrica (Figura 3).

Considerando las diferencias en resolución y los estados de refinamiento, la mayor discrepancia entre las dos estructuras (i.e. la F_1 de hígado y de corazón), está dada por la contribución de las subunidades menores de la F_1 (ver el arreglo e interacción de las subunidades pequeñas de la F_1).

Recientemente el grupo de Walker a publicado la estructura cristalográfica de la F_1 a una resolución de 2.8 Å [Abrahams y cols., 1994]. Básicamente en esta estructura se puede observar que las subunidades β difieren en conformación y en el nucleótido que tienen unido. La estructura sigue siendo asimétrica y con ella se especula que en cualquier momento los tres sitios catalíticos de la enzima están en diferentes estados del ciclo catalítico y que la interconversión de los estados puede estar dada por la rotación del hexámero $\alpha_3\beta_3$ sobre un dominio de α hélice correspondiente a la subunidad γ . La estructura de la F_1 a 2.8 Å de resolución es la estructura asimétrica más grande examinada a esa resolución hasta el momento.

Por otra parte, hasta la fecha, no se ha reportado la presencia de actividad catalítica en los cristales de ninguna de las dos fuentes o de si una vez disueltos la enzima recupera su actividad catalítica.

Una posibilidad para explicar las diferencias: las condiciones de cristalización.

Además de los posibles efectos estructurales de las subunidades pequeñas en los contactos del cristal, las diferencias entre las estructuras se pueden deber a las condiciones de cristalización. La enzima de hígado de rata se cristalizó a partir de una solución madre que contiene ATP y fosfato de potasio (condiciones de actividad). Los cristales de corazón de res fueron hechos en presencia de AMP-PNP, ADP y Mg^{2+} (condiciones de inhibición). El ATP y el fosfato podrían ocasionar que las subunidades menores perturben la asimetría de los 3 pares α/β ; por el contrario, el AMP-PNP, el ADP y el Mg^{2+} fuerzan al complejo a adoptar una geometría asimétrica, la cual sólo es posible lograr si la unidad asimétrica contiene una molécula de F_1 entera [Stokes y Nakamoto, 1994].



Figura 2. Estructura cuaternaria de la F_1 de las mitocondrias de hígado de rata. Se muestra vista desde arriba (hexámero $\alpha_3\beta_3$), en donde se aprecia la estructura *simétrica* [Bianchet y cols., 1991].



Figura 3. Topografía de la F_1 mitocondrial de corazón de res. Se muestra vista lateralmente, en donde se aprecia la estructura *asimétrica* de la molécula [Abrahams y cols., 1993] (ver apéndice 1).

La influencia de diferentes nucleótidos en la conformación del complejo sugiere que las dos formas de cristales pueden tener significado funcional. Los diferentes patrones de cristalización son reminiscencias de resultados de microscopía electrónica, en los cuales se muestra que las subunidades menores cambian la conformación en

respuesta a la adición de nucleótidos [Stokes y Nakamoto, 1994]. Estos estudios concuerdan con los mecanísticos, en los cuales se ha propuesto una cinética asimétrica en los tres sitios catalíticos de las subunidades α/β . Debido a que las tres subunidades α y las tres β , tienen secuencias idénticas respectivamente, la asimetría podría estar dada por la interacción de éstas o por las subunidades pequeñas de la enzima. De hecho, es muy posible que existan cambios en la simetría durante el ciclo catalítico como parte integral del mecanismo de transporte o catalítico [Stokes y Nakamoto, 1994].

Arreglo e interacción de las subunidades γ , δ y ϵ de la F_1 .

De acuerdo con Capaldi y colaboradores, las subunidades pequeñas de la F_1 de *E. coli* están localizadas cerca de la región distal de la F_1 , cerca de un par α/β en la cavidad central formada por las interdigitaciones de las subunidades mayores [Capaldi y cols., 1992].

Amzel y Pedersen (1978) encontraron que los cristales de la F_1 de las mitocondrias de hígado pertenecen al grupo espacial $R32$ y que el complejo tiene un eje de simetría cristalográfica de tres; por tanto, cada celda unitaria contiene únicamente un tercio del complejo F_1 , y la estructura resultante del estudio de difracción de rayos X es simétrica, en la cual cada par α/β es idéntico a los otros dos. La manera en la que se empaqueta el cristal, implica que las subunidades γ , δ y ϵ , que aparecen en una sola copia por molécula de F_1 y no tienen una simetría interna en tres, no participan en los contactos de empaquetamiento y por tanto ocupan posiciones al azar; como resultado, su contribución a la estructura está dada siguiendo el eje de simetría. Haciendo a un lado esta deficiencia, la estructura se ha refinado y los autores pretenden tener analizados cerca de 900 de los 1000 aminoácidos de las subunidades α y β , obteniendo un factor R de 37%. En el cristal ortorrómbico del grupo de Walker [Abrahams y cols., 1993], la unidad asimétrica contiene al complejo F_1 entero y la simetría en tres no se mantiene por el empaquetamiento del cristal.

Subunidad γ

La estructura de la F_1 mitocondrial a una resolución de 0.65 nm [Abrahams y cols., 1993], generó información sobre el arreglo de la subunidad γ . Las dos α hélices que se extienden desde el cuello hacia el interior del hexámero $\alpha_3\beta_3$, pertenecen a las regiones conservadas del C- y el N-terminal de la subunidad γ , las cuales se predijeron como α hélices por medio del análisis de secuencia. Basándose en estos análisis, se sabe que la mitad de la subunidad γ está formada por estructuras de giros y hojas

β. Los experimentos de digestión con proteasas, marcaje con biotina-avidina y reconocimiento específico por anticuerpos, indican que esta región media está fuera del hexámero $\alpha_3\beta_3$ y está implicada en la interacción con la subunidad ϵ [Tang y cols., 1994].

Actualmente se cuenta con una gran cantidad de evidencia genética acerca del papel de la subunidad γ en el acoplamiento entre los eventos de la catálisis y el paso de los protones a través del canal F_0 . El grupo de Futai [Nakamoto y cols., 1990], han visto que la mutación M23K en la región *N-terminal* de la subunidad γ causa la pérdida del acoplamiento entre la hidrólisis y el bombeo de protones. El desacoplamiento puede revertirse por medio de mutaciones diversas dentro de la región comprendida entre los residuos 269 y 280 del *C-terminal*. Más recientemente este grupo ha demostrado que los efectos de las mutaciones en la región *C-terminal* de la subunidad γ , se pueden suprimir por múltiples mutaciones en el *N-terminal* entre los residuos 18 y 35 [Nakamoto y cols., 1994]. Experimentos muy recientes del grupo de Capaldi [Gogol y cols., 1994], han mostrado cambios estructurales en la subunidad γ durante el acoplamiento de energía. Estos autores encontraron que la posición de la masa central de la F_1 , que incluye a las subunidades $\gamma\epsilon$, es diferente si los sitios catalíticos están ocupados por Mg-ATP o por Mg-ADP; estos resultados, se obtuvieron introduciendo residuos de cisteína en la subunidad γ y utilizando reactivos de entrecruzamiento y fluoróforos.

Los cambios conformacionales de la subunidad γ y obtenidos por criomicroscopía electrónica, fluorescencia y entrecruzamiento, no se observan en estudios en los cuales se ha depletado a la subunidad ϵ de la F_1 [Capaldi y cols., 1994]. Esta observación es importante, porque como se mencionó con anterioridad, la F_1 de *E. coli* es muy activa cuando se le depleta de esta subunidad [Dreyfus y Satre, 1984; Dunn y cols., 1987; Mendel-Hartvig y Capaldi, 1991].

El comportamiento anormal de la subunidad γ cuando la subunidad ϵ se remueve de la F_1 , implica el acoplamiento de la subunidad ϵ en el complejo F_0F_1 y sugiere que ambas subunidades trabajan al unísono. Con estudios en los que se utilizó un derivado monomaleimido de oro en mutantes en las cuales se introdujeron residuos de cisteína, se ha mostrado que en presencia de Mg-ATP en los sitios catalíticos, la subunidad ϵ está localizada preferentemente cerca de la subunidad β , y por el contrario en presencia de Mg-ADP está preferentemente cerca de la subunidad α , lo que implica un cambio de posición de alrededor de 20 Å [Wilkena y Capaldi, 1994]. Aunado a esta información se encuentra el reporte de McCarty y colaboradores, quienes encontraron que un anticuerpo específico contra la subunidad ϵ no reconoce a la misma en la oscuridad, pero lo hace durante la iluminación de los tilacoides cuando la fotofosforilación está ocurriendo [Richter y McCarty, 1987].

Subunidad δ

Recientemente el grupo de Penefsky [Xiao y Penefsky, 1994], ha mostrado que un complejo F_1 carente de la subunidad δ , presenta una aceleración de la reacción de hidrólisis después de un pulso de ATP frío; la reconstitución de la subunidad δ genera la desaparición de la respuesta al pulso de ATP. Las constantes de equilibrio para la catálisis unisito del complejo carente de la subunidad δ , no difieren significativamente de las reportadas anteriormente para la enzima en complejo con o sin esta subunidad. El complejo F_0F_1 de *E. coli* en vesículas responde al pulso de ATP solamente si las vesículas son tratadas con KCl. Existe un número considerable de reportes en los cuales se ha verificado la relación estequiométrica de la F_1 , y en algunos de ellos se ha reportado que dependiendo de la preparación hay una cantidad variable de la subunidad δ [Futai y cols., 1974; Nelson y cols., 1974; Noumi y cols., 1986; Turina y cols., 1993]. Estos resultados, demuestran que la subunidad δ de la F_1 está en el complejo con una interacción más lábil que γ , pues al parecer no tiene ninguna interacción con el canal F_0 (vea su localización en la Figura 1).

Subunidad ϵ

Utilizando algoritmos para predecir la estructura secundaria, se ha encontrado que la mitad del *N-terminal* de la subunidad ϵ , está formada por estructuras β (vueltas y hojas), y por el contrario, los 50 residuos terminales del extremo carboxilo están formando un motivo α hélice-vuelta- α hélice [Skakoon y Dunn, 1993]. Con estudios de entrecruzamiento se ha visto que la subunidad ϵ está unida a las subunidades α y β por medio de la región *C-terminal* [Aggeler, 1992; Dallman y cols., 1992], y que la región *N-terminal* interactúa con la subunidad γ [Aggeler, 1992]. La región más conservada de la subunidad ϵ , tanto en bacterias como en los cloroplastos, es el segmento comprendido entre los residuos 30 y 40, el cual contiene cuatro residuos invariables: Gly30, Glu31, His38 y Pro40 [Kuki, 1988]. Al parecer esta región hace contacto con partes del sector F_0 . Las evidencias de la interacción de la subunidad ϵ con el canal son las siguientes: se ha visto que las mutaciones del Glu31 y la His38 alteran el acoplamiento entre la F_1 y el F_0 , sin afectar significativamente la actividad de hidrólisis [LaRoe y Vik, 1992]. El grupo de Capaldi [Capaldi y cols., 1994], ha observado que en la mutante ϵ H38C, la modificación química con $^{14}\text{C-N}$ -etilmaleimida de la cisteína en posición 38 es protegida en el complejo F_0F_1 de *E. coli*, pero se modifica rápidamente cuando se agrega a la F_1 soluble. La modificación química de la F_1 no afecta el ensamblaje con el F_0 , pero ocurre una disrupción del acoplamiento de la actividad de hidrólisis con el paso de protones (monitoreado por la alteración de la sensibilidad al DCCD). Finalmente Fillingame y colaboradores [Zhang y cols., 1994], han visto que la interacción de la subunidad ϵ con el F_0 es a través de la subunidad c . Encontraron que las mutaciones en el Glu31 de la subunidad ϵ suprimen la mutación Q42E en la subunidad c . Cambiando Gln42 por Glu en el asa polar de la

subunidad *c* se desacopla la hidrólisis de la translocación de protones, pero al cambiar al Glu31 de la subunidad *a* a Gly, Val o Lys se recupera nuevamente el acoplamiento.

OTROS ENFOQUES PARA CONOCER LA ESTRUCTURA DE LA ATPsintasa/ATPasa.

Cristalización de las subunidades de la F_1 .

Un método alternativo para determinar la estructura del complejo F_1 consta en cristalizar cada una de sus subunidades o subcomplejos por separado. Codd y cols., (1992) cristalizaron la subunidad ϵ y el complejo $\gamma\epsilon$ de *E. coli*; en lugar de extraer las subunidades del complejo F_0F_1 , produjeron grandes cantidades de polipéptidos por fusión con otras proteínas mediante metodologías de biología molecular. Por ejemplo, la fusión con la Glutación Transferasa (GST) la subunidad en cuestión se expresa y se purifica posteriormente; una vez pura se separan ambas proteínas cortando con una proteasa específica, en este caso la señal de corte consta de un sitio artificial para trombina. Dunn (1982) reportó que la subunidad γ permanece soluble sólo cuando está acomplejada con la subunidad ϵ . De acuerdo con esta observación, únicamente se obtiene una unidad de fusión de GTS y γ cuando se expresa con la subunidad ϵ .

Por otra parte, un problema potencial de estas metodologías es suponer que las subunidades estén correctamente plegadas en ausencia de las otras subunidades de la F_1 , pero ésto se compensará cuando se obtengan las estructuras de las subunidades a nivel atómico, las cuales podrán compararse con los datos obtenidos para la molécula de la F_1 a baja resolución.

Estudios de la estructura del sector F_0 .

Hasta el momento existe muy poca evidencia acerca de la organización del complejo F_0 . Vik y Dao (1992), usando la misma hipótesis de Baldwin (1993) (i.e. los lados variables de las α hélices están en contacto con los lípidos y los conservados en contacto con otras α hélices), han generado un modelo por medio del análisis de secuencias. En este trabajo, se examinaron con mucho detalle las secuencias relacionadas de las subunidades del F_0 , sus perfiles de hidrofobicidad y la variación de sus aminoácidos. Usando un modelo de seis cruces transmembranales para la subunidad α , uno para la b y dos para la c , se realizó el análisis de Fourier de la variación de la secuencia para identificar los lados variables y conservados de las α hélices de cada una de estas subunidades. Este análisis indica que la subunidad α tiene dos α hélices con lados variables, lo que sugiere que existe contacto de estas

estructuras y los lípidos; la predicción para las cuatro α hélices restantes dice que están totalmente en contacto con otras α hélices. El análisis para las subunidades *b* y *c*, predice un lado variable para cada una de ellas. Con base en estas predicciones y en resultados previos de estudios con mutaciones, se propone el siguiente modelo de interacción de las subunidades *b* y *c* en torno a la subunidad *a*: varias de las α hélices de la subunidad *a* están en contacto unas con otras; una sola α hélice de esta subunidad está en contacto con un grupo de 9 a 10 subunidades *c*, y otras dos α hélices de la subunidad *a* están en contacto con las dos α hélices conservadas de la subunidad *b*.

La única información estructural directa del complejo F_0 se ha obtenido por medio de resonancia magnética nuclear (RMN) multidimensional [Girvin y Fillingame, 1993 y 1994]. En este estudio se analizó el proteolípido *c* de *E. coli*; el polipéptido purificado se estudió en cloroformo-metanol-agua en donde retiene algunas de las características de la proteína nativa (i.e. reactividad específica al DCCD por el Asp61 y disminución de esta reactividad en la mutante Ile28Thr) y no hay interacción aparente de las subunidades. Usando RMN de dos dimensiones, los sistemas de "spin" de las cadenas laterales de 78 de los 79 aminoácidos fueron asignados como residuos *tipo*, y otros 44 de estos como residuos *específicos* de la secuencia [Girvin y Fillingame, 1993]. El efecto nuclear de Overhouser (NOE) se observa entre los extremos de las α hélices transmembranales predichas, lo que sugiere que en el solvente la proteína está doblada como horquilla, que es precisamente como se cree que se dobla en la membrana. Una prueba más sobre la conformación de horquilla se obtuvo por medio de la modificación específica del Asp61 con una mezcla que contiene al análogo nitróxido del DCCD, la N-(2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxo)-N'-ciclohexil carbodiimida [Girvin y Fillingame, 1994]. El nitróxido libera muchas de las resonancias asignadas a ^1H en ambas α hélices transmembranales, y ésto permite hacer cálculos de distancias y límites. Usando al análogo para hacer determinaciones de NOE inter e intra hélice, se propone una estructura de horquilla con dos α hélices transmembranales levemente curvadas. El Asp61 de la α hélice-2 está en la bicapa, muy cerca de los residuos Ala24 e Ile28 de la α hélice-1. El modelo es congruente con los efectos de las modificaciones por mutación química hechos en estas posiciones en el F_0 .

RELACIONES ESTRUCTURA FUNCION.

Se sabe muy poco acerca del papel de las subunidades de la ATPsintasa/ATPasa en las reacciones de síntesis e hidrólisis y en la translocación de los protones. A continuación se enumeran algunos de los hallazgos en los cuales existe una correlación estructural y funcional en la ATPsintasa/ATPasa:

En las subunidades β se encuentran los sitios catalíticos de la enzima (ver más adelante), estos sitios pueden utilizar como sustratos tanto nucleósidos di y tri fosforilados de purinas como de pirimidinas; todas las subunidades α analizadas fijan específicamente ADP y ATP; las subunidades α de cloroplasto también pueden unir GD(T)P y parece que tiene funciones regulatorias [Murataliev y Boyer, 1992]. En esta enzima como en la de *E. coli* la subunidad ϵ atenúa la velocidad de hidrólisis cuando se agrega a una F_1 carente de esta subunidad [Dreyfus y Satre, 1984; Richter y cols., 1984]. En todas las especies analizadas, la subunidad c participa en la conducción de protones a través del F_0 vía un grupo carboxilo libre (Asp61 en *E. coli* y Glu en todas las demás) localizado en la bicapa lipídica en la mitad de la α hélice del *C-terminal*. Por medio de mutagénesis dirigida, se ha mostrado que en *E. coli* este residuo es esencial para la síntesis del ATP vía fosforilación oxidativa [Fillingame, 1990]. En la subunidad a se ha encontrado que la Arg210 es esencial y que la subunidad b es indispensable para la unión de la F_1 con el F_0 [Penefsky y Cross, 1991]. En la enzima mitocondrial, se requiere a la subunidad F_6 para la misma interacción, y la OSCP se requiere para el acoplamiento de energía entre la F_1 y el F_0 . En los cloroplastos, y regula la vida media del estado activo de la F_1 vía un proceso reversible ditiol/disulfuro [Gräber y Labahn, 1992].

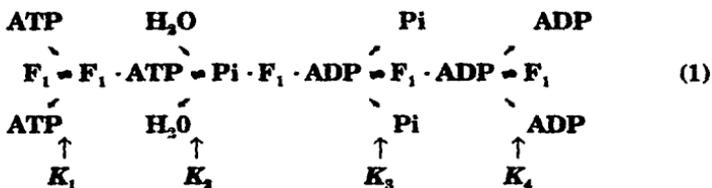
Hay seis sitios de unión para los nucleótidos en la F_1 . Muchos investigadores consideran que tres de ellos son potencialmente catalíticos y unen nucleótidos de purinas y pirimidinas, que pueden recambiarse con los nucleótidos presentes en el medio. Los otros tres sitios son altamente específicos para AD(T)P (ver antes para el cloroplasto) y se conocen como sitios no recambiables o no catalíticos (revisado por Gromet-Elhanan, 1992).

La hidrólisis del ATP.

Existen tres tipos de enzimas que hidrolizan ATP generando gradientes de pH y eléctricos a través de las membranas transductoras de energía, a estas enzimas se les conoce como ATPasas tipo "P" o de membrana plasmática, "V" o vacuolares y "F" o complejos F_0F_1 . El mecanismo de hidrólisis es diferente entre las enzimas F, V y P, estas últimas tienen un intermediario fosforilado de la enzima y las dos primeras carecen de él. La primera evidencia de esta diferencia fue obtenida por Webb y colaboradores (1980) quienes mostraron que la hidrólisis del adenosin 5'-[γ -tio] trifosfato marcado estereoespecíficamente con un ^{18}O en la posición γ , que es catalizada por la F_1 y en presencia de $H^{17}OH$, resulta en la formación de [^{17}O , ^{18}O]tiofosfato con inversión de la configuración (i.e. de la quiralidad), en el fosfato γ . Un mecanismo que tiene un fosfato de alta energía como intermediario, forzosamente tiene dos inversiones, lo cual resulta en la conservación de la quiralidad del fosfato, como se observa en las enzimas de tipo P.

A continuación se mencionan las características conocidas del mecanismo de hidrólisis del ATP por la F_1 :

El grupo de Penefsky [Grubmeyer y cols., 1982] realizó un avance importante para dilucidar el mecanismo de hidrólisis por la F_1 . Estos autores demostraron que es posible cuantificar, bajo ciertas condiciones, la hidrólisis realizada por un sólo sitio catalítico de la enzima (hidrólisis unisítio). Los detalles de la catálisis unisítio proveen información no sólo en el sentido de la hidrólisis, sino también de la síntesis. Se ha visto que cuando se agrega ATP a la F_1 en concentraciones subestequiométricas, se une fuertemente a un sólo sitio catalítico, se hidroliza parcialmente en sitio catalítico de la F_1 a ADP y P_i unidos, y estos productos de la reacción se liberan de la enzima a velocidades muy bajas (Ecuación 1).



Ecuación 1.- Ciclo catalítico de la ATPsintasa/ATPasa. La hidrólisis (derecha) y síntesis (izquierda) del ATP que se llevan a cabo en el complejo F_0F_1 , es del complejo $Mg\text{-ATP}$; por simplicidad se ha omitido al magnesio de la ecuación.

La constante de asociación del ATP K_1 , está determinada a partir de la constante de velocidad para la unión y la liberación del ATP y tiene un valor de 10^{12} M^{-1} ; K_2 es de 0.5, lo cual indica que la reversibilidad del paso 2 tiene un pequeño cambio de energía libre; las constantes K_3 y K_4 de acuerdo con los datos más recientes son de $4 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ [Cunningham y Cross, 1988]. Se han publicado datos similares para la enzima de *E. coli* en condiciones de hidrólisis unisítio [Senior, 1992].

Matsuno-Yagi y Hatefi (1993a) cuantificaron la velocidad hidrólisis del ATP en partículas submitocondriales a bajas concentraciones de sustrato, y se encontraron que sólo a concentraciones de ATP menores a $0.06 \mu\text{M}$ la hidrólisis se encuentra en condiciones de unisitio. Más allá de esta concentración hay un rápido incremento en la formación de P_i , lo que sugiere que el sustrato se está uniendo a otro(s) sitio(s) catalíticos o reguladores.

En este sentido, otra aportación del grupo de Penefsky es la observación de que cuando la F_1 cataliza la reacción en presencia de cantidades subestequiométricas de ATP radioactivo y se le da un pulso del nucleótido no radioactivo a una alta concentración, hay un incremento en la velocidad de la hidrólisis del ATP radioactivo en unisitio que pasa a una hidrólisis multisitio cuya V_{max} es de 600 s^{-1} [Grubmeyer y cols., 1982; Cross y cols., 1982, Penefsky y Cross, 1991]. Estos resultados, junto con los datos de las K_m aparentes para la hidrólisis multisitio del ATP, indican una cooperatividad negativa para la unión del sustrato por la F_1 , así como una cooperatividad positiva en la ocupación del segundo y tercer sitios catalíticos por el sustrato, incrementando la velocidad con que ocurre la reacción. Este grupo también reporta [Penefsky y Cross, 1991] que la velocidad de hidrólisis aumenta 1.5×10^6 veces en la F_1 de res y de acuerdo con Hatefi hay un incremento de la reacción de 4.5×10^3 veces cuando se trata de la F_1 de partículas submitocondriales [Matsuno-Yagi y Hatefi, 1993b].

Algunas mutaciones en la subunidad α de *E. coli* sugieren que esta subunidad está implicada en transmitir la información de la ocupación por nucleótido de un sitio catalítico de una subunidad β a la otra [Futai y cols., 1989].

Cálculos de K_{s2} y K_{s1} (ver Ecuación 1) por modelos de cómputo de la velocidad cercana al equilibrio (12 y 24 s^{-1} respectivamente) sugieren que el ATP unido a la F_1 se hidroliza y resintetiza numerosas veces antes de que los productos, P_i y ADP sean liberados de la enzima [Penefsky y Cross, 1991]. Lo anterior fue elegantemente demostrado por O'Neal y Boyer (1984) por medio de la determinación del promedio de oxígenos del agua (H_2^{18}O) incorporados en el P_i durante la hidrólisis catalizada por la F_1 . Encontraron que, a concentraciones saturantes de ATP, el número de oxígenos del agua incorporados en el P_i fue de 1.02; por el contrario, a muy bajas concentraciones de ATP, este número aumenta a 3.97. En otras palabras, a una alta concentración de ATP, el P_i formado es liberado antes de que se dé la resíntesis del ATP; en el caso de las concentraciones de ATP bajas, el P_i unido a la enzima participa en la resíntesis y rehidrólisis, incorporando cada vez un oxígeno (^{18}O) del agua antes de liberarse de la enzima. Los autores estiman que bajo las condiciones antes mencionadas hay alrededor de 400 reversiones de la hidrólisis antes de que el P_i sea liberado y hay una disminución de alrededor de 5,000 veces en la velocidad de la reacción hidrolítica, comparada con la velocidad a concentraciones saturantes de sustrato.

Finalmente, la Ecuación 1 implica que la adición de ADP y Pi a la F_1 en ausencia de fuerza protón motriz, resulta en la formación del ATP unido a la enzima. Lo anterior se ha demostrado con la F_1 mitocondrial [Sakamoto y Tonomura, 1983], de cloroplasto [Feldman y Sigman, 1982] y eubacteriana [Yoshida, 1983].

En resumen, un único sitio catalítico en la F_1 une ATP muy fuerte, lo hidroliza a ADP y Pi unidos con una constante de equilibrio cercana a la unidad (i.e. no hay cambio de energía considerable). Este proceso ocasiona que la liberación de los productos de la reacción de la enzima sea sumamente lenta. La ocupación de otro(s) sitio(s) catalítico(s) por ATP incrementa la salida de los productos del primer sitio hasta alcanzar una V_{max} multisitio cuando la concentración del ATP es mucho mayor que la de la F_1 .

La síntesis del ATP.

Basados en los efectos de los desacoplantes en el recambio de $Pi-H_2^{18}O$ catalizado por partículas submitocondriales en presencia de ATP, ADP y Pi, Boyer y colaboradores, propusieron que la síntesis del ATP unido en la F_1 , no requiere de energía y que el paso que requiere de ésta en la fosforilación oxidativa es precisamente la liberación del producto de la F_1 [Boyer y cols., 1973]. Actualmente hay algunos resultados que apoyan estas ideas; el grupo de Penefsky [Grubmeyer y cols., 1982; Penefsky y Cross., 1991] ha trabajado con la hidrólisis unisitio, especialmente, con el ATP unido fuertemente a la enzima ($K_d = 10^{12}M^{-1}$) y la interconversión de éste en ADP y Pi unidos a la enzima (K_2 0.5, ver Ecuación 1); también han estudiado la formación del ATP a partir de ADP y Pi unidos a la F_1 proveniente de varias fuentes (ver más adelante).

En el sentido de la síntesis del ATP, el mayor cambio de energía libre no ocurre en la unión misma del ADP con el Pi, pues se ha demostrado que para que este proceso se lleve a cabo no se requiere de la energía protónica; esto no ocurre cuando se estudia la salida del ATP de la enzima. En este sentido, Hatéfi y colaboradores (1982), mostraron que en la síntesis del ATP multisitio catalizada por partículas submitocondriales, el logaritmo natural de los cocientes V_{max}/K_m por Pi y por ADP decrecen linealmente al incrementar la desenergización (por adición de desacoplantes) de las partículas submitocondriales; ésto sugiere que la energización de las partículas submitocondriales incrementa la afinidad de la F_1 por ADP y Pi. Subsecuentemente Penefsky (1985) demostró que la unión fuerte de $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ a las partículas submitocondriales decrece con la energización de la membrana producida por la respiración, de lo que resulta una liberación de alrededor del 30 % del $[\gamma\text{-}^{32}P]ATP$ unido. Se ha mostrado recientemente que la unión de ADP y Pi unisitio y la salida del ATP en la fotofosforilación llevada a cabo por los cloroplastos, es un proceso

promovido por la energía [Gräber y Labahn, 1992]. Estos resultados, están de acuerdo con las conclusiones del grupo de Senior [Al-Shawi y cols., 1990], para la síntesis e hidrólisis del ATP por la enzima de *E. coli*.

Aunque el estudio de la catálisis unisito ha sido de gran ayuda para entender el mecanismo de la síntesis e hidrólisis del ATP en la ATPsintasa/ATPasa, ésta es una reacción que no se encuentra en condiciones fisiológicas en las cuales, la ATPsintasa/ATPasa está expuesta a concentraciones de sustratos superestequiométricas. Bajo condiciones fisiológicas la síntesis e hidrólisis siempre ocurren vía un mecanismo de multisito, que es mucho más complicado que la catálisis unisito.

El descubrimiento de la cooperatividad entre los sitios catalíticos de la F_1 para la hidrólisis del ATP, llevó a diversos grupos de investigadores a buscar este fenómeno en la síntesis del compuesto. La cinética de la síntesis del ATP a concentraciones variables de ADP, catalizada por partículas submitocondriales de corazón de res, tiene dos tipos de cooperatividad: una positiva a concentraciones de ADP menores de $1 \mu\text{M}$ y una negativa a concentraciones mayores [Matsuno-Yagi y Hatefi, 1990]. A partir de esta observación, se ha desarrollado una ecuación que consta de dos pasos, en el primero la enzima une al ADP con una K_d de $\approx 10^7 \text{ M}$, aquí la síntesis del ATP es despreciable o no existe. En el segundo paso el ADP se une a la enzima con una K_d menor a 10^{-6} M , y en este paso se da la síntesis del ATP a una velocidad muy alta [Matsuno-Yagi y Hatefi, 1990].

TRANSDUCCION Y TRANSFERENCIA DE ENERGIA EN EL COMPLEJO F_0F_1 .

En la fosforilación oxidativa o fotosintética, la energía parece "utilizarse" para la unión de los sustratos y para la salida del ATP. La formación del ATP unido a la F_1 a partir de ADP y Pi unidos, se asocia con un pequeño cambio de energía. Recientemente se ha mostrado que en los tilacoides de los cloroplastos, la K_m para la reacción de síntesis ($\text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{ATP}$), en la F_1 permanece sin cambios en presencia o ausencia de la energía protónica [Gräber y Labahn, 1992]. Además, en ciertos microorganismos la ATPsintasa/ATPasa puede sintetizar ATP a expensas de $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ o $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ (a bajas concentraciones de Na^+) [Laubinger y Dimroth, 1988; Kluge y cols., 1992]. Estos resultados, están en contra de la participación de hidronios o iones sodio en el proceso de la síntesis del ATP en los sitios catalíticos de la F_1 . De hecho, se ha construido una ATPsintasa/ATPasa híbrida reconstituyendo la F_1 de un complejo F_0F_1 que bombea protones en un F_0 de una Na^+/H^+ ATPsintasa/ATPasa y se ha visto que esta enzima es capaz de bombear H^+ o Na^+ [Laubinger y cols., 1990]; ésto indica que la translocación de los iones de la fuerza ionmotriz está más restringida al F_0 y no

influye en la F_1 . Las preguntas que saltan a la vista es ¿cómo puede el mismo F_0 translocar iones tan diferentes? y ¿cómo se comunica la fuerza protonmotriz o sodiomotriz del F_0 a la F_1 ? Actualmente muchos grupos de investigación realizan esfuerzos para contestar estas preguntas.

En todas las ATPsintasas/ATPasas examinadas hasta la fecha hay un carboxilo esencial reactivo a una carbodiimida del tipo $(\text{CHxN})_2\text{C}$, que se encuentra cerca del centro de la α hélice que atraviesa la membrana de la subunidad c , y que, se considera, participa en la translocación de iones hidronio o sodio [Fillingame, 1990]. Por analogía con el Asp85 y 96 de la bacteriorrodopsina, los cuales están fuertemente implicados en el movimiento de protones de un lado al otro de la membrana [Rochschild, 1992], se puede suponer que este carboxilo esencial reactivo a $(\text{Chxn})_2\text{C}$, tiene una función parecida en la ATPsintasa/ATPasa. En apoyo de lo anterior Kluge y Dimroth (1993) observaron que el sodio y el litio protegen a la ATPsintasa/ATPasa de *Propionigenium modestum* contra la inactivación por $(\text{Chxn})_2\text{C}$. Lo interesante y sugestivo de estos resultados, es poder racionalizar cómo un ion sodio se puede unir a un carboxilo en un medio de constante dieléctrica baja y después desalojarse. Hasta el momento cómo los hidronios o los iones sodio son translocados a través del F_0 , sigue siendo tema de especulación.

El cómo se transmite la energía del $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ o $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ desde el F_0 hasta la F_1 es todavía desconocido, pero en la actualidad hay datos que sugieren algunas ideas: i) el hecho de que la energización de la membrana cambie las energías de unión por ADP, Pi y ATP indica que los sitios catalíticos de la F_1 tienen un cambio conformacional durante la fosforilación oxidativa o la fotofosforilación. ii) El mismo razonamiento se aplica a la salida de la proteína inhibidora del sector F_1 promovida por energía (ver más adelante). Capaldi y colaboradores han mostrado que en *E. coli*, la energización altera la posición de las subunidades pequeñas de la F_1 en relación a los pares α/β , lo que sugiere que las subunidades γ , δ y ϵ pueden estar involucradas en la transmisión secuencial de energía a los pares α/β [Gogol y cols., 1990; Aggeler y Capaldi, 1993]. iii) Además se ha visto que dos de las subunidades β de la F_1 de cloroplasto, cambian sus propiedades de unión de nucleótidos durante la catálisis, posiblemente por su interacción asimétrica con $\gamma\delta\epsilon$ [Shapiro y McCarty, 1990]. Esta interpretación está de acuerdo con la hipótesis de "cambio de unión" (binding change) de Boyer (1993) y Cox y cols., (1984). iv) Finalmente el grupo de Hatefi ha demostrado que la unión de oligomicina al F_0F_1 en partículas submitocondriales disminuye la constante de segundo orden para la unión del ATP en condiciones de unisito en los sitios catalíticos de la F_1 (una distancia de 2 a 9 nm) de 10^6 a $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [Matsuno-Yagi y Hatefi, 1985 y 1988]. Estos datos se pueden interpretar como que la unión del antibiótico al F_0 ocasiona un cambio conformacional de las subunidades del F_0 , tal que modifica a los sitios catalíticos en la F_1 y se puede especular que un cambio así puede ocurrir después de la protonación (o unión de Na^+), y que es transmitido a las subunidades catalíticas. Lo anterior resulta en una disminución de

la afinidad de los sitios catalíticos por el ATP y la proteína inhibidora (ver proteínas reguladoras de las F-ATPasas), así como un incremento en la afinidad de estos mismos sitios por el ADP y el P_i por estos mismos sitios [Hatefi, 1993].

PROTEINAS REGULADORAS DE LAS F-ATPasas.

Los agentes reguladores de la ATPsintasa/ATPasa de carácter proteico *in vivo* que se han caracterizado hasta el momento son dos y se han aislado a partir de las mitocondrias de corazón. Ambas entidades son de bajo peso molecular (< 20 kDa), y estables a altas temperaturas (60-80°C). La inhibición causada por la primera, IF₁, es revertida por el potencial de membrana [Dreyfus y cols., 1981; Lippe y cols., 1988a]; la inhibición por la segunda (CaBI) se revierte por el aumento en la concentración de Ca²⁺ [Yamada y Husel, 1983].

La presencia de proteínas inhibidoras en la regulación de intermediarios del metabolismo no es un mecanismo usual, pero no es desconocido. Se han descrito, por ejemplo, proteínas estables al calor que inhiben a la proteína fosfatasa 1 (de la cascada del AMP cíclico) [Huang y Glinemann, 1976], y a la deshidrogenasa fosfatasa de α -oxoácidos de cadena ramificada [Damuni y cols., 1986].

La existencia de cantidades estequiométricas de proteínas inhibidoras es una vía de control de enzimas, que aún no está claro cómo o porqué se utiliza en la naturaleza. Una posibilidad es, que el tamaño de la proteína ocupe una región tal, que interactúe con varios sitios de la enzima a la que regula, dando por resultado un sistema con una afinidad y una especificidad muy alta. De hecho, la K_d de la unión de IF₁ a la ATPsintasa/ATPasa está en los límites nanomolares [Gómez-Fernandez y Harris, 1978].

El inhibidor de la ATPsintasa/ATPasa dependiente del potencial.

Estructura, e interacción con la ATPsintasa/ATPasa.

El inhibidor natural de la ATPsintasa/ATPasa se ha aislado a partir de las mitocondrias de varias especies eucariontes, incluyendo a los mamíferos [Pullman y Monroy, 1963; Cintron y Pedersen, 1979; Yamada y Husel, 1988; Jerome y cols., 1990], aves [Rouslin, 1987], tripanosomas [Rilo y cols., 1989], levaduras [Satre y cols., 1975] y plantas [Norling y cols., 1990]. No se han detectado proteínas homólogas en bacterias o los cloroplastos, pero en estas especies, la pequeña subunidad ϵ de la F₁, a menudo exhibe propiedades inhibitorias [Nelson y cols., 1972; Smith y Sterweis,

1977; Dreyfus y Satre, 1984).

Se conocen las secuencias de IF₁ de corazón de res [Frangione y cols., 1981; Runswick y cols., 1986], *Candida utilis* [Matsubara y cols., 1981], *Saccharomyces cerevisiae* [Dianoux y Hoppe, 1987], e hígado de rata [Lebowitz y Pedersen, 1993]. Al comparar las secuencias muestran un grado considerable de similitud [Hashimoto y cols., 1990; Lebowitz y Pedersen, 1993]; varían considerablemente en tamaño entre especies desde 7.5 kDa en levadura [Dianoux y Hoppe, 1987], hasta 12.5 kDa en la rata [Cintrón y Pedersen, 1979]. Por otra parte, se cree que el núcleo de la proteína está conservado como una α hélice anfíplica [Harris, 1984; Jackson y Harris, 1986], cuyo lado hidrofílico es responsable de la interacción con la F₁. Se han aislado anticuerpos anti-IF₁ que inhiben [Dreyfus y cols., 1981; Audinet y cols., 1986] o no afectan su unión a la F₁ [Husain y cols., 1985]; una explicación a estos resultados puede ser que los epítopos que reconocen los anticuerpos son diferentes para cada línea de ellos y por esto mismo unos afectan, reconocen sitios importantes para la interacción y, otros no afectan, reconocen sitios de unión que no involucran la interacción entre el péptido regulador y la enzima.

Se conoce cuáles son los residuos en el IF₁ que son esenciales para la inhibición de la actividad enzimática o para percibir los cambios del potencial de energía en la membrana. En el IF₁ de corazón de res, los residuos 1-9 pueden remover proteolíticamente sin afectar su actividad inhibitoria, si se quitan más de éstos, la proteína pierde su función [Dianoux y cols., 1982]. Se han sintetizado péptidos análogos que corresponden a la región conservada de las proteínas inhibitorias provenientes de las mitocondrias de corazón de res, de *Candida utilis* y de *Saccharomyces cerevisiae*. Al comprobar la actividad inhibitoria de cada uno de estos péptidos se encontró que los valores de la I₅₀ correlacionan muy bien con los obtenidos para cada una de las proteínas nativas [Stout y cols., 1993].

En la secuencia de la proteína inhibitoria de corazón de res y de hígado de rata se han encontrado 5 residuos de histidina conservados. Se ha propuesto que estos residuos intervienen en la unión de IF₁ con la F₁, y se ha demostrado que este evento sucede en menor magnitud cuando se ha tratado a la proteína inhibitoria con dietil pirocarbonato [Guerrieri y cols., 1987]; por otra parte, se ha propuesto la misma función para estas histidinas, utilizando metales divalentes como Zinc, Cadmio, Cobalto, Níquel y Calcio [Chernyak y cols., 1985; Rouslin y cols., 1993]. Pero la función de estos residuos no se puede concluir, ya que están ausentes en la proteína homóloga de levadura que, igual a todas las reportadas de diferentes fuentes, tienen reacción cruzada con los anticuerpos contra la F₁ de corazón de res [Harris y Das, 1991].

El IF₁ inhibe la actividad de hidrólisis de la F₁ en una relación molar de 1:1 con una K_d = 10⁻⁶ M [Gómez-Fernández y Harris, 1978]. Al parecer, en la unión está

involucrada la región *C-terminal* de una de las subunidades β [Jackson y Harris, 1988] y no su sitio activo (colocado en la región central de la misma subunidad [Duncan y cols., 1986]). Se ha visto que la unión del IF_1 a la F_1 ocasiona que quede atrapado un mol de nucleótido por mol de F_1 en uno de los sitios catalíticos [Di Pietro y cols., 1988; Milgrom, 1991]. El nucleótido atrapado no se libera al medio en presencia de Mg-ATP a pH 8.0, por lo menos durante 20 min, lo cual sugiere que tiene un recambio muy lento en el complejo F_1I [Milgrom, 1991].

El efecto inhibitor del IF_1 se observa tanto en la catálisis unisitio (con un número de recambio que no involucra cooperatividad intersubunidades), como en la catálisis multisitio (en la cual hay cooperatividad intersubunidades) [Kalashnikova y cols., 1988; Harris, 1989]. Esta propiedad contrasta con lo reportado para inhibidores como la azida [Harris, 1989] y la subunidad ϵ en bacterias y los cloroplastos [Dunn y cols., 1987; Andrajole y Harris, 1990], los cuales inhiben solamente cuando existe cooperatividad entre sitios *i.e.* la catálisis multisitio.

Dentro de los modelos que se tienen para explicar en donde ejerce su función inhibitoria el IF_1 en la F_1 , se piensa que el IF_1 interactúa con el *C-terminal* de una de las tres subunidades β de la F_1 [Jackson y Harris, 1988; Klein y cols., 1980], a la cual se le ha denominado como β' , para diferenciarla de las otras dos. Dado que la estequiometría del IF_1 en el complejo ATPsintasa/ATPasa es de 1:1, debe existir una subunidad β que tiene mayor afinidad por el IF_1 . Este fenómeno constituye una de las evidencias para explicar la asimetría intrínseca de la ATPsintasa/ATPasa. Pero en estudios recientes se ha encontrado que el IF_1 se une en la vecindad de las subunidades α y β . Como ejemplo se tienen los experimentos del grupo de Tagawa [Mimura y cols., 1993] quienes trabajando con la enzima de las mitocondrias de levaduras (que tiene tres subunidades reguladoras: el IF_1 , y las proteínas de 9 y 15K), construyeron mutantes carentes de una o más de las proteínas reguladoras y usando el reactivo de entrecruzamiento EEDQ (que tiene una longitud de cero átomos de carbono), comprobaron que el IF_1 se une tanto a la subunidad α como a la β . Estos resultados, sugieren que el sitio de unión del IF_1 está en la interfase entre estas dos subunidades, que por mucho tiempo se pensó era el sitio catalítico de la F_1 .

En este sentido, existen en la actualidad nuevas aportaciones derivadas de experimentos de biología molecular, por ejemplo, se conoce el sitio de interacción del IF_1 en la F_1 que incluye la secuencia DELSEED (código de aminoácidos de una sola letra), que corresponde a los residuos 394-400 de la subunidad β [Jackson y Harris, 1988]; por otra parte, las ATPasas de tipo "F" son inhibidas reversiblemente por una variedad de cationes anfipáticos [Bullough y cols., 1989a], incluyendo a la quinacrina, la cual se une también a la región DELSEED de la subunidad β [Bullough y cols., 1989b] y el decalinio, el cual interactúa con la región adyacente [Zhao y cols., 1993]. Es posible que esta región en la subunidad β sea parte del sitio de unión de una gran variedad de cationes anfipáticos inhibidores de la enzima [Bullough y cols., 1989a].

La región carboxilo terminal de la subunidad β en donde se encuentra la región DELSEED, consiste de una trenza de seis α -hélices, y provee de un mayor contacto entre las subunidades β catalíticas y la estructura central (formada por α -hélices) en la subunidad γ . Es muy posible que la unión del IF_1 a este dominio de la subunidad β en la F_1 modifique las interacciones propias de la catálisis y de la inhibición de la enzima [Walker, 1994].

Se ha encontrado una pequeña relación en la secuencia del carboxilo terminal de la subunidad β y el IF_1 de corazón de res que tal vez explique el mecanismo inhibitorio [Stout y cols., 1993]. Si la región homóloga en el IF_1 compite por el sitio de unión en la secuencia relacionada en la subunidad β , entonces se previenen interacciones esenciales. Probablemente, estas interacciones incluyan a la región central de la subunidad γ y la región carboxilo terminal de la subunidad β [Walker, 1994]. Segmentos de péptidos sintéticos de la región carboxilo terminal de la subunidad β actúan como inhibidores de la F_1 [Stout y cols., 1993], y sostienen esta idea.

Efecto del estado energético sobre la acción inhibitoria de IF_1 .

Efectos sobre la hidrólisis del ATP.

Como se mencionó con anterioridad, la disipación de un potencial de membrana ($\Delta\psi$) a través de la membrana interna mitocondrial (e.g. al iniciarse el flujo de electrones, por la oxidación de sustratos respiratorios), ocasiona una activación de la capacidad de hidrólisis de la ATPsintasa/ATPasa tanto en partículas submitocondriales como en las mitocondrias intactas. Este fenómeno se debe al movimiento del IF_1 de su sitio de inhibición en la enzima [van de Stadt y cols., 1973; Schwerrmann y Pedersen, 1986; Dreyfus y cols., 1981]. Bajo estas condiciones, cuando las interacciones no específicas se suprimen (+ 50 Mm de KCl o + citocromo *c*), el IF_1 se libera de la membrana hacia el medio [Schwerrmann y Pedersen, 1981]. El curso temporal y la cantidad de inhibidor liberado corresponden directamente con el incremento en la capacidad de hidrólisis observada [Schwerrmann y Pedersen, 1981; Lippe y cols., 1988b; Husain y Harris, 1985].

Si se omiten la sal y/o el citocromo *c* de estos experimentos, algo del IF_1 se encuentra asociado con las membranas mitocondriales, pero no inhibe la actividad de hidrólisis [van de Stadt y cols., 1973; Cintron y Pedersen, 1979; Dreyfus y cols., 1981; López-Mediavilla y cols., 1993]. Esta unión es más evidente en preparaciones que contienen detergentes [Chernyak y cols., 1987]. Lo anterior indica la presencia de sitios de unión del IF_1 no inhibidores en la membrana interna mitocondrial [Rouslin y cols., 1993].

Buscando los sitios de unión no inhibitorios de IF_1 en la membrana interna mitocondrial, el grupo de Godinot encontró que además de unirse a la subunidad β de la F_1 , el IF_1 se une a una proteína membranal de bajo peso molecular (5-6 kDa). Estos resultados, se obtuvieron utilizando anticuerpos monoclonales contra IF_1 , además de reactivos de entrecruzamiento en partículas submitocondriales. A partir de estos experimentos se concluyó que al entrecruzar a esta proteína con IF_1 , se obtiene un producto de 15-16 kDa, que migra diferente del IF_1 o de su dímero en geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Una vez que el complejo IF_1 -proteína de 5-6 kDa, se ha aislado, se puede disociar parcialmente al inhibidor. Con estos experimentos se confirma la idea de que el IF_1 se une a sitios inhibitorios en la subunidad β de la F_1 y a sitios no inhibitorios que se encuentran en la membrana en una proteína de bajo peso molecular [López-Mediavilla y cols., 1993].

La re-unión del IF_1 a la F_1 ocurre en suspensiones de membranas, y se estimulada con Mg-ATP [Cintron y Pedersen, 1979; Gómez-Fernández y Harris, 1978]. Este proceso ocurre a pH moderadamente ácido y requiere la hidrólisis de aproximadamente 1,000 moléculas del ATP por molécula de ATPsintasa/ATPasa para una unión eficiente [López-Mediavilla y cols., 1993]. Entonces en la membrana interna mitocondrial, la interacción del IF_1 con la F_1 parecen estar en un estado estacionario hasta que algún factor externo -como el $\Delta\psi$ - promueva la remoción del IF_1 y/o su re-unión con Mg-ATP [Harris, 1984; Lippe y cols., 1988a]. El equilibrio dinámico, en el cual la unión y liberación de IF_1 ocurre simultáneamente en el total de las moléculas de ATPsintasa/ATPasa ha sido demostrado en partículas submitocondriales de corazón de res [Power y cols., 1983].

Efectos sobre la síntesis del ATP.

La característica más controvertida de las funciones del IF_1 , es la relación que existe entre el contenido de IF_1 (o la capacidad de hidrólisis), y la actividad de la enzima en dirección de la síntesis del ATP. De hecho, se esperaría que tanto la síntesis como la hidrólisis involucren a los mismos sitios en la enzima; entonces IF_1 inhibiría a ambas reacciones igualmente, pero el IF_1 claramente sólo inhibe a la hidrólisis cuando se induce por el flujo de protones [Schwermann y Pedersen, 1981], o vía gradientes de pH artificiales [Husain y Harris, 1983]. El grupo de Harris propone que existe una estrecha correlación entre la cinética de activación de la hidrólisis y la capacidad de síntesis en partículas submitocondriales [Lippe y cols., 1988]. El grupo de Gómez-Puyou propone que la capacidad de hidrólisis (y la liberación de IF_1) es más lenta ($t_{1/2} = 3$ min) que la capacidad de síntesis ($t_{1/2} = 5$ sec) [Tuena de Gómez-Puyou y cols., 1988]. Esta discrepancia en las cinéticas ha sugerido que la síntesis y la hidrólisis ocurren en sitios diferentes de la ATPsintasa/ATPasa [Schwermann y Pedersen, 1986; Tuena de Gómez-Puyou y cols., 1988], en donde la

síntesis es activada por algún proceso aún no conocido, posiblemente con el desplazamiento del IF_1 , que es más rápido que su liberación.

El grupo de Harris optó por tratar de resolver esta paradoja en términos de las anomalías cinéticas de las metodologías utilizadas [Husain y cols., 1985]. Observaron que los cursos temporales de la activación de la hidrólisis y la liberación del IF_1 son bifásicos, con una fase rápida que corresponde a la velocidad de inducción de la síntesis. La fase lenta se interpreta en términos de la pérdida de IF_1 del equilibrio dinámico (e.g. por agregación o adsorción en las paredes de los recipientes usados), siendo un estado de naturaleza no fisiológica. Esta segunda fase incrementa la capacidad de hidrólisis (cuantificada en condiciones desacopladas), incrementando la cantidad de IF_1 liberado de la membrana; De hecho, no hay un incremento en la capacidad de síntesis hasta que un número suficiente de enzimas se han encendido, lo que puede estar limitado por el aporte de energía. Entonces no es necesaria la existencia de sitios diferentes para la síntesis y la hidrólisis para explicar las cinéticas de activación, pero esto no se ha comprobado con exactitud.

El mecanismo de liberación de IF_1 .

El mecanismo por medio del cual el IF_1 es liberado de la ATPsintasa/ATPasa aún no es conocido. No es claro, por ejemplo, cómo el IF_1 , que está de un lado de la membrana, puede percibir los gradientes de carga transmembranal o de pH. Los experimentos que implican a la carga de superficie [Harris y cols., 1979] o la naturaleza de la cabeza de los fosfolípidos [Seeling y cols., 1987] como mediadores de estos efectos, no son concluyentes. Una posibilidad es que el IF_1 puede existir en dos conformaciones que son interconvertibles lentamente en solución [Panchenko y Vinogradov, 1985; Fujii y cols., 1983]; la forma protonada es la forma activa (se une fuertemente a la ATPsintasa/ATPasa), y la transición entre esta forma y la desprotonada tiene un pKa de 6.8 en solución (cambiando a pH 8.8 en el complejo F_0F_1I [Khodjaev y cols., 1990]).

La dependencia del pH para la inhibición de la ATPsintasa/ATPasa por el IF_1 puede atribuirse a uno de tres posibles mecanismos: un efecto global en el complejo F_0F_1 , un efecto en el IF_1 , o un efecto en residuo(s) de F_0F_1 o de IF_1 que está(n) directamente involucrado(s) en la(s) interacción(es) de ambas moléculas. La hipótesis favorecida es que el cambio de pH actúa sobre IF_1 , esta idea se ha incorporado a las de los posibles mecanismos de acción del IF_1 [Panchenko y Vinogradov, 1985; Khodjaev y cols., 1990].

Utilizando la técnica de espectropolarimetría de dicroísmo circular para analizar los cambios de IF_1 en un amplio rango de pH, el grupo de Pedersen

[Lebowitz y Pedersen, 1993], encontró que existen cambios de estructura en el IF_1 (de las mitocondrias de hígado de rata) debidos al cambio de pH. Estos cambios estructurales muestran una dependencia similar a la función del IF_1 . Al disminuir el pH se observa una pérdida de la estructura rígida de hélice que se requiere para la unión del IF_1 , e inhibir la hidrólisis (el pH óptimo de inhibición por el IF_1 es de 6.8). Este trabajo está en concordancia con lo reportado por el grupo de Tagawa [Fujii y cols., 1983], con la proteína inhibidora de levadura y con lo reportado por Sah y colaboradores (1993) con la proteína inhibidora de las mitocondrias de corazón de búfalo. Este último trabajo muestra que a un pH de 6.5, la estimación de la estructura secundaria para el IF_1 es de 0% de α hélice y 63 % de hojas β y el resto por otras estructuras como vueltas β y al azar; por el contrario, a un pH de 8.0 hay 56% de α hélice y sólo 3% de hojas β .

El papel fisiológico del IF_1

El papel fisiológico del IF_1 , es conservar la cantidad del ATP generado principalmente por la fosforilación oxidativa, en condiciones en las cuales la mitocondria no esté acoplada [Ichikawa y cols., 1990]. Existe un número considerable de estudios que señalan que la unión del IF_1 a la ATPsintasa/ATPasa es el regulador fisiológico de la hidrólisis. Por ejemplo, los experimentos de Rouslin (1983), indican que la actividad inhibitoria del IF_1 aumenta durante la isquemia; se han demostrado cambios en los niveles de oxidación en corazones perfundidos por medio del subsecuente aislamiento de las membranas internas mitocondriales, las cuales tienen diferente capacidad de hidrólisis antes (control) y después del tratamiento. Das y colaboradores (1989) también han demostrado que, en un cultivo de miocitos cardíacos, la anoxia decrece la capacidad de hidrólisis en un 40%, y por el contrario una estimulación eléctrica rápidamente la incrementa en aproximadamente 60%. Este incremento se detiene cuando se deja de aplicar el impulso eléctrico. La capacidad para incrementar la velocidad de la hidrólisis está desapareada con el flujo de electrones en la hipertensión arterial y puede revertirse por el tratamiento con drogas [Das y Harris, 1990 y 1991]. Estos resultados, implican que la ATPsintasa/ATPasa está regulada directamente *in vivo*. Esta regulación está mediada por el IF_1 , aunque también los niveles de calcio son muy importantes.

De manera similar a lo anterior, se ha reportado que al cuantificar los niveles del IF_1 en células normales de hígado y en células tumorales como las del hepatoma, la cantidad de IF_1 es mayor en las células anómalas. Este incremento de IF_1 es congruente con el alto grado de glicólisis que se observa en estos tumores [Chernyak y cols., 1987].

LA PROTEINA INHIBIDORA DEPENDIENTE DE CALCIO.

Estructura e interacción con la ATPsintasa/ATPasa.

El tratamiento de algunas preparaciones de partículas submitocondriales de corazón de res [Yamada y Huzel, 1988] o de perro [Rouslin y Broge, 1989] o de músculo esquelético de rata [Yamada y Huzel, 1980] con calcio a una concentración de alrededor de 1 μ M ocasiona un incremento en su actividad de hidrólisis sin la liberación del IF_1 . Esta activación se acompaña de la liberación de una proteína pequeña (6.3 kDa), y estable al calor que se ha llamado **Inhibidor que une Calcio (CaBI)**, que es diferente del IF_1 , tanto antigénicamente, como en la composición de amino ácidos [Di Pietro y cols., 1988; Yamada y Huzel, 1988]. La proteína purificada inhibe la actividad de hidrólisis de las partículas submitocondriales en ausencia de calcio. Se conoce poco acerca de su estructura, su afinidad y sitio de unión en la ATPsintasa/ATPasa. Se supone que la forma de inhibición es a través de un dímero de 12.5 kDa, el cual se disocia en monómeros por acción del aumento en los niveles de calcio [Yamada y Huzel, 1981].

El efecto del CaBI en la síntesis del ATP se ha investigado en partículas submitocondriales de corazón de res (preincubadas previamente para eliminar los efectos del IF_1). En partículas que contienen un alto contenido de CaBI la síntesis del ATP aumenta, y la hidrólisis se inhibe; por el contrario en partículas con un bajo contenido de CaBI, la síntesis es baja y la hidrólisis muy alta [Yamada y Huzel, 1989]. Sorprendentemente, el efecto del CaBI en la síntesis es opuesto al ejercido sobre la hidrólisis (cf. IF_1 , el cual inhibe ambas funciones). En estas investigaciones, no se agregó un sistema secuestrador de ATP-hexoquinasa cuando al cuantificar la síntesis, y los niveles de ATP se determinaron después de 4 min; es posible que los niveles observados del ATP reflejen un balance entre la síntesis realizada por algunas partículas y una alta velocidad de hidrólisis realizada por otras partículas (¿tal vez desacopladas?). Un fenómeno similar se ha observado en ensayos con partículas submitocondriales depletadas del IF_1 [Beltrán y cols., 1986].

El papel del CaBI en la ATPsintasa/ATPasa *in vivo* requiere de mucha más investigación, pues en las mitocondrias de corazón hay un alto contenido de esta proteína (alrededor de 5-10 moles por mol de ATPsintasa/ATPasa [Yamada y Huzel, 1980; Yamada y Huzel, 1988]), y es por ello que es un excelente candidato para conferir sensibilidad al calcio en la regulación de la enzima de corazón.

PROTEINAS INHIBIDORAS DE ATPasas P y V.

Inhibidores de las P-ATPasas.

El ejemplo clásico para una enzima de tipo P es la ATPasa de Na⁺/K⁺ (conocida también como la bomba de sodio), que es responsable del transporte de iones sodio y potasio a través de las membranas de los eucariontes a expensas de la hidrólisis del ATP. La bomba se inhibe específicamente por ouabafina [Schuermans-Stekhoven y Bonting, 1981], por glicósidos endógenos [Fishman, 1979; Tal y cols., 1986] y algunos péptidos que varían en peso molecular [Araki y cols., 1989; Araki y cols., 1990; Ishizuka y cols., 1991; Chandra y cols., 1993]. En el año de 1988 se reportó que un extracto de cerebro de rata puede estimular o inhibir a la ATPasa de Na⁺/K⁺ [Arnaiz y cols., 1988]. A partir de estos resultados, Chandra y cols., (1993) describen la presencia de una proteína inhibidora aislada del citosol de cerebro de rata que inhibe específicamente a la ATPasa de Na⁺/K⁺ de cerebro y riñón y a la ATPasa H⁺/K⁺ de mucosa gástrica de sapo, pero no tiene efecto sobre las Ca²⁺, Mg²⁺-ATPasas y la Ca²⁺-ATPasa aisladas de testículo de rata o de espermatozoides de cabra. Se ha demostrado que la acción inhibitoria por este péptido se ejerce cerca del sitio catalítico de la enzima, su unión es reversible y de naturaleza competitiva con el sustrato. La inhibición óptima se encuentra alrededor de la temperatura de transición de fase de la Na⁺/K⁺ ATPasa y su actividad inhibitoria depende parcialmente de grupos -SH o -NH₂.

Por otra parte, se ha reportado la presencia de un péptido inhibidor de la Ca²⁺-ATPasa del retículo sarcoplásmico [Norayanan y cols., 1983].

Es muy importante hacer notar que las enzimas de tipo P (Na⁺/K⁺ y Ca²⁺-ATPasas), están sujetas a regulación por una multitud de agentes fisiológicos, como las catecolaminas [Horowitz, 1979], las hormonas tiroideas [Smith y Edelman, 1979], los compuestos semejantes a la ouabafina [Fishman, 1979], y péptidos [Araki y cols., 1989; Araki y cols., 1990; Ishizuka y cols., 1991]. Esta regulación tan estricta se debe a que estas enzimas pueden hidrolizar grandes cantidades de ATP, y disminuir de manera importante las reservas del nucleótido; por ello pareciera útil que estén sujetas a un número considerable de factores reguladores.

Inhibidores de las V-ATPasas.

La regulación de la H⁺-ATPasa vacuolar en la acidificación de los organelos, o transepitelial, se ha atribuido a los efectos del gradiente electroquímico ($\Delta\mu\text{H}^+$) a través de la membrana o a cambios en el número de bombas de protones. Recientemente se ha reportado la existencia de una proteína aislada del citosol del riñón de res, que inhibe tanto la actividad de hidrólisis como la translocación de

protones de la H^+ -ATPasa vacuolar. El peso molecular de esta proteína es de 6.3 kDa, muy similar al de la F_0F_1 ATPsintasa/ATPasa mitocondrial, y posiblemente existe como dímero en su forma activa (lo que recuerda al CaBI) [Zhang y cols., 1992 a].

El inhibidor de la H^+ -ATPasa vacuolar ejerce un efecto inhibidor parcial en la ATPsintasa/ATPasa mitocondrial, lo que sugiere que las enzimas vacuolar y mitocondrial pueden tener sitios de unión para el inhibidor semejantes. A diferencia del IF_1 , cuyo efecto inhibitorio es óptimo a un pH menor de 6.5 [Pullman y Monroy, 1963] (probablemente debido al pH relativamente alcalino del interior mitocondrial), el inhibidor de la H^+ -ATPasa vacuolar tiene un efecto máximo a un pH de 7.5. Esta diferencia seguramente refleja el posible papel fisiológico del inhibidor vacuolar: al incrementarse el pH citoplásmico, el inhibidor se torna efectivo y las reservas de ATP permanecen constantes.

Estudios recientes han revelado que la regulación de la inhibición de la ATPsintasa/ATPasa mitocondrial es muy compleja y que participa más de un tipo de proteína inhibidora [Yamada y Husel, 1988; Cintrón y Pedersen, 1979], y dos proteínas de bajo peso molecular adicionales [Hashimoto y cols., 1990]. De una manera similar las proteínas reguladoras de la H^+ -ATPasa vacuolar pueden dar a la célula la regulación de la acidificación independiente y en diferentes organelos. Apoyando esta idea se encuentra el reciente reporte de la identificación de un péptido activador de la enzima vacuolar [Zhang y cols., 1992b].

Todo lo anterior ayuda a reforzar los datos que se han obtenido por numerosos experimentos y evidencias filogenéticas, para colocar a las enzimas de tipo F y P dentro de un mismo linaje evolutivo [Nelson y Taiz, 1989; Gogarten y cols., 1989].

JUSTIFICACION.

La ATPsintasa/ATPasa es una enzima compleja, tanto desde el punto de vista estructural como funcional, que desde hace mucho tiempo ha sido estudiada por ser la que lleva a cabo la síntesis del ATP durante la fosforilación oxidativa y la fotofosforilación. Actualmente se conoce mucho acerca de su composición polipeptídica y existen estudios recientes enfocados a resolver su estructura con exactitud. Por otra parte, el mecanismo por medio del cual se genera ATP a partir de ADP y Pi no está del todo claro.

La complejidad estructural de esta enzima ha obligado a resolver preguntas utilizando cada uno de sus componentes (al sector F_0 , al sector F_1 , al sector F_1 -proteína inhibidora y al complejo F_0F_1) individualmente. Existen metodologías diferentes para el aislamiento y purificación de la enzima tanto para el complejo integral (F_0F_1), como para cada uno de sus componentes por separado el F_0 y la F_1 ; sin embargo, en condiciones nativas, la ATPsintasa mitocondrial está constituida por la porción F_0 y la porción F_1 con la proteína inhibidora unidas por las subunidades del cuello. Es precisamente este hecho el que ha ocasionado una falta de claridad en cuanto a la composición polipeptídica del complejo F_0F_1 de organismos eucariontes, pues en algunas preparaciones se encuentran proteínas que en otras no; todo depende de la metodología que se utilice para aislar y purificar al complejo. Por otra parte, se han realizado estudios sobre el sistema nativo en partículas submitocondriales [e.g. Tuena de Gómez-Puyou y cols., 1983]; existe sólo un trabajo que reporta el aislamiento de un complejo F_0F_1 -proteína inhibidora de mitocondrias de corazón de res, con el cual se obtuvieron las secuencias amino terminales de las subunidades de las que no se tenía esta información [Walker y cols., 1991].

Es importante desarrollar una metodología que permita el aislamiento de un complejo ATPsintasa/ATPasa mitocondrial de manera integral (F_0F_1 -proteína inhibidora), que corresponda a la forma nativa estructural y funcional de la enzima.

En el laboratorio se cuenta con una metodología que permite obtener un complejo F_0F_1 -proteína inhibidora de mitocondrias de corazón de res, el cual se ha caracterizó parcialmente en el sentido de la hidrólisis del ATP. Este complejo enzimático posee características que van de acuerdo con lo reportado para el sector F_1I (Adolfson y cols., 1975 y Gómez-Puyou y cols., 1986), y con complejos F_0F_1 [Stigall y cols., 1978; Dreyfus y cols., 1984; Laird y cols., 1986, Walker y cols., 1991].

Este estudio permitió la comparación de dos diferentes preparaciones de ATPsintasa/ATPasa, una que está libre del efecto funcional de la proteína inhibidora (complejo F_0F_1 , activo) [Dreyfus y cols., 1984] y otra que posee física y funcionalmente al péptido inhibidor (complejo F_0F_1 , latente) [Vázquez-Contreras, 1992]. La comparación se realizó tomando el protocolo para aislar al complejo F_0F_1 , tal cual había sido reportado por Dreyfus y colaboradores (1984), lo que implica que la solubilización de la enzima de las partículas submitocondriales se lleva a cabo con el detergente Lauril dimetilamino óxido. Las características de ambas preparaciones se muestran en la Tabla 1.

Característica	F_0F_1I	F_0F_1
Hidrólisis (control)	1.2	4
Hidrólisis + Oligomicina	0.15(85-95)	0.6(80-90)
Hidrólisis + DCCD	0.18(80-90)	0.6(80-90)
Rendimiento (de proteína inicial)	6 %	8 %
Efecto de preincubación (60°C)	9.99(833)	No hay efecto
Efecto de preincubación (KCl)	3.0(250)	No hay efecto
Parámetros cinéticos	$V_{max} = 1.3; K_m = 148$	$V_{max} = 3.9; K_m = 142$
Efecto del magnesio libre	Inhíbe por arriba de 6mM	Inhíbe por arriba de 6mM
Efecto del pH a 60°	pH ácido (6.8) permite una mejor estimulación	La actividad decrece más rápidamente con pH ácido (6.8).

Tabla 1. Comparación de las características funcionales de los complejos F_0F_1 activo [Dreyfus y cols., 1984] y F_0F_1I (Vázquez-Contreras, 1992). Hidrólisis en $\mu\text{mol/min} \cdot \text{mg}^{-1}$. La V_{max} en $\mu\text{mol/min} \cdot \text{mg}^{-1}$ y la K_m en μM . Los experimentos se realizaron con 10 μg del complejo en 350 μl y a 30°C y 15 min. Los números entre paréntesis señalan el porcentaje de estimulación o inhibición del control.

OBJETIVO.

En el laboratorio, como ya se mencionó, se desarrolló una metodología que permite obtener un complejo F_0F_1 -proteína inhibidora de mitocondrias de corazón de res presumiblemente en estado nativo, el cual se ha caracterizado parcialmente en el sentido de la hidrólisis. Este complejo enzimático posee características que concuerdan con lo reportado para el sector F_1 con la proteína inhibidora presente, por lo cual se le designa como complejo F_0F_1 latente por homología con el complejo F_1F_1 al cual se le designa como complejo F_1 latente, pues bajo ciertas condiciones es capaz de aumentar la velocidad de hidrólisis del ATP debido a la remoción de la proteína inhibidora. Por otra parte, la actividad de hidrólisis es sensible a los inhibidores clásicos de las enzimas "F" (oligomicina y DCCD).

El objetivo principal de este proyecto se relaciona muy estrechamente con el conocimiento de las propiedades estructura-función de la ATPsintasa/ATPasa de mitocondrias de corazón de res. Tomando en cuenta que las funciones fisiológicas de la enzima (complejo F_0F_1 -proteína inhibidora), están desplazadas hacia el sentido de la síntesis del ATP y que la hidrólisis del mismo por este complejo ha sido parcialmente caracterizada, en este trabajo se pretende estudiar a la ATPsintasa/ATPasa en el sentido de su función fisiológica, la síntesis del ATP, monitoreada a través de la reacción de recambio $ATP \rightarrow ^{32}P_i$, y estudiando a la par la hidrólisis del ATP en un sistema reconstituido en liposomas.

La estrategia a seguir consiste en cuantificar el efecto de la presencia de la proteína inhibidora en el complejo ATPsintasa/ATPasa en las reacciones que cataliza comparando contra un complejo carente de la regulación del péptido inhibidor (complejo F_0F_1 activo).

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento de las mitocondrias de corazón de res.

Las mitocondrias se aislaron a partir de corazones frescos de res. Todo el procedimiento se realizó a 4°C. Se siguió básicamente el método descrito por Lów y Vallin [1963]. Se eliminó el tejido conjuntivo y la grasa. Se molió el músculo, por cada 400 g de carne molida se añadió 1.2 l de sacarosa 0.25M, EDTA 0.015M, Tris-Cl 0.005M (pH 7.4). Se ajustó el pH a 8.0 con una solución de Tris saturada. En una licuadora Waring se homogeneizó durante 5s por 1min. Inmediatamente después, se reajustó el pH a 8.0 con Tris saturado. El homogenado se centrifugó a 7,500 x g por 10 min, en un rotor Sorvall GS3. El sobrenadante se filtró a través de 2 capas de gasa, el filtrado se centrifugó a 25,000 x g por 10min, en un rotor Sorvall GSA. Se eliminó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en sacarosa 0.25M, Tris-Cl 0.005M (pH 7.4). Se homogeneizó y centrifugó a 25,000 x g por 10min en un rotor GSA. La pastilla resultante está compuesta por dos fracciones: en la superior se encuentran las mitocondrias ligeras, y en la inferior, las mitocondrias pesadas, lo cual se refiere a qué tan bien selladas están sus membranas. Con una solución de Sacarosa 0.25M, Tris-Cl 0.005M (pH 7.4) se ajustó la concentración de proteína a aproximadamente 60 mg/ml para las mitocondrias pesadas, mientras que las ligeras se resuspenden en el volumen que las contiene. La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método del biuret [Gornal y cols., 1949]. Las mitocondrias se almacenaron en alícuotas a -70°C hasta su utilización.

Preparación de las partículas submitocondriales de Klein.

Se siguió el método descrito por Klein y colaboradores (1982). Se resuspendió una alícuota de mitocondrias ligeras a 20 mg/ml en sacarosa 0.25M, KCl 0.075M, Tris-SO₄ 0.03M (pH 8.0), EDTA 0.002M (pH 8.0 con H₂SO₄). Se sonicó en lotes de 20 ml por 45 s tres veces en un sonicador Branson 250, con intervalos de 15 s de descanso, en un baño de agua-hielo. El sonicado se centrifugó por 20 min a 37,500 x g y 4°C. Se incubó el sobrenadante por 60 min a 30°C, transcurrido este tiempo se centrifugó a 75,000 x g durante 90 min a 25°C en un rotor 60ti. El sobrenadante se guardó a -70°C (a partir de él se aísla la proteína inhibidora). El precipitado se resuspendió en sacarosa 0.25 M, Tris 0.005 M (pH 7.4), y se determinó la concentración de proteína por el método de biuret [Gornal y cols., 1949], y la actividad

de hidrólisis por el método espectrofotométrico [Pullman y cols., 1960]. las partículas se almacenaron en alícuotas en nitrógeno líquido, hasta su utilización.

Si se parte de 2.0 a 2.5 g de mitocondrias se obtienen aproximadamente 700 mg de partículas submitocondriales. La actividad de hidrólisis de éstas fue de alrededor de $5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$

Preparación de las partículas submitocondriales Mg-ATP.

Se siguió el método descrito por Lee y Ernster [1967]. Se resuspendieron mitocondrias pesadas a una concentración de 10 mg/ml con sacarosa 0.25M, ATP 0.006M, Acetato de Magnesio 0.006M, y se ajustó el pH entre 6.9 y 7.1 con una solución de NaOH concentrado, se sonicó la suspensión en alícuotas de 20 ml durante 5 períodos de 45 segundos y 15 segundos de descanso, en un sonicador Branson 250, procurando no elevar la temperatura por arriba de 10°C , utilizando un baño agua-hielo. El sonicado se centrifugó a $37,500 \times g$ por 15 min y 4°C en un rotor SS34; el sobrenadante que contiene a las psm Mg-ATP se centrifugó a $100,000 \times g$ por 45 min a 4°C en un rotor 60Ti. El precipitado se resuspendió en el volumen inicial con sacarosa 0.25M. y se repitió el paso anterior. A continuación, se resuspendió a las partículas en el mínimo volumen posible con sacarosa 0.25M y se cuantificó la concentración de proteína por el método del biuret [Gornal y cols., 1949]. Las partículas se almacenaron en alícuotas en nitrógeno líquido hasta su utilización.

Si se inicia con 2.0 a 2.5 g de mitocondrias se obtienen aproximadamente 600 mg de partículas submitocondriales. Dado que la ATPsintasa/ATPasa contenida en estas partículas está regulada por el IF₁, la actividad de hidrólisis fue menor a $1 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$.

Aislamiento del complejo F₁F₀.

Se siguió como base el método reportado por Dreyfus y colaboradores (1984), con la siguiente modificación: el detergente utilizado fue el n-Dodecil β D-Maltósido (lauril maltósido (LM)) en vez del lauril dimetilamino óxido. A partir de 13.5 mg de psm-Klein, se llevó la concentración a 3 mg/ml con sacarosa 0.15M, EDTA 0.002M (pH 7.5) en 4.5 ml. Se agregó a esta solución un volumen igual de LM 9mg/ml gota a gota en agitación constante y a 4°C durante 30 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugó 60 min a $100,000 \times g$ y 4°C en un rotor 50Ti. El sobrenadante resultante, se aplicó a una columna cromatográfica (1 X 5 cm), cargada con sefarosa-hexilammonio, previamente equilibrada con Tris-Cl 0.02M (pH 7.5), EDTA 0.002M, Colato de Sodio 0.01M, fosfatidil colina 3 mg/ml (sonicada para dispersar). El flujo de elución fue de

3 ml/15 min. Se lavó con 40 ml del mismo amortiguador y, se eluyó con 12 ml del mismo amortiguador más KCl 1M. A continuación, se precipitó con un volumen de sulfato de amonio saturado a (pH 7.5) y se incubó durante 30 min a 4°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó 15 min a 25,000 x g y 4°C en un rotor SS34. Se resuspendió en el mínimo volumen posible de Tris-Cl 0.02M (pH 7.5), EDTA 0.002M, Colato de Sodio 0.01M, sacarosa 0.25M, fosfatidil colina 30 mg/ml (sonicada para dispersar), esta solución debe usarse con los lípidos recién sonicados. Se cuantificó la proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA) [Smith y cols., 1985].

El complejo F_1F_1 , se puede guardar en nitrógeno líquido por aproximadamente seis meses sin perder ninguna de sus propiedades.

Aislamiento del complejo F_1F_1I .

Se siguió la metodología reportada por Vázquez-Contreras [1992]. A partir de 13.5 mg de psm Mg-ATP, se lleva la concentración a 3 mg/ml en un volumen de 4.5 ml, con sacarosa 0.15M, MES-Tris 0.02M (pH 6.8), ADP 0.1M ; se agregó gota a gota a la solución de psm un volumen igual de LM 9 mg/ml en agitación constante y a 4°C. se centrifugó a 100,000 x g durante 60 min y a 4°C en un rotor 50Ti. El sobrenadante se aplica a una columna cromatográfica (1 x 5 cm), cargada con sefarosa hexil-amonio, equilibrada previamente con 20 ml de MES-Tris 0.02M, EDTA 0.002M, Colato de sodio 0.01M, ADP 0.005M, fosfatidil colina 3 mg/ml (sonicada para dispersar). Se eluyó a un flujo de 3ml por 15 min y, colectado en fracciones de 3 ml. Se lavó la columna con 40 ml del mismo amortiguador con un flujo de 3 ml por 10 min. y se eluyó con 12.5 ml del amortiguador, más KCl 1M a un flujo de 2.5 ml por 15 min. Se precipitó con un volumen de sulfato de amonio saturado (pH 6.8) a las fracciones 2 y 3, que contienen a la proteína (previa verificación por método de Bradford [1976]). Se incubó 30 min a 4°C y se centrifugó a 37,500 x g durante 15 min a 4°C en un rotor SS34. La pastilla se resuspendió con 50µl de sacarosa 0.25M, MES-Tris 0.02M, EDTA 0.002M, Colato de sodio 0.002M, ADP 0.0001M (pH 6.8), fosfatidil colina 30 mg/ml (sonicada para dispersar). Esta solución debe de usarse con los lípidos recién sonicados. La concentración de proteína se cuantificó por el método de BCA [Smith y cols., 1985].

Determinación de la concentración de proteína.

Biuret

Gornal y cols., 1949.

Este método se utilizó para cuantificar la concentración de proteína de las suspensiones de mitocondrias y partículas submitocondriales. A partir de una fracción que contenga de 0.1-2.0 mg de proteína, se agregó 0.8 ml de agua, 0.2 ml de desoxicolato de sodio (2 %), 2.0 ml del reactivo de biuret (1.5 g de CuSO_4 , 6.0 g de tartrato de sodio y potasio en 500 ml de agua; después 300 ml de NaOH (10 %), y aforar a un litro. Toda la solución se preparó con agua destilada y hervida para evitar la presencia de CO_2). Se agitó e incubó 15 min, y se leyó a 540 nm contra un tubo blanco sin proteína. Para la curva estándar se utilizó albúmina de suero de res 100 mg/ml; 1 mg de albúmina en el ensayo produce una absorbencia de 0.085.

Bradford o Azul de Coomassie.

Bradford, 1976.

Este método se utilizó para cuantificar las proteínas del material soluble y es confiable hasta para 10 μg proteína en la muestra. La solución colorante se prepara agregando 100 mg de azul de Coomassie a 50 ml de etanol (95 % v/v), se mezcla con 100 ml de ácido fosfórico (85 % v/v) y se afora a 1 l con agua destilada. Se filtra y se conserva en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

Se agregaron dos mililitros de la solución de Bradford a la muestra de proteína en un mililitro, y dos minutos después de haberla agitado, se lee a 595 nm, contra un tubo blanco carente de proteína. Para la curva estándar se utilizó albúmina de suero de res 1 mg/ml. Para las muestras que contienen detergentes, se agregó la concentración correspondiente en los tubos de la curva estándar para evitar las posibles interferencias.

Acido bicinconánico (BCA)

Smith y cols., 1985

Este método se utilizó para cuantificar la concentración de proteína de los complejos enzimáticos ya purificados, y se utilizó en su modalidad de 1 ml y a una temperatura de 60° C, utilizando el kit de Pierce and Warriner Ltd., Chester, U. K.

Determinación de la Hidrólisis de ATP.

Acoplada a la oxidación del NADH

Pullman y cols., 1960

Este método se basa en el acoplamiento de las actividades de hidrólisis del ATP de la ATPsintasa/ATPasa, la piruvato cinasa (PK) y la deshidrogenasa láctica (DL). Se determina la velocidad de desaparición del NADH, sabiendo que el coeficiente de extinción molar para el NADH a 340 nm es: $\epsilon = 6.22 \text{ Mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

La muestra de ATPasa se agregó en 2 ml de un medio de reacción, cuya absorbencia se ha ajustado previamente a 1.0 y que contiene 2 ml de sacarosa 0.05M, ATP 0.003M, Tris 0.05 M (pH 8.0), KCl 0.03 M, MgCl₂ 0.003 M, fosfoenolpiruvato 0.0015 M, 5.5 U de piruvato cinasa, 30 U de deshidrogenasa láctica, 0.027 Mm de NADH.

La actividad de hidrólisis se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad específica} = \text{D.O.} \times 2 \text{ ml} / 6.22 \times \text{min} \times \text{proteína (mg)}$$

($\mu\text{mol/min/mg}$)

Se recomienda usar esta metodología para seguir los cursos temporales de la hidrólisis de ATP, su límite de sensibilidad está en concentraciones micromolares.

Cuantificación del fosfato liberado por el método colorimétrico de Fiske y Subbarow (1925).

Una muestra de proteína (30 μg de partículas submitocondriales, o de 5 a 30 μg de los complejos F_0F_1 o F_1F_0), se llevó a 0.1 ml con sacarosa 0.25M, TrisCl 0.005M (pH 7.4); se añaden 0.25 ml del medio de reacción (Tris-SO₄ 0.1M (pH 7.8), ATP 0.003M, MgCl₂ 0.005M, fosfoenolpiruvato 0.004M (concentraciones finales), 3.65 μl de piruvato cinasa/ml). Se incubó a 30°C (5 a 10 min las partículas submitocondriales, y de 10 a 15 min para F_0F_1 o F_1F_0). La reacción se detuvo agregando 0.1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 30% dejando los tubos en hielo. Paralelamente, se agregó 0.1 ml de la enzima en sacarosa directamente en 0.1 ml de TCA, antes de añadir el medio de reacción (blancos con TCA). Se centrifugó durante 5 min a 12,500 x g en una centrífuga clínica y, se tomaron 0.2 ml del sobrenadante y se agregaron a 0.8 ml de agua. Se añadieron 0.25 ml de molibdato de amonio (a 800 ml de agua destilada agregar lentamente, y en frío, 111 ml de H₂SO₄ (36 N); posteriormente, 50g de molibdato de amonio. El volumen se lleva a 1l con agua destilada). Se agregaron 0.25 ml de solución de Elon (Kodak) (10g de Sulfato de Elon, 30g de metabisulfito de sodio

se aforan a 1l con agua), y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se leyó a una longitud de onda de 660 nm contra un tubo blanco (i.e. sin proteína). La curva estándar se hace a partir de una solución de H_3PO_4 , 250 nanomolas de H_3PO_4 , producen una absorbencia de 0.34 a 660 nm. Para calcular la actividad de hidrólisis se aplicó la siguiente ecuación:

Actividad de hidrólisis ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) = (D.O. muestra - D.O. blanco con TCA) x [vol de reacción (0.45 ml)/vol sobrenadante (0.2 ml)] x [250 nmolas Pi / O.D. 660 nm (0.34)] x [1/ tiempo (min)] x [1/proteína (mg)]

El margen de sensibilidad de esta metodología se encuentra desde 0.500nM hasta concentraciones micromolares.

Cuantificación de fosfato liberado con verde de malaquita Lanzeta, 1979.

La reacción de hidrólisis se inició como se indica para el método de Fiske y SubbaRow (1925). Se agregó 1.6 ml del reactivo de Lanzeta (hidrocloruro de verde de malaquita 0.045 %, molibdato de amonio 4.2 % en HCl 4 N, 3:1), con lo cual se detuvo la reacción. 30 seg después se agregaron 0.2 ml de citrato de sodio (34 %), y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Se leyó contra un tubo blanco, a 660 nm. Los valores de los tubos problema se interpoló en una curva de Na_2PO_4 .

La sensibilidad de esta metodología está en el margen de concentraciones nanomolares.

Cuantificación del ^{32}P liberado por la hidrólisis del $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{-ATP}$.

Se utilizó la metodología propuesta por de Meis y cols. (1983). Se determinó la cantidad de ^{32}P liberado a partir de una alícuota de $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{-ATP}$ presente en el medio de reacción.

Marcarje del ATP con ^{32}P en el fosfato gama [Glynn y Chapell, 1964]: Se preparó: tris-Cl 0.05M (pH 8.1), $MgCl_2$ 0.006M, cistena 0.002M, 3-fosfoglicerato 0.001M, ATP 0.005M, NADH 0.0004M, EGTA-K 0.001M, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa 200 μg , 3-P-gliceratocinasa 140 μg , 6-mercaptoetanol 0.1 ml (comprobar pH 8.0 con papel pH). Se dejó reaccionar la mezcla durante 1 hr y, se

añadió 50 ml de etanol (100% v/v); se lavó el tubo de reacción con 10 ml de etanol (17% v/v), y se liofilizó o evaporó (máximo 40°C) hasta que estuvo casi seco. Se filtró en papel Whatman 1 y posteriormente, se aplicó a una columna cromatográfica (3.5 x 0.5 cm) cargada con 1g de resina AG 1x8 (BioRad), (el tubo de reacción se lava con 10 ml de H₂O). Se eluyó con 40 ml de NH₄Cl 0.002M para eliminar AMP/ADP/Pi y, se lavó con 40 ml de H₂O para quitar el NH₄⁺; Se eluyó el [γ -³²P]-ATP con Hcl 0.25N y, se colectó (15-17 ml) en hielo. Finalmente se ajustó el pH a 6.8 con Tris (3-3.4 ml de Tris 1M o 24.4 mg/ml de Tris).

Para cuantificar el ³²Pi, producto de la reacción de hidrólisis, se detuvo la reacción de una alícuota de ATPsintasa/ATPasa (100µg) de 0.3-0.5 ml, con 100 µl de TCA (30%) y se le añadió: 0.3 ml de acetona, 0.5 ml del reactivo de molibdato de amonio (ver Fiske y SubbaRow, 1925), 1.0 ml de acetato de butilo. Los tubos blanco, no contienen proteína. La mezcla se agitó durante 1 min en un agitador Vortex y se centrifugó en una centrífuga clínica durante 30 seg. Se tomó una alícuota de la fase superior (orgánica) de 0.5-1.0 ml y se colocó en un papel filtro (3.0 x 9.0), se dejó secar y se colocó en viales con líquido de centelleo de Bray (5-Difeniloxazol (PPO) 5.5 g, 1,4-Bis (5-feniloxazol-2-il)benceno (POPOP) 0.125 g, tolueno 1 l). La radioactividad se determinó en un contador de líquido de centelleo y la actividad se calculó con la siguiente ecuación:

Actividad Específica (nmol /V_{min}/mg) = (cmp problema - cmp blanco) x [(vol reacción/vol snte) x (vol total fase orgánica/vol muestra en papel filtro) x (1/Act Específica ³²Pi en el medio) x (1/proteína (mg)) x (1/tiempo de reacción)].

Estimulación de la hidrólisis de ATP.

Por Temperatura (60°C).

Es posible liberar a la enzima de la acción de la proteína inhibidora [Adolfson y cols., 1975; Feinstein y Moudrianakis, 1984], incubando la preparación en presencia de ATP, en ausencia de magnesio y a una temperatura de 60°C. El resultado de este proceso es una estimulación de la actividad de hidrólisis, y representa un criterio que indica que la baja actividad hidrolítica de la F₁-latente se debe a su interacción con la proteína inhibidora. El medio de activación contiene: Tris-acetato 0.05M (pH 8.0), ATP 0.01M, EDTA 1.3mM y sacarosa 0.25M. Una vez que el medio de reacción estuvo a 60°C, se agregó 0.02mg/ml del complejo F₀F₁I (concentración final). Se tomaron alícuotas de 0.24 ml a diferentes tiempos y se colocaron en tubos que contienen 0.01 ml de MgCl₂ 0.125M (concentración final 0.005M), la hidrólisis que así se inició, se incubó a 30°C por 10 ó 15 min, y se detuvo por la adición de 0.1 ml de ácido tricloroacético al 30 %. Para cada tiempo de incubación en el medio de activación se

tomó una alícuota que se añade directamente a 0.1 ml de ácido tricloroacético. Se cuantificó la actividad de hidrólisis por medio del método de Fiske-SubbaRow (1925) o de Lanzeta (1979), según se requiera de acuerdo a la sensibilidad.

Por aumento de la fuerza iónica.

Para inducir la remoción del IF, por aumento de la fuerza iónica [Horstman y Racker, 1970; Pullman y Monroy, 1963]: se incubó a la enzima en 0.1 ml de sacarosa 0.15M, MES-Tris 0.02 M (pH 6.8) y la concentración final deseada de KCl durante 10 min. Transcurrido el tiempo se agregaron 0.25 ml de medio de reacción, y, se continuó con el protocolo de Fiske y SubbaRow. (1925).

Recambio ATP-³²Pi.

La reacción de recambio ATP-³²Pi es una reacción intermedia de la síntesis de ATP el la cual se utiliza la energía derivada de la hidrólisis de ATP para incorporar ³²Pi al ATP frío presente en el medio. El protocolo para cuantificar esta reacción es el mismo descrito por de Meis (de Meis y cols., 1983) y se utilizó un protocolo igual al de la cuantificación de la hidrólisis del ATP, con las siguientes modificaciones: se agregó una alícuota de ³²Pi al medio de reacción y se hicieron extracciones sucesivas de la fase orgánica (agregando acetona y acetato de butilo), se colocó en el papel filtro una alícuota de la fase acuosa. La actividad de recambio se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Recambio} = \frac{\text{cimp problema} - \text{cimp blanco}}{\text{vol reacción/vol en papel}} \times \frac{1}{1/\text{proteína (mg)} \times 20 \text{ nmol Pi (10 } \mu\text{l)/cpm de 10 } \mu\text{l de medio de reacción}} \times \frac{1}{\text{tiempo}}.$$

Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida en presencia de SDS.

La electroforesis en gel se realizó según el protocolo de Laemmli (1970), y para lograr resolver adecuadamente las subunidades de bajo peso molecular se utilizó un gradiente lineal de acrilamida de 23-10%. La tinción se llevó a cabo con azul de Coomassie G 250 (0.1%), Acido Acético (10%).

Como marcadores de peso molecular se utilizó el kit de BIO-RAD que contiene: fosforilasa b (116,250), albúmina de suero de res (66,200), ovalbúmina (45,000),

anhidrasa carbónica (31,000), inhibidor de tripsina de soya (21,500) y lisosima (14,400).

Los pesos moleculares del patrón de las bandas, se obtuvieron analizando los geles por medio de un Ultra Gel Scan (Bromma XL, Sweden) y se corrigieron por medio de una ecuación exponencial decreciente [Fabiato, 1988].

Para realizar los geles en dos dimensiones, se corrió un gel en una primera dimensión utilizando el protocolo descrito anteriormente. Después de correr se cortó un carril conteniendo al complejo F_0F_1I y se pegó con agarosa a un nuevo gel (segunda dimensión), a un porcentaje de acrilamida de 15 %. La corrida se hace a una corriente de 30mA a temperatura ambiente; el tiempo de corrida depende del tamaño del gel.

Inmunodetección del IF_1 en el complejo F_0F_1I con anticuerpos policlonales anti- IF_1 .

El procedimiento consiste en la transferencia de la proteína de la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, a una membrana de nitrocelulosa por electroforesis. El papel de nitrocelulosa se inmunodecoró con el antisuero específico, y posteriormente con un segundo anticuerpo, el cual se revela por medio de peroxidasa o fosfatasa alcalina.

Se corrió un gel de poliacrilamida (23-10 %) [Laemmli, 1970], con una cantidad suficiente de proteína (en este caso al rededor de 20-30 μ de ATPsintasa/ATPasa). Se cortó el papel de nitrocelulosa al tamaño deseado, y se mojó en el amortiguador de transferencia (Tris 18g, Glicina 86.4g, Metanol 1,200ml, para 6l). A continuación se montó el emparedado para la transferencia de la siguiente manera: sobre la rejilla se colocó una esponja mojada con amortiguador de transferencia, sobre ésta, un papel filtro también mojado con el amortiguador, luego las tiras de gel y finalmente el papel de nitrocelulosa. Se terminó el emparedado, invirtiendo los pasos antes mencionados, se cierra la rejilla y se sumerge en la cámara de transferencia, que previamente fue llenada con amortiguador de transferencia. El emparedado se colocó en la cámara de transferencia de tal manera que el papel esté colocado hacia el ánodo, pues las proteínas han sido previamente cargadas negativamente. Se transfirió durante 4.5 hrs a 0.25 Amperes, a una temperatura de 8°C y con agitación constante. Una vez efectuada la transferencia, para verificar la efectividad de la misma, se tiñen las tiras de papel durante 15 min con rojo de Ponceau "S" (0.5%) en ácido acético (7.5 %) en agitación constante, finalmente se lavó con ácido acético a la misma concentración. Este tratamiento permitió observar a la proteína transferida y adherida al papel. Se bloqueó 1 hr en gelatina al 3 % en agua con agitación constante. Se incubaron las tiras en 15 ml de TTBS (TBS: Tris 0.02 M, NaCl 0.5 M; TTBS: 10 ml TBS + 0.05 ml

de Tween 20), más 40 μ l de suero normal de cabra, durante toda la noche. 24 horas después, se lavó 3 veces cada 5 min con TTBS y se agitó el papel durante 1 hr en presencia del anticuerpo contra la proteína deseada, en este caso IF₁, en una solución de gelatina al 1% en TTBS a una dilución que dependerá del título del anticuerpo (esta solución es reutilizable hasta 3 veces). Se lavó 3 veces con TTBS y se procedió a utilizar los reactivos en el orden descrito por el kit de Vectastain (Vector laboratories, Inc.) que revela a los anticuerpos por medio de fosfatasa alcalina.

Reconstitución del complejo ATPsintasa/ATPasa en liposomas, por elución-centrifugación.

Para incorporar al complejo ATPsintasa/ATPasa en liposomas de fosfatidil colina se utilizó la metodología reportada por Garret y Penefsky (1975). El protocolo consiste en aplicar de 100-150 μ g de complejo F₀F₁ o F₀F₁I a columnas cromatográficas (1ml) cargadas con sefadex G50 (fine) que han sido previamente equilibradas con 5ml del amortiguador con el que se equilibró la columna de sefaro-SA para la purificación de cada uno de los complejos, sin detergente y lípidos (i.e. Tris-Cl 0.02M (pH 7.5), EDTA 0.002M, para el F₀F₁, o MES-Tris 0.02M, EDTA 0.002M para el complejo F₀F₁I) y centrifugadas durante 1 min a 7,500 x g a 4°C en una centrífuga clínica. Una vez aplicada la enzima a la columna, ésta se recentrifugó a la misma velocidad y por el mismo tiempo. El filtrado se recogió en hielo y se le determinó la concentración de proteína y la actividad de hidrólisis de ATP.

El rendimiento de proteína es cercano al 90% y se obtiene una eficiencia de orientación muy elevada (ver resultados).

Reconstitución del IF₁ en el complejo F₀F₁.

La reconstitución con la proteína inhibidora en el complejo ATPsintasa/ATPasa se realizó mediante la incubación del complejo F₀F₁ en presencia de Mg-ATP. Se incubó al inhibidor y al complejo F₀F₁ en una relación 3:1 durante 30 min a 30°C en un amortiguador que contiene Sacarosa 0.25M, MOPS 0.002M (pH 6.3), Tris-SO₄ 0.01M (pH 6.7), MgCl₂ 0.001M, ATP 0.08M. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se determinó la actividad de hidrólisis de ATP.

Micrografías electrónicas de los proteoliposomas.

Las micrografías electrónicas de los proteoliposomas del complejo ATPsintasa/ATPasa se llevaron a cabo en un microscopio electrónico Jeol modelo 1200 EXII. Las muestras fueron teñidas negativamente con Acido fosfotúngstico (2 % p/nv, pH 6.8).

RESULTADOS

Todos los resultados mencionados a continuación derivan de experimentos que se realizaron para caracterizar al complejo F_0F_1 latente (F_0F_1I). Se abordó esta caracterización realizando las mismas pruebas para el complejo latente y para el complejo carente de la proteína inhibidora, para poner en evidencia que los parámetros obtenidos se deben únicamente a la presencia física y funcional de la proteína inhibidora.

Modificación de la preparación de F_0F_1

Los resultados obtenidos anteriormente se realizaron comparando contra el complejo F_0F_1 reportado por Dreyfus y colaboradores (1984). Este complejo se obtiene utilizando al detergente laurildimetilamino óxido (LDAO), pero dado que la purificación del complejo F_0F_1 latente se lleva a cabo con el n-Dodecil β -D maltósido (LM), la comparación más acertada sería con un complejo activo aislado con el mismo detergente; ésto debido a los efectos activadores que se han mostrado en la enzima por la acción del LDAO [Löttscher y cols., 1984; Vázquez-Laslop y Dreyfus, 1986; Montero-Lomelí y Dreyfus, 1987].

De acuerdo con lo anterior, se procedió a aislar al complejo F_0F_1 con la misma metodología reportada por Dreyfus y colaboradores en 1984, únicamente que el LDAO fue substituido por el LM a una concentración de 3mg de detergente por mg de proteína, misma concentración que se utiliza para aislar al complejo latente. El complejo aislado por esta metodología presentó las características que se muestran en la Tabla 2.

Una vez estandarizada la metodología por medio de la cual se obtiene al complejo F_0F_1 con el mismo detergente que se obtiene el complejo latente, se pudieron llevar a cabo correctamente las comparaciones entre las características cinéticas y estructurales de ambos complejos.

¿Existen complejos F_0F_1 en una preparación de F_0F_1I ?

Una de las preguntas que surgieron fue, si en la población de enzimas latentes existen enzimas carentes de IF_1 y que fuesen las responsables de la actividad manifestada por el complejo F_0F_1I . La manera de resolver esta pregunta fue la siguiente: dado que las condiciones de aislamiento de los dos complejos son muy similares y que básicamente sólo difieren los amortiguadores utilizados y su pH, se decidió reconstituir a la protefina inhibidora en el complejo F_0F_1 . De resultar posible la reconstitución, se podría realizar el mismo ensayo en la preparación de F_0F_1I para así saturar de IF_1 a las enzimas carentes de éste que pudiesen estar presentes en la preparación. Como puede observarse en la Figura 4, a medida que se incrementaba la concentración de IF_1 , la actividad de la enzima sin protefina inhibidora decrecía. Dado que se requiere de una alta precisión en estos experimentos, la cuantificación de la hidrólisis de ATP, se realizó con el método del verde de Malaquita para la determinación de fosfato liberado (ver Materiales y Métodos).

La metodología de reconstitución con IF_1 requiere de la presencia de $Mg\cdot ATP$ en el medio, este experimento se realizó con el complejo activo, pero afecta la estimación de los parámetros cinéticos, por lo cual se reconstituyó con la protefina inhibidora utilizando una concentración saturante de ésta (relación 5:1 con respecto a la preparación de F_0F_1). Con este procedimiento se obtiene un comportamiento "michaeliano" (i.e. una hipérbola rectangular), para el $Mg\cdot ATP$ en la hidrólisis, muy semejante al descrito para el complejo latente (Figura 5). En la Figura 6 se observa el gráfico de Lineweaver-Burk para el efecto de concentraciones crecientes de $Mg\cdot ATP$ en la hidrólisis. Las concentraciones del complejo están calculadas para que no exista más allá de 0.5 mM de Mg^{2+} libre. Al realizar la reconstitución en la preparación de F_0F_1I , se observó que no hay cambio significativo ni en la V_{max} ni en la K_m (ver Tabla 1 y 2).

Reconstitución del complejo F_0F_1I en liposomas.

Hidrólisis.

Se intentó reconstituir al complejo F_0F_1I en liposomas por medio del método de diálisis del detergente, por sonicación y congelación/descongelamiento, pero los resultados siempre fueron negativos; i.e. después del tratamiento la actividad de hidrólisis se pierde. Por sugerencia de la Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou, se filtró la enzima por medio del método de elución-centrifugación de Garret y Penefsky (1975). Una vez filtradas las preparaciones por esta metodología, se determinó la actividad de hidrólisis para el $Mg\cdot ATP$ y se verificaron algunas de sus propiedades (Tabla 3). Los proteoliposomas obtenidos por la metodología de elución-centrifugación se observaron por medio de tinción negativa en microscopía electrónica (Figura 7).

Parámetros cinéticos para la hidrólisis del Mg.ATP	$K_m=140\mu\text{M}$ $V_{\text{max}}=8.33\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$
Hidrólisis + oligomicina ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	0.6(90-95)
Hidrólisis + DCCD ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	1.2(80-90)
Hidrólisis + KCl (50mM)	no hay efecto
Efecto del pH en la preincubación a 60°C	La actividad decrece más rápido a pH ácido (6.8).
Rendimiento (de protefna inicial)	8%
Reconocimiento de IF ₁ por anticuerpos	negativo

Tabla 2. Características del complejo F_0F_1 aislado por la metodología de Dreyfus y cols. (1984), la solubilización se llevó a cabo con LM. Los experimentos se realizaron con 10 μg del complejo en 350 μl a 30°C y 15 min. Los números entre paréntesis señalan el porcentaje de inhibición.

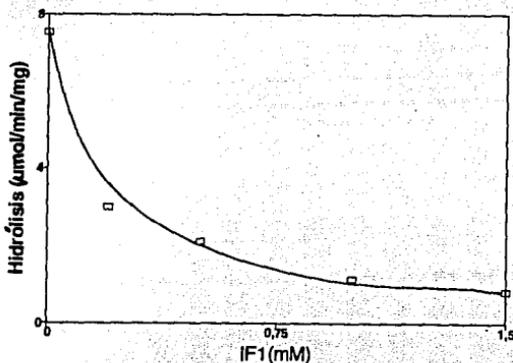


Figura 4. Reconstitución con IF₁ del complejo F_0F_1 . Se incubó al complejo activo (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), en 300 μl durante 30 min y 30°C en presencia de concentraciones crecientes del péptido inhibidor y se cuantificó el efecto de la reconstitución en la hidrólisis del ATP durante 15 min y a 30°C.

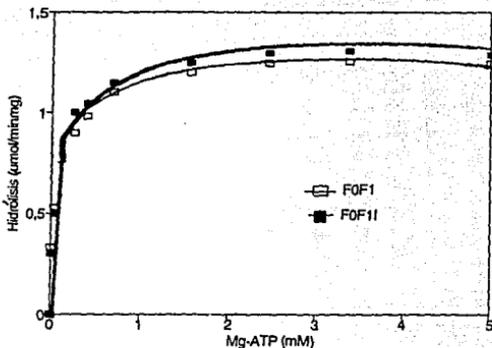


Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de Mg-ATP [1:1], en la actividad hidrolítica de los complejos F_0F_1 y F_0F_1I los cuales han reconstituido al IF. Se reconstituyó la proteína inhibidora en los complejos incubando 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de complejo ATPsintasa/ATPasa en 300 μl más 1.5 mg de IF, durante 30 min y a 30°C. La actividad hidrolítica se cuantificó para 15 min de reacción a 30°C.

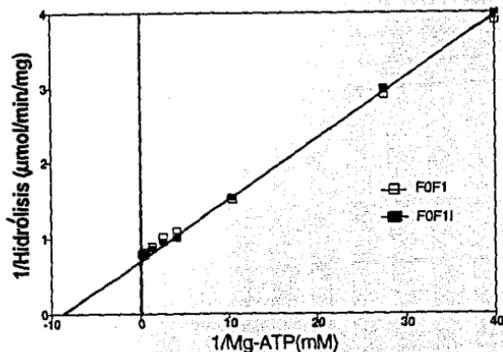


Figura 6. Regráfico de Lineweaver-Burk para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP [1:1] en la hidrólisis llevada a cabo por los complejos F_0F_1 , latente y activo reconstituidos con el IF. En el experimento no existe más de 0.5 mM de Mg^{2+} libre.

Por otra parte, se procedió a preparar las partículas submitocondriales mediante ruptura de las mitocondrias por cambio de presión en una prensa de French. Se verificó que el procedimiento para preparar a las psm no afectase la reconstitución de los complejos F_0F_1 en los liposomas, y simultáneamente, se realizaron experimentos tendientes a determinar la orientación de la ATPintasa/ATPasa en los liposomas, dado que la población de las enzimas reconstituidas puede estar orientada hacia el interior o hacia el exterior de la vesícula, de tal suerte que únicamente las enzimas que estén orientadas hacia el exterior son las que pueden manifestar su actividad de hidrólisis en los liposomas

Complejo	Hidrólisis (Control)	Hidrólisis + Oligomicina (10µg/mg)	Hidrólisis + DCCD (50µM)	Hidrólisis + KCl (50mM)
F_0F_1	8.13±0.21	1.2(80-90)	1.2(80-90)	ninguno
$F_0F_1(\uparrow)$	3.4±0.54	0.3(85-100)	0.2(85-95)	ninguno
$F_0F_1\downarrow$	1.43±0.07	0.2(80-90)	0.2(80-90)	5.0(420)
$F_0F_1\downarrow(f)$	0.6±0.07	0.03(90-100)	0.04(85-100)	2.2(180)

Tabla 3. Características obtenidas después de reconstituir a los complejos F_0F_1 y $F_0F_1\downarrow$ por el método de elución-centrifugación de Garret y Penefsky (1975). Todos los datos están expresados en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$. Los experimentos se realizaron con 10µg del complejo en 350µl a 30°C y 15 min. Los números entre paréntesis muestran el porcentaje de inhibición. (f)= complejos filtrados. Los datos son promedios de experimentos por cuatruplicado.



Figura 7. Proteoliposomas conteniendo al complejo F_0F_1 , reconstituido por elución-centrifugación. La preparación fue fijada y teñida con ácido fosfotúngstico. La barra indica 2nm.

sellados. Para aumentar la eficacia de la reconstitución, se agregó al medio de reacción 1mg/ml de albúmina de suero de res (BSA), que a pesar de ser una proteína soluble, tiene sitios hidrofóbicos que secuestran a las moléculas de detergente excedentes (la albúmina es uno de los acarreadores para ácidos grasos en la sangre [Dempsey, 1984]).

Se agregó 0.2 % de Tritón X100 a los proteoliposomas para solubilizar la membrana y cuantificar su efecto sobre la actividad de hidrólisis; por otra parte, se agregó 1 μ M de *p*-FCCP, para cuantificar el efecto de el $\Delta\mu_H$ sobre la hidrólisis de ATP en las enzimas reconstituidas. Los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 4.

Recambio ATP-³²Pi.

Una vez que se contó con la evidencia de que los liposomas contenían al complejo ATPsintasa/ATPasa, se procedió a cuantificar la reacción de recambio ATP-³²Pi (de Meis y cols. 1983). Esta es una reacción parcial de la síntesis de ATP que depende de que el complejo ATPsintasa haya sido reconstituido en la membrana y que se encuentre en estado funcional en el sentido de la síntesis. Se realizaron algunas pruebas para encontrar la máxima actividad de recambio, como diferentes concentraciones de fosfato libre y la presencia de BSA. Los resultados obtenidos de estos experimentos se presentan en la Tabla 5, los experimentos se realizaron con complejos ATPsintasa obtenidos de partículas submitocondriales obtenidas por sonicación o por cambio de presión.

Se trató de mejorar la velocidad de recambio filtrando una vez más a los proteoliposomas pero con este tratamiento se pierde alrededor del 70% de la velocidad de recambio obtenida con la primera filtración.

Dado que se sabe que el pH óptimo para la reacción de hidrólisis a 30°C es diferente para el complejo activo y para el latente, se trató de modificar el protocolo de la reacción de recambio, pero al acidificar el medio de pH 8.0 a 6.8, se pierde alrededor del 50% de la actividad.

Relación hidrólisis/recambio.

La relación hidrólisis/recambio, es un parámetro que se ha utilizado para conocer en el complejo F₀F₁ aislado y reconstituido en una membrana sellada, cuál es el estado de acoplamiento del sistema; por ejemplo, cuánto ATP se requiere hidrolizar

para incorporar un fosfato marcado al ADP (pseudosíntesis). Es necesario recordar que el papel fisiológico de la ATPsintasa es precisamente sintetizar ATP; dado que la reacción de recambio ATP-³²Pi es una reacción intermediaria de la síntesis de ATP y que ocurre debido a la energía proveniente de la hidrólisis del mismo, se puede incorporar con igual probabilidad fosfato frío o radioactivo, y por otra parte, sólo se puede cuantificar el AT³²P. Los experimentos para cuantificar la hidrólisis del ATP, se hacen en las mismas condiciones en que se cuantifica la reacción de recambio ATP-³²Pi, es decir, en presencia de BSA, fosfato y ADP. La única diferencia en el material utilizado para cada una de las reacciones es que en la reacción de recambio se utiliza ³²Pi y ATP y en la de hidrólisis AT³²P y Pi (ver Materiales y Métodos).

Condiciones	Actividad de Hidrólisis del ATP (µmol/minmg)			
	F ₀ F ₁ (s)	F ₀ F ₁ I(s)	F ₀ F ₁ (f)	F ₀ F ₁ I(f)
Antes de reconstituir	8.07±0.15	1.50±0.50	8.16±0.12	1.4±0.15
Reconstituido	3.27±0.98	0.58±0.04	4.07±1.15	0.36±0.15
Reconstituido + BSA (1mg/ml)	2.87±0.79	0.41±0.06	3.65±0.54	0.27±0.15
Reconstituido + TX100 (0.2%)	7.62±0.35	1.54±0.60	7.01±0.44	1.61±0.43
Reconstituido + BSA + TX100	7.73±0.25	1.61±0.70	7.56±0.32	1.45±0.45
Reconstituido + FCCP (1µM)	7.50±0.56	1.73±0.46	7.36±0.57	1.65±0.35
Reconstituido + BSA + FCCP	7.58±0.64	1.65±0.33	7.73±0.58	1.41±0.43

Tabla 4. Pruebas de orientación de la ATPsintasa en proteoliposomas reconstituidos por elución-centrifugación. Se cuantificó la hidrólisis del ATP por los complejo F₀F₁ y F₀F₁I aislados de partículas submitocondriales de Klein [Klein y cols., 1982] o de Mg-ATP [Lee y Ernster 1967] preparadas por ruptura mecánica sonicando (s) o por cambio de presión con una prensa de French (f). Los experimentos se realizaron con 10µg del complejo en 350µl a 30°C y 15min. Todos los datos están expresados en µmol·min⁻¹·mg⁻¹. Los datos son promedios de experimentos por triplicado.

Efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP en la relación hidrólisis/recambio.

Complejo F₀F₁I.

La relación hidrólisis/recambio, se puede estudiar bajo diferentes condiciones; en este caso en particular se estudió el efecto de la concentración del sustrato (MgATP). En la Figura 8 se observa como, a medida que se incrementa la concentración de Mg-ATP [1:1], se modifican tanto la reacción de hidrólisis como la de recambio, hasta que ambas reacciones llegan a una saturación. En las Figuras 9 y 10 se muestran los trazos obtenidos por el tratamiento de Lineweaver-Burk para la hidrólisis y para el recambio respectivamente. Para la reacción de recambio, se obtiene una línea recta cuya intersección con el eje de las ordenadas da una V_{max} de 17 nmol/minmg y la extrapolación de los puntos al eje de las abscisas una K_m de 870 μ M. Los parámetros cinéticos para la reacción de hidrólisis son $K_m = 2.2$ mM y una V_{max} de 39 nmol/min-mg (Figura 10).

Al dividir la actividad de hidrólisis obtenida en cada una de las concentraciones de Mg-ATP [1:1] entre el valor de la actividad de recambio obtenido para cada uno de estos puntos, y graficando este valor contra la concentración de Mg-ATP correspondiente a cada punto, se tiene que, a medida que aumenta la concentración del complejo catión-nucleótido, la relación hidrólisis/recambio, se mantiene constante alrededor de un valor de 2 (Figura 11).

Complejo F₀F₁.

En el caso del complejo que carece de la proteína inhibidora, el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP [1:1] describe también cinéticas michaelianas tanto para la reacción de hidrólisis como para la de recambio, en la Figura 12 se muestran las curvas descritas para cada una de estas reacciones. Las Figuras 13 y 14 muestran los regráficos de Lineweaver-Burk para la reacción de hidrólisis y recambio respectivamente. Los parámetros cinéticos para la reacción de hidrólisis son $K_m = 4.6$ mM y V_{max} de 282 nmol/min-mg, para la reacción de recambio $K_m = 1.8$ mM y V_{max} de 8.1 nmol/min-mg.

En cuanto a la relación hidrólisis/recambio en estas condiciones, se observó que a medida que se incrementa la concentración de Mg-ATP, la relación hidrólisis/recambio se mantiene constante y alrededor de 20 (Figura 15).

Proteoliposomas	Adiciones		Recambio (nmol/minmg)		
	H ₃ PO ₄ (mM)	BSA (mg/ml)	Control	+ FCCP (1μM)	+ Oligomicina (10μg/mg)
F ₀ F ₁ I(s)	2	-	2.5±0.1	0.0	0.02(99)
	2	1	4.9±0.2	0.0	0.06(99)
	15	-	6.4±0.1	0.0	0.11(98)
	15	1	11.0±0.2	0.0	0.31(97)
F ₀ F ₁ (s)	2	-	0.2±0.01	0.0	0.0(100)
	2	1	0.7±0.03	0.0	0.0(100)
	15	-	1.8±0.04	0.01(99)	0.0(100)
	15	1	4.1±0.11	0.03(99)	0.0(100)
F ₀ F ₁ I(f)	2	-	1.7±0.25	0.0	0.03(99)
	2	1	3.4±0.18	0.0	0.07(99)
	15	-	4.3±0.43	0.0	0.08(98)
	15	1	7.0±0.35	0.0	0.01(97)
F ₀ F ₁ (f)	2	-	0.1±0.01	0.0	0.01(99)
	2	1	0.4±0.03	0.0	0.02(99)
	15	-	1.1±0.15	0.0	0.01(98)
	15	1	2.0±0.12	0.0	0.03(97)

Tabla 5. Recambio ATP-³²Pi en los proteoliposomas de los complejos F₀F₁ o F₀F₁I obtenidos por sonicación o por cambio de presión. (s)= proveniente de partículas submitocondriales obtenidas por sonicación. (f)= proveniente de partículas submitocondriales obtenidas por cambio de presión. Los números entre paréntesis indican el porcentaje de inhibición, cero es igual a 100%. Los datos son promedios de experimentos por quintuplicado.

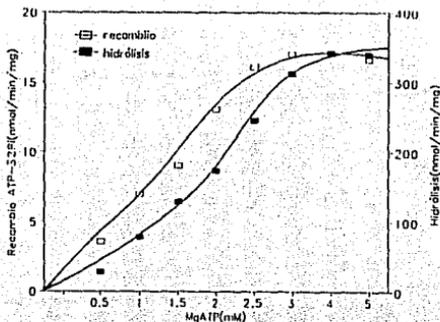


Figura 8. Efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) sobre las reacciones de hidrólisis y recambio llevadas a cabo por el complejo F₁F₀. Los experimentos se realizaron filtrando entre 100 y 150 μ g del complejo por columna para reconstituirlos en liposomas; se cuantificó la reacción de hidrólisis de ATP³²P o el recambio ATP³²P con 50 μ g del complejo en 600 μ l a 30°C y 15 min.

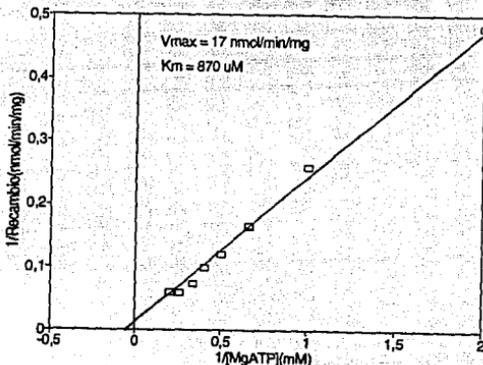


Figura 9. Regráfico de Lineweaver-Burk para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) en el recambio llevado a cabo por el complejo F₁F₀.

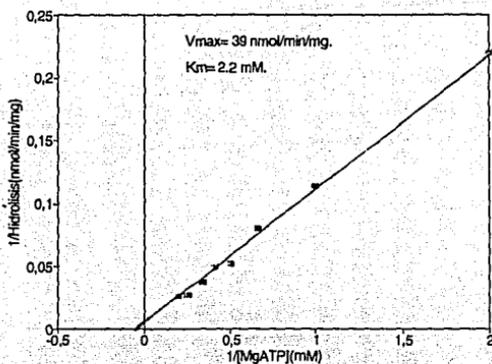


Figura 10. Regráfico de Lineweaver-Burk para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) en la hidrólisis llevada a cabo por el complejo F_0F_1 .

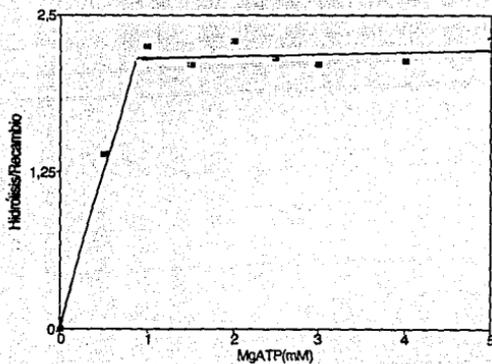


Figura 11. Relación hidrólisis/recambio para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP (1:1) en el complejo F_0F_1 .

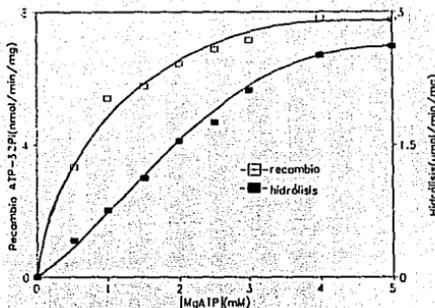


Figura 12. Efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP [1:1] sobre las reacciones de hidrólisis y recambio llevadas a cabo por el complejo F_0F_1 . Los experimentos se realizaron filtrando entre 100 y 150 μg del complejo por columna para reconstituirlos en liposomas; se cuantificó la reacción de hidrólisis de AT^{32}P o el recambio $\text{ATP-}^{32}\text{P}_i$ con 50 μg del complejo en 600 μl a 30°C y 15 min.

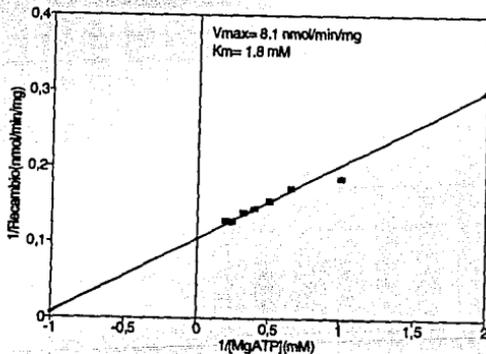


Figura 13. Regráfico de Lineaweaver-Burk para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP [1:1] en el recambio llevado a cabo por el complejo F_0F_1 .

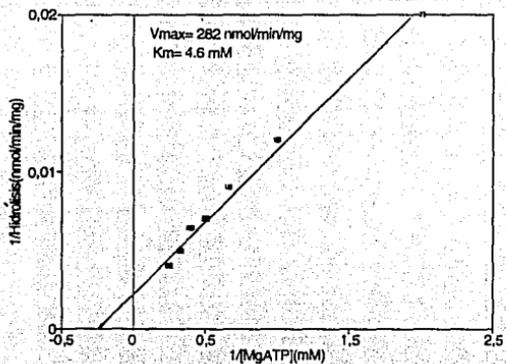


Figura 14. Re gráfico de Lineweaver-Burk para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP [1:1] en la hidrólisis llevada a cabo por el complejo F_1F_0 .

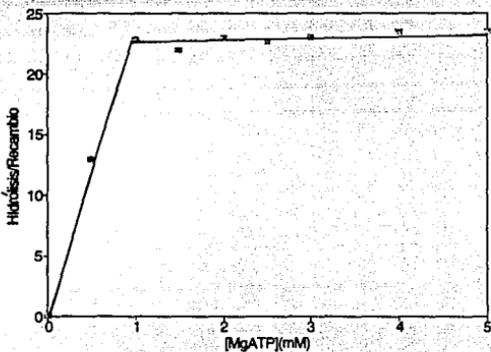


Figura 15. Relación hidrólisis/recambio para el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP [1:1] en el complejo F_1F_0 .

Efecto de concentraciones crecientes de Mg^{2+} en la relación hidrólisis/recambio.

Complejo F_0F_1 .

En estos experimentos se cuantificaron las reacciones de hidrólisis y recambio en presencia de concentraciones crecientes de $MgCl_2$, a una concentración fija de ATP (2mM). La reacción de hidrólisis, a medida que se incrementa la concentración del catión, se acelera hasta llegar a un máximo que se encuentra alrededor de una concentración de 1.5 mM de $MgCl_2$. A concentraciones mayores, la actividad de la enzima decrece hasta que a una concentración de 10mM del catión, la actividad remanente es de alrededor del 20% de la actividad máxima (Figura 16). Se calcularon los parámetros cinéticos para el recambio $ATP-^{32}P_i$ en estas condiciones y se obtuvo una K_m de 5.51 mM y una V_{max} de 22 nmolmin⁻¹mg⁻¹. El recambio de $ATP-^{32}P_i$ aumenta gradualmente a medida que se incrementa la concentración del catión, hasta llegar a una saturación cercana a 5mM de $MgCl_2$ (Figura 16).

La relación hidrólisis/recambio obtenida por este tratamiento describe un comportamiento similar al descrito para la hidrólisis, *i.e.* tiene un pico máximo a una relación de 5 (40/8) y a una concentración de 1mM de $MgCl_2$, este pico desaparece rápidamente hasta llegar a una relación de 0.9 (16/18) alrededor de 7mM de $MgCl_2$ (Figura 17).

Complejo F_0F_1 .

Al aumentar la concentración de $MgCl_2$ el recambio de $ATP-^{32}P_i$ aumenta gradualmente, hasta llegar a una saturación a una concentración de 10mM de $MgCl_2$ (Figura 18). Se calcularon los parámetros cinéticos para el recambio $ATP-^{32}P_i$ en estas condiciones y se obtuvo una K_m de 2.48 mM y una V_{max} de 8.4 nmolmin⁻¹mg⁻¹.

La reacción de hidrólisis, a medida que se incrementa la concentración de magnesio, se acelera hasta llegar a un máximo que se encuentra a una concentración de 0.5mM de $MgCl_2$. A concentraciones mayores, la actividad de la enzima decrece hasta que a una concentración de 10mM del catión, la actividad remanente es de alrededor del 15% de la actividad máxima (Figura 18).

La relación hidrólisis recambio obtenida por este tratamiento, describe un comportamiento semejante al descrito por la hidrólisis, es decir, tiene un pico máximo a una concentración cercana a 0.5mM. Este pico desaparece rápidamente hasta que a 10mM de $MgCl_2$ el cociente es 0.41 (Figura 19).

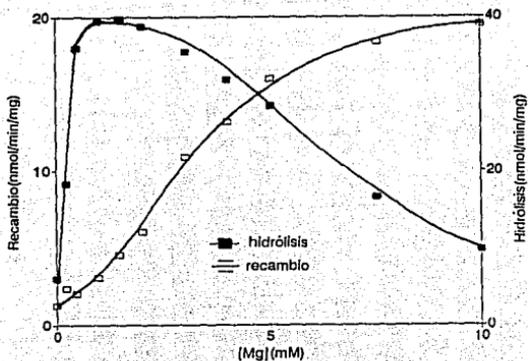


Figura 16. Efecto de concentraciones crecientes de $MgCl_2$ sobre las reacciones de hidrólisis y recambio llevadas a cabo por el complejo F_0F_1 . Se calculó la concentración de Mg^{2+} libre por medio de un programa de cómputo [Fabiato, 1988]. Los experimentos se realizaron filtrando entre 100 y 150 μg del complejo por columna para reconstituirlos en liposomas; se cuantificó la reacción de hidrólisis de $ATP^{32}P$ o el recambio $ATP^{32}P$ con 50 μg del complejo en 600 μl a 30°C y 15 min.

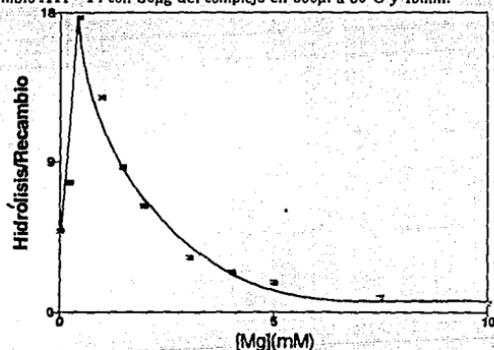


Figura 17. Relación hidrólisis/recambio para el efecto de concentraciones crecientes de $MgCl_2$ en el complejo F_0F_1 .

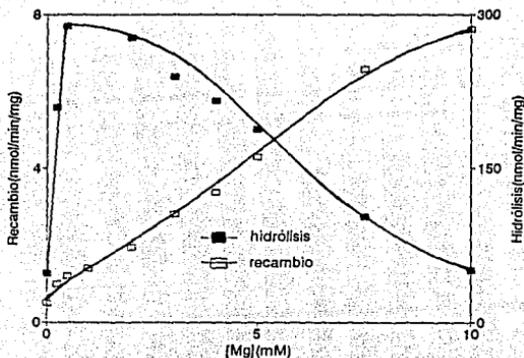


Figura 18. Efecto de concentraciones crecientes de $MgCl_2$ sobre las reacciones de hidrólisis y recambio llevadas a cabo por el complejo F_0F_1 . Se calculó la concentración de Mg^{2+} libre por medio de un programa de cómputo [Fabiato, 1988]. Los experimentos se realizaron filtrando entre 100 y 150 μg del complejo por columna para reconstituirlos en liposomas; se cuantificó la reacción de hidrólisis de $ATP^{32}P$ o el recambio $ATP^{32}P_i$ con 50 μg del complejo en 600 μl a $30^\circ C$ y 15 min.

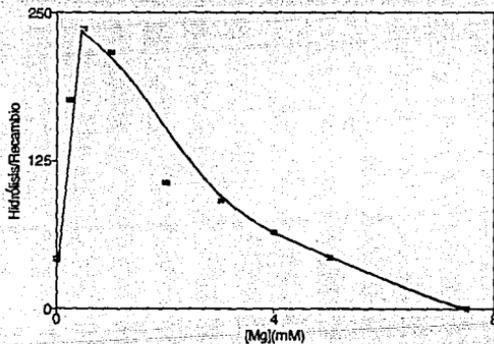


Figura 19. Relación hidrólisis/recambio para el efecto de concentraciones crecientes de $MgCl_2$ en el complejo F_0F_1 .

Efecto de concentraciones crecientes de ADP en la hidrólisis y el recambio.

En estos experimentos se observó el efecto del incremento de la concentración de ADP en el medio de reacción para cuantificar las reacciones de hidrólisis y recambio. Se fijó la concentración de ATP en 2mM y la de $MgCl_2$ en 4mM, el exceso de catión se pensó en relación a que debe acomplejarse tanto con el ADP como con el ATP.

Recambio.

El incremento de la concentración de ADP en la reacción de recambio de $ATP-^{32}P_i$ para ambos complejos describe una cinética michaeliana (Figura 20); al realizar el tratamiento de Lineweaver-Burk, se tienen los siguientes parámetros cinéticos: para el complejo F_0F_1 una K_m de 2.0mM y una V_{max} de 10.4nmol/minmg y para el complejo F_0F_1I una K_m de 710 μ M y una V_{max} de 22.3 nmol/min-mg (Figura 21).

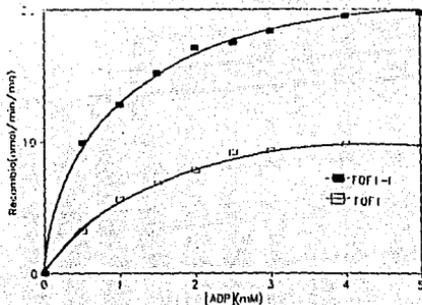


Figura 20. Efecto de concentraciones crecientes de ADP sobre la reacción de recambio llevada a cabo por los complejos F_0F_1 y F_0F_1I . Los experimentos se realizaron filtrando entre 100 y 150 μ g del complejo por columna para reconstituirlos en liposomas; se cuantificó la reacción de hidrólisis de $ATP^{32}P$ o el recambio $ATP-^{32}P_i$ con 50 μ g del complejo en 600 μ l a 30°C y 15 min.

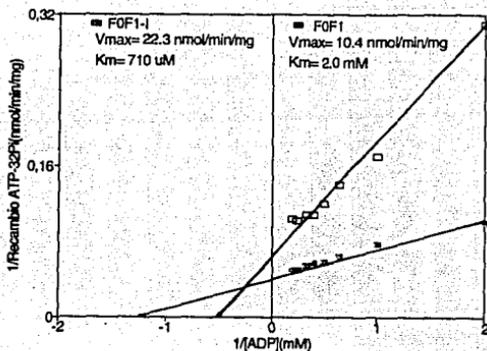


Figura 21. Regráfico de Lineweaver-Burk para el efecto de concentraciones crecientes de ADP en el recambio ATP-³²P llevado a cabo por los complejos F₀F₁ y F₀F₁.I.

Hidrólisis.

En cuanto a la hidrólisis del Mg-ATP³²P, a medida que aumentó la concentración de ADP la velocidad de la reacción decrece. Para el complejo F₀F₁, hay una pérdida de actividad más rápida que para el complejo F₀F₁.I. A la concentración de 5.0 mM de ADP (que fue la mayor utilizada), el complejo activo ha perdido el 93% de la actividad inicial y el complejo latente un 81% (figura 22).

En cuanto a la relación hidrólisis/recambio en estas condiciones (Figura 23), se encontró para el complejo F₀F₁, la relación decrece a partir de 58 a una concentración de 0.5 mM de ADP, hasta 1.7 a 5 mM del compuesto. Para el complejo F₀F₁.I el comportamiento es similar, únicamente que el pico máximo lo tiene a una concentración de 0.5 mM y la relación es de 8.1 y a 5 mM de ADP la relación es de 1.3. Se calculó la K_i aparente para el efecto de las concentraciones crecientes de ADP y se encontró un valor de 2.7 y 2.9 mM para el complejo activo y latente respectivamente.

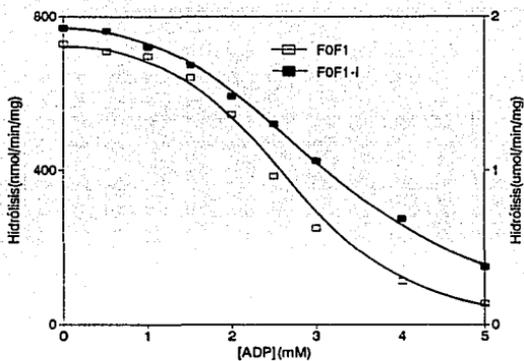


Figura 22. Efecto de concentraciones crecientes de ADP sobre la reacción de hidrólisis de $ATP^{32}P$ llevada a cabo por los complejos F_0F_1 y F_0F_1-I . Los experimentos se realizaron filtrando entre 100 y 150 μg del complejo por columna para reconstituirlos en liposomas; se cuantificó la reacción de hidrólisis de $ATP^{32}P$ o el recambio $ATP^{32}P$ con $50 \mu g$ del complejo en $600 \mu l$ a $30^\circ C$ y 15 min.

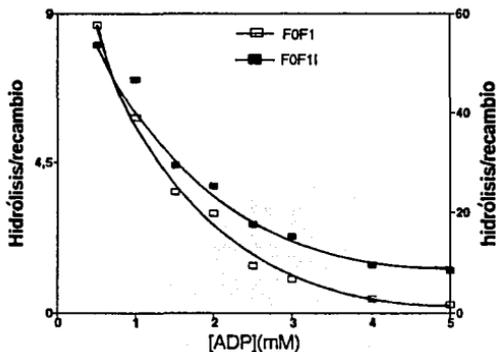


Figura 23. Relación hidrólisis/recambio para el efecto de concentraciones crecientes de ADP en los complejos F_0F_1 latente y activo.

Caracterización de la composición polipeptídica

Para determinar la composición polipeptídica de los complejos de la ATPsintasa, se efectuaron electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida en un gradiente del 10 al 23% en presencia de SDS.

Los pesos moleculares de los polipéptidos que componen a la preparación se obtuvieron por medio del barrido densitométrico, utilizando el programa Ultra Gel Scan, y fueron corregidos usando una ecuación para una función exponencial decreciente [Fabiato, 1988], ya que la electroforesis se llevó a cabo en un gradiente de acrilamida. La preparación está compuesta de alrededor de 18 bandas, a las que se les asignaron los pesos moleculares mostrados en la Tabla 6.

Paralelamente se realizaron electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida en presencia de SDS en doble dimensión. Como se muestra en la Figura 24, no existen bandas de pesos moleculares sobrepuestos en la preparación de F_0F_1I .



Figura 24. Electroforesis en gel desnaturalizante en presencia de SDS en segunda dimensión para el complejo F_0F_1I . Se corrió al complejo en un gel de gradiente lineal de acrilamida de 23-10% (primera dimensión) y después en un gel al 15% de acrilamida (segunda dimensión) y se tiñó con azul de Coomassie. Los pesos moleculares de las bandas se encuentran en la Tabla 6. Las flechas indican al IF_1 .

Inmuno-detección del IF₁.

Se verificó la presencia física de la proteína inhibidora en el complejo F₀F₁I por medio de anticuerpos policlonales contra este polipéptido, amablemente donados por el Biólogo Ernesto Maldonado y haciendo uso de la técnica de inmunotransferencia tipo Western. En la preparación F₀F₁, no se encuentra presente la proteína inhibidora, por el contrario, en el complejo latente existe una banda que corresponde a la presencia del péptido inhibidor en la preparación (Figura 24).

Banda	Peso molecular	Subunidad		
		F ₀	F ₁	Cuello
1	85,090	?		
2	69,800	?		
3	54,567			
4	50,998		α	
5	46,900	CK	β	
6	34,700	?		
7	30,300		γ	
8	24,500		"b"	
9	21,070			OSCP
10	19,700		"d"	
11	18,500		"a"	
12	15,000			
13	12,400		δ	F _B
14	11,900		"AGL"	F ₆
15	10,800			
16	10,100			IF ₁
17	8,400		"c"	
18	9,705		"ε"	

Tabla 6. Pesos moleculares asignados a las proteínas presentes en la preparación de F₀F₁I. La electroforesis en gel de poliacrilamida se hizo siguiendo la técnica de Laemli (1970), en un gradiente del 10-23%, con 5µg de proteína. El gel fue teñido con azul de coomassie. Los pesos moleculares se calcularon con el Ultra-Gel Scan y corregidos con una ecuación para una función exponencial decreciente [Fabiato, 1988]. CK= creatina cinasa.

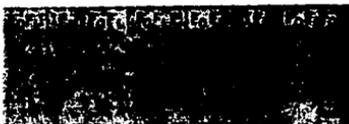


Figura 25. Inmunodetección de IF_1 en el complejo ATPintasa/ATPas. Se muestra un aumento de concentraciones de los complejos F_0F_1 y F_0F_1I de 5 (carriles 1 y 3), 10 (carriles 4 y 5) y 20 μ g (carriles 7 y 8); la concentración de IF_1 es de 1 (carril 2) y 2 μ g (carril 6).

DISCUSION.

La ATPsintasa/ATPasa es una enzima compleja tanto funcional como estructuralmente. Esta complejidad ha hecho que la inmensa mayoría de los estudios que se han hecho en esta enzima se hayan realizado con cada uno de sus componentes por separado (F_0 o F_1), o bien con la enzima en partículas submitocondriales, una pequeña parte de estos estudios se ha desarrollado en el complejo F_0F_1 aislado de la membrana interna mitocondrial y un número muy pequeño con el complejo F_1I . El desarrollo de una metodología que permita obtener a un complejo aislado de la membrana que posea características físicas y funcionales muy parecidas a las que presenta el complejo *in vivo* e *in situ*, generará información relevante acerca de la composición y el mecanismo funcional de la enzima. Muy probablemente los reportes de complejos F_0F_1 aislados y purificados representen una posibilidad para generar esta información.

En el laboratorio se desarrolló una metodología que permite aislar un complejo ATPsintasa/ATPasa que posee presumiblemente las características físicas y funcionales del complejo nativo [Vázquez-Contreras, 1992]. La finalidad del trabajo aquí reportado es precisamente aportar datos sobre la regulación de la ATPsintasa/ATPasa por el péptido inhibidor, en un sistema aislado. Para tal efecto fue necesario comparar los resultados obtenidos con un complejo carente del IF_1 . Las comparaciones que se realizaron anteriormente fueron contra un complejo carente de IF_1 [Dreyfus y cols., 1984], pero aislado con un detergente diferente al que se utiliza para aislar al complejo F_0F_1I de la membrana interna mitocondrial, que puede tener, bajo ciertas condiciones, efectos activadores sobre la hidrólisis del ATP [Lotscher y cols., 1984; Vázquez-Laslop y Dreyfus, 1986; Montero-Lomelí y Dreyfus 1987]. Debido a lo anterior se procedió a modificar esta metodología para obtener un complejo activo, aislado con el mismo detergente que el complejo latente (*i.e.* LM). Esta modificación llevó a obtener el complejo activo deseado, y se obtuvo con una velocidad de hidrólisis mayor que la que presenta el complejo aislado con LDAO, este hecho facilitó las comparaciones con el complejo latente. De hecho se ha reportado que la utilización de detergentes alquil maltósidos ayuda a obtener mejores actividades enzimáticas, y que con el lauril maltósido se está cercano al óptimo tomando en cuenta la longitud de su cadena alquilo [Ljungdahl y cols., 1987].

El complejo activo utilizado para las comparaciones con el complejo F_0F_1I es capaz de ser reconstituido con el péptido inhibidor, por el método tradicional (incubando con el ATP) o incubando con una concentración elevada de IF_1 ; en este

trabajo se reporta únicamente la metodología en la cual se reconstituye al inhibidor en la enzima utilizando altas concentraciones de IF_1 . La actividad remanente que se obtiene después de realizar la reconstitución con el IF_1 , es muy parecida a la que se presenta en el complejo latente, con estos datos se puede pensar que seguramente la actividad del F_0F_1I es representativa de la población de enzimas controladas por el IF_1 . Para verificar la autenticidad de estos resultados, se procedió a incubar al complejo latente con altas concentraciones de IF_1 . Los resultados obtenidos fueron los mismos; *i.e.* la preparación no está contaminada con complejos carentes del péptido regulador. Por otra parte, los parámetros cinéticos para la hidrólisis del ATP por el complejo activo en el cual se ha reconstituido al IF_1 , no varían significativamente con respecto al complejo latente, lo que indica que efectivamente los datos obtenidos anteriormente (la afinidad por el Mg-ATP es igual para ambos complejos, y la diferencia radica en la magnitud de la V_{max} [Vázquez-Contreras y cols., 1995]), son representativos para el complejo activo modificado para este trabajo (Tabla 7).

Un problema que venía deteniendo la caracterización del complejo latente era su reconstitución en liposomas, por alguna razón desconocida, no fue posible incorporar en membranas lipídicas a ninguno de los complejos (activo y latente) por diversas técnicas de reconstitución. Finalmente se ideó una metodología por medio de la cual se puede reconstituir al complejo ATPsintasa/ATPasa en vesículas lipídicas selladas. Esta metodología consiste en una modificación del método de elución-centrifugación reportado por Garret y Penefsky (1975). Una vez que se aseguró que los complejos se reconstituían, se procedió a estudiar las características de los complejos reconstituídos. Se encontró que al igual que con otras metodologías se reduce la velocidad de hidrólisis después de la reconstitución, la sensibilidad a los inhibidores clásicos de las enzimas tipo *F*, se conserva después del tratamiento y de manera muy importante después del tratamiento, la enzima latente no pierde ninguna de sus propiedades (*i.e.* conserva física y funcionalmente al IF_1).

En la mayoría de las metodologías para reincorporar enzimas membranales a ambientes lipídicos, la proporción de orientación de éstas queda alrededor de 50:50%. Se realizaron pruebas para conocer la orientación de las enzimas después de haberse reconstituído por elución-centrifugación. Para verificar el efecto de la membrana en la disminución de la actividad de hidrólisis después de la reconstitución, se agregó un detergente para resolubilizar a las enzimas; con este tratamiento se recupera alrededor del 100 % de la actividad de la enzima antes de la reconstitución; este resultado indica que después de la resolubilización, todas las enzimas están nuevamente en contacto con el sustrato, se agregó un desacoplante para saber si los proteoliposomas estaban sellados y conocer la participación del gradiente de protones generado por la enzima debido a la hidrólisis del ATP en la disminución de esta actividad. Al agregar al desacoplante se recuperó alrededor del 100 % de la actividad de la enzima antes de reconstituirla; este resultado indica que la orientación de las enzimas en los liposomas es precisamente hacia afuera; *i.e.* hacia el sustrato, y que,

la disminución de la actividad hidrolítica sólo se debe al freno impuesto por la membrana y por el gradiente de protones. Esta característica hace que los resultados de los experimentos llevados a cabo gracias a esta metodología, sean mucho más confiables, pues se tiene a la mayoría de las enzimas reconstituidas en una orientación tal que quedan en posibilidades de llevar a cabo la reacción requerida y además los proteoliposomas resultantes están sellados.

Una vez reconstituido el complejo ATPsintasa/ATPasa activo o latente, se procedió a estudiar la reacción de recambio ATP- ^{32}P i, que como se ha mencionado anteriormente, puede llevarse a cabo gracias a la energía derivada de la hidrólisis del ATP y con la cual se pseudosintetizan moléculas del ATP marcadas radioactivamente. La reacción se cuantificó bajo las mismas condiciones que en el trabajo reportado por Dreyfus (1985), en lo que respecta a la concentración de Pi en el medio (2mM), y se y se obtuvo una velocidad de recambio muy baja (2.5 y 2 nmol/min/mg complejo latente y activo respectivamente); buscando mejorar esta velocidad, se agregó al medio de reacción albúmina de suero de res (1 mg/ml), y se incrementó la concentración de Pi hasta 15 mM. Con estas modificaciones, la velocidad de recambio se incrementó para ambos complejos (11 y 4.1 nmol/min/mg complejo latente y activo respectivamente). La explicación de la presencia de la albúmina en el medio de reacción es que a pesar de ser una proteína soluble, tiene sitios hidrofóbicos que sequestran a las moléculas de detergente excedentes en el medio (la albúmina es uno de los acarreadores para ácidos grasos en la sangre [Dempsey, 1984]), y que actúa como desacoplante; es por ello que al agregar esta proteína la velocidad de recambio se incrementa, pues los liposomas quedan mejor sellados. Por otra parte, se ha mostrado en la literatura que la reacción de recambio es sensible a la concentración de fosfato del medio (de Meis y cols., 1983; Dreyfus, 1985), en este caso se observó que a una concentración de 15 mM (máxima explorada), la reacción tiene su mayor expresión, es decir, la enzima parece tener una baja afinidad por el fosfato.

Uno de los puntos estudiados gracias a la reconstitución de la enzima en liposomas, son las relaciones hidrólisis/recambio, que como se mencionó anteriormente, reflejan la eficacia del sistema aislado, dejando ver cuánto ATP se sintetiza por cuánto se hidroliza, y dan una idea del balance del sentido de la reacción y la conservación de la energía. Si el sistema está muy acoplado, la relación deberá estar cercana a uno, es decir un ATP hidrolizado por cada uno sintetizado. Para realizar estos experimentos es necesario cuantificar a la hidrólisis del ATP en las mismas condiciones en las que se cuantifica el recambio, en este caso en presencia de BSA, Pi y ADP y utilizando AT^{32}P o ^{32}P i según sea la reacción cuantificada (hidrólisis y recambio respectivamente).

El primer parámetro a cuantificar fue el efecto de concentraciones crecientes de Mg-ATP. Se encontró que tanto para el complejo latente como para el activo, ambas reacciones, hidrólisis y recambio presentan una curva michaeliana, lo que

quiere decir que tienen una saturación por el sustrato. Debemos recordar que la reacción de recambio depende de la energía derivada de la hidrólisis del Mg-ATP, por lo tanto el Mg-ATP es uno de los sustratos del recambio. Al cuantificar la hidrólisis del Mg-ATP en concentraciones crecientes del mismo por el complejo ATPsintasa/ATPasa sin reconstituir, en presencia o ausencia del péptido regulador, se obtiene la misma K_m pero diferente V_{max} (Tabla 7), lo que indicaría que la proteína inhibidora sólo disminuye el número de recambio sin modificar la afinidad por el Mg-ATP. Con la enzima reconstituida en liposomas, se obtienen diferentes V_{max} (Tabla 7), esto seguramente se debe a la presencia del ADP en el medio, que es un inhibidor de la reacción de hidrólisis. En cuanto a la reacción de recambio, como era de esperarse por los resultados de las pruebas de reconstitución, se obtuvo una V_{max} del doble y una K_m de la mitad para el complejo latente con respecto al activo (Tabla 7). De alguna manera la presencia de la proteína inhibidora hace que la enzima se incline hacia la síntesis del ATP. Al realizar el cociente de hidrólisis sobre recambio, para ambos complejos se obtiene en el caso del complejo latente, en condiciones óptimas que la relación es de 2, y para el activo de 20, lo cual quiere decir que la presencia del péptido regulador hace que el complejo esté mejor acoplado para llevar a cabo la reacción de síntesis que de hidrólisis.

En cuanto a las reacciones de hidrólisis y recambio a concentraciones crecientes de Mg^{2+} , se encontró que tanto la reacción de recambio, como la de hidrólisis tienen cualitativamente el mismo comportamiento en ambos complejos *i.e.* la hidrólisis se va inhibiendo conforme aumenta la concentración del catión y el recambio se activa hasta llegar a una saturación. El efecto inhibitorio del catión solo se manifiesta en la reacción de hidrólisis y se ha propuesto por diversos autores que es posible que en la enzima exista un sitio para magnesio [e.g. Feinstein y Moudrianakis, 1984]; De hecho existen posibilidades extras para explicar este efecto, por ejemplo, el ADP resultante de la hidrólisis del ATP que también es un inhibidor de esta reacción puede actuar de manera individual o acoplado con el magnesio libre para inhibir la reacción, en esta posibilidad se observaría un efecto global de inhibición debido a dos factores el magnesio libre y el ADP (o el Mg-ADP); otra posibilidad es que el magnesio afecte en forma tal a la enzima, que la reacción parcial modificada sea la salida de los productos de la catálisis (ADP y Pi). Para entender el efecto del magnesio en la reacción de hidrólisis se necesita de un análisis más fino de su efecto inhibitorio. Por el contrario, para la reacción de recambio no se hace patente el efecto inhibitorio porque seguramente se acopla con los lípidos de los proteoliposomas y no afecta la reacción. Estos resultados, están de acuerdo con lo reportado para el complejo F_0F_1 de Dreyfus y cols. (1984), en estas condiciones se favorece el recambio y la relación es menor de 1, relaciones que son las más bajas reportadas hasta el momento. De hecho se sabe que la acción de quelar a este catión está asociada con la despolimerización de la enzima y por tanto la completa pérdida de actividad catalítica. Es muy probable que la estructura cuaternaria intacta de la requiera de Mg^{2+} como un elemento estabilizador [Senior, 1979].

Parámetros cinéticos de F_0F_1 y F_0F_1I

Hidrólisis de Mg-ATP		
ATP-Mg	F_0F_1	F_0F_1I
K_m	140 μ M	142 μ M
V_{max}	8.33 μ molmin ⁻¹ mg ⁻¹	1.2 μ molmin ⁻¹ mg ⁻¹
Reconstitución en liposomas		
Hidrólisis de Mg-ATP		
ATP-Mg		
K_m	4.6mM	2.2mM
V_{max}	282 μ molmin ⁻¹ mg ⁻¹	39 μ molmin ⁻¹ mg ⁻¹
Hidrólisis de Mg-ATP		
ADP		
K_i	2.7mM	2.9mM
Recambio ATP- ³² Pi		
ATP-Mg		
K_m	1.8mM	0.870mM
V_{max}	8.1nmolmin ⁻¹ mg ⁻¹	17nmolmin ⁻¹ mg ⁻¹
Recambio ATP- ³² Pi		
ADP		
K_m	2.0mM	0.71mM
V_{max}	10.4nmolmin ⁻¹ mg ⁻¹	22.3nmolmin ⁻¹ mg ⁻¹
Recambio ATP- ³² Pi		
Mg ⁺²		
K_m	2.48mM	8.4nmolmin ⁻¹ mg ⁻¹
V_{max}		5.51mM
		42nmolmin ⁻¹ mg ⁻¹

Tabla 7. Parámetros cinéticos de los complejos activo (F_0F_1) y latente (F_0F_1I), obtenidos antes y después de reconstituirlos en liposomas por elución-centrifugación. Se muestra un resumen de los resultados obtenidos.

Al realizar el cociente hidrólisis/recambio en presencia de concentraciones crecientes de magnesio, se obtiene que para ambos complejos se obtiene un pico

máximo, que refleja el efecto inhibitorio del catión sobre la enzima en la reacción de hidrólisis. Para el complejo latente este pico es de mucho menor magnitud que para el complejo activo, lo que señala que en presencia del péptido regulador, la enzima está más acoplada, para llevar a cabo las reacciones de síntesis que de hidrólisis.

En cuanto al efecto de las concentraciones crecientes de ADP, se encontró el dato más sobresaliente de las relaciones hidrólisis/recambio. Como es sabido el ADP es un inhibidor de la hidrólisis del ATP, por ello a concentraciones crecientes de este compuesto la reacción de hidrólisis se ve inhibida tanto para el complejo latente como para el complejo activo, esta conducta es semejante a la del $Mg\cdot ATP$ en el recambio. El dato sobresaliente se refiere a la reacción de recambio, se encontró que en concentraciones crecientes del compuesto, tanto el complejo latente, como el activo presentan cinéticas de saturación. Debemos recordar que mientras el ADP es un producto inhibitorio de la reacción de hidrólisis, es un sustrato de la reacción de recambio (pseudosíntesis) y de la síntesis. La diferencia en V_{max} , era un dato esperado, pues ya se había evidenciado que el complejo que contiene al péptido regulador, tiene siempre mayor velocidad de recambio (y menor de hidrólisis [Vázquez-Contreras y cols., 1995]); lo que resulta muy interesante es la diferencia tan marcada en las K_m por este sustrato, de hecho la afinidad por el ADP para el complejo latente es un tercio de la que presenta el complejo activo (Tabla 7). Al calcular la relación hidrólisis/recambio en estas condiciones, se encontró que a medida que se incrementa la concentración de ADP, para ambos complejos, hay una disminución de la relación, y la diferencia se encuentra en la magnitud del cociente para el complejo latente y activo.

Una de las teorías para la función general de la proteína inhibitoria en el complejo ATPsintasa/ATPasa, propone que dado que el papel fisiológico del IF_1 es ayudar a conservar la poza de ATP generado por la cadena de transporte de electrones fotosintética o respiratoria, una de las funciones específicas del péptido inhibitorio es retardar la salida del ADP de la F_1 , lo cual inhibe la hidrólisis por que se evita que los sitios catalíticos de la enzima se llenen con el ATP [Tuena y cols., 1983 y 1986]. En otras palabras, el IF_1 retarda la velocidad con la que se lleva la reacción de hidrólisis del ATP vía el retardo de la salida de uno de los productos de la misma. En el sentido de la síntesis la presencia del péptido inhibitorio hace a la enzima más afín por el compuesto y permite que la reacción se lleve a cabo más eficazmente. Hay que recordar que la reacción de recambio $ATP \xrightarrow{32} Pi$ se considera una reacción parcial de la síntesis del ATP, ya que consiste de todos los pasos de esta reacción, incluyendo los pasos en dirección de la hidrólisis (ver Ecuación 1); el paso limitante de la reacción de síntesis es precisamente la liberación del ADP. En los resultados observados al trabajar con el complejo $F_0F_1I_1$, sólo la reacción de hidrólisis es sensible a la acción inhibitoria causada por el IF_1 .

Es muy probable que en presencia de la proteína inhibitoria, el complejo

ATPintasa/ATPasa pueda catalizar más eficazmente la reacción de síntesis, si la preparación con la que se trabajó para este reporte es física y funcionalmente parecida a la enzima nativa, y ésta se comporta de manera semejante en este sistema como lo hace *in situ*, entonces es posible que el IF₁ no solo juegue un papel inhibitor de la hidrólisis, sino que de alguna manera ayude a la enzima a adoptar las conformaciones necesarias para realizar la función fisiológica principal de la enzima, la síntesis del ATP.

La función del IF₁ es todavía controvertida; algunos grupos han encontrado que bajo ciertas condiciones y en partículas submitocondriales el IF₁ es un inhibidor bidireccional i.e. que inhibe tanto síntesis como hidrólisis (Harris, 1978; Harris y cols., 1979; Tuena y cols., 1983; Beltrán y cols. 1986), y otros que proponen que el IF₁ claramente sólo inhibe a la hidrólisis del ATP cuando se induce vía gradientes de pH artificiales [Schwermann y Pedersen, 1981; Husain y Harris, 1983]. De hecho se ha propuesto que es probable que la síntesis y la hidrólisis del ATP en el complejo ATPintasa/ATPasa se lleven a cabo en diferentes lugares de la enzima [Schwermann y Pedersen, 1986; Tuena y cols., 1988]. Con los resultados obtenidos en este trabajo, no se pueden resolver estas discrepancias con exactitud, pero los datos obtenidos por los experimentos realizados en este reporte sugieren que la función del IF₁ es regular la velocidad de hidrólisis y hacer más eficaz a la pseudosíntesis (incrementar la V_{max} y disminuir la K_m), en comparación con un complejo carente de regulación por el péptido inhibidor.

Finalmente y en busca de la composición polipeptídica real de los componentes del complejo F_0F_1 , se realizaron pruebas para evidenciar la composición del complejo latente, como geles desnaturalizantes en gradientes lineales de acrilamida y en dobles dimensiones. La preparación se obtiene con 18 bandas teñidas con azul de Coomassie, dentro de las cuales se encuentran 14 que seguramente forman parte del complejo ATPintasa/ATPasa. Dentro de las cuatro restantes, por homología y peso con la banda reportada por el grupo de Walker [Lutter y cols., 1993] se le asignó a la banda # 5 la identidad de creatina cinasa [Vázquez-Contreras y cols., 1995]. En general la preparación de ATPintasa/ATPasa (F_0F_1) [Vázquez-Contreras y cols., 1995] tiene un perfil electroforético semejante al reportado por diversos autores [Galante y cols., 1979; Dreyfus y cols., 1984; Laird y cols., 1986; Walker y cols., 1991]. De los complejos F_0F_1 reportados en la literatura, únicamente el complejo reportado por Walker y colaboradores (1991) contiene al inhibidor endógeno. Un hecho importante en cuanto a la composición polipeptídica de la preparación F_0F_1 es que no contiene al acarreador de adenin nucleótidos, como lo hace el complejo reportado por Serrano y colaboradores (1977). Este hecho es importante pues la presencia de esta proteína en la preparación dificulta mucho la incorporación de la ATPintasa/ATPasa en liposomas de lípidos isoelectrónicos como la fosfatidilcolina [Dabbeni-Sala y cols., 1981 y 1989]. Actualmente se hacen grandes esfuerzos por diversos grupos de investigación para establecer la composición polipeptídica del complejo F_0F_1 ATPintasa/ATPasa.

CONCLUSIONES

Se mejoraron algunos aspectos de la preparación de F_0F_1 , reportada por Dreyfus y colaboradores (1984), gracias al cambio del detergente LDAO por el LM. Este proceso permitió una comparación eficiente de las propiedades del los complejos latente y activo.

Encontramos las condiciones necesarias para reconstituir al péptido inhibidor en el complejo activo (F_0F_1). Esta preparación es cinéticamente semejante al complejo latente y, a partir de estos resultados se dedujo que la población de enzimas en la preparación del F_0F_1I no está contaminada con enzimas carentes de regulación por el IF₁.

Desarrollamos una metodología para reconstituir al complejo ATPsintasa/ATPasa en liposomas sellados de fosfatidilcolina mediante la modificación del protocolo de elución-centrifugación reportado por Garret y Penefsky (1975).

Las enzimas reconstituidas se orientan preferentemente en dirección al sustrato (por fuera del liposoma).

En cuanto al recambio $ATP \rightarrow ^{32}Pi$, se encontró que la reacción depende de la concentración de fosfato frío en el medio y que la presencia de BSA permite un mejor acoplamiento en los proteoliposomas.

A diferencia de lo que sucede para los complejos sin reconstituir para el efecto de concentraciones crecientes de $Mg\text{-}ATP$, hay una variación en la K_m para la hidrólisis en los complejos reconstituidos. En cuanto al recambio se obtuvo una V_{max} del doble y una K_m de la mitad para el complejo latente con respecto al activo. La relación hidrólisis/recambio en estas condiciones, se mantiene al rededor de dos para el complejo latente y de 20 para el complejo activo.

La relación hidrólisis/recambio en presencia de concentraciones crecientes de Mg^{2+} describe un pico máximo a una concentración de 1mM para el complejo latente y de 0.5 mM para el activo.

En presencia de concentraciones crecientes de ADP la hidrólisis del ATP llevada a cabo por ambos complejos es inhibida hasta cerca del 90%. La reacción de recambio en estas mismas condiciones describe una cinética de saturación, cuya K_m para el complejo latente, es un tercio que la que describe el complejo activo.

En cuanto a la composición polipeptídica del complejo se supone, por homología con la preparación del F_1 reportada por el grupo de Walker [Lutter y cols., 1993], que existe la copurificación de la creatina cinasa.

REFERENCIAS

- Abrahams, J.P., Lutter, R., Todd, R.J., van Raaij, M.J., Leslie, A.G. & Walker, J.E. (1993). Inherent asymmetry of the structure of F_1F_0 -ATPase from bovine mitochondria at 6.5 Å resolution. *EMBO J.* **12**, 1775-80.
- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., & Walker, J.E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F_1F_0 -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-8.
- Adolfson, R., McClung, J.A. & Moudrianakis, E.N. (1975). Electrophoretic Microheterogeneity Subunit Composition of the 13S Coupling Factors of Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation. *Biochemistry* **14**, 1727-35.
- Aggeler, R., Chicas-Cruz, K., Cai, S-X., Keana, J.F.W. y Capaldi, R.A. (1992). Introduction of reactive cysteine residues in the ϵ subunit of *Escherichia coli* F_1F_0 ATPase, modification of these sites with Tetrafluorophenyl Azide-Maleimides, and examination of changes in the binding of the ϵ subunit when different nucleotides are in catalytic sites. *Biochemistry* **31**, 2956-61
- Aggeler, R. & Capaldi, R.A. (1993). ATP hydrolysis-linked structural changes in the N-terminal part of the gamma subunit of the *E. coli* F_1F_0 -ATPase examined by cross-linking studies. *J. Biol. Chem.* **268**, 14576-79.
- Al-Shawi, M.K., Parsonage, D. & Senior, A.E. (1990). Thermodynamic analysis of the catalytic pathway of the F_1F_0 -ATPase from *E. coli*. Implications regarding the nature of energy coupling by F_1F_0 -ATPase. *J. Biol. Chem.* **265**, 4402-10.
- Amzel, L.M. & Pedersen, P.L. (1978). Crystallization and X-Ray diffraction studies of the F_1 component of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **253**, 2067-69.
- Amzel, L.M., Bianchet, M.A. & Pedersen, P.L. (1992). Quaternary structure of ATP synthases: symmetry and asymmetry in the F_1 moiety. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 429-33.
- Andraloje, P.J. & Harris, D.A. (1990). Promotion and inhibition of catalytic cooperativity of the Ca^{2+} -dependent ATPase activity of spinach chloroplast coupling factor 1 (CF1). *Biochim. Biophys. Acta* **1016**, 55-62.
- Araki, A., Kuroki, O., Ito, M., Kuwada, M. & Tachibana, S. (1989). Novel peptide inhibitor (SPAI) of Na^+K^+ -ATPase from porcine intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 496-502.
- Araki, K., Kuwada, M., Ito, O., Kuroki, J., & Tachibana, S. (1990). Four disulfide bonds allocations of Na^+K^+ -ATPase inhibitor (SPAI). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **172**, 42-6.
- Arnaiz, D.L., De Lima, M.A.G.D. & Giraldi, E. (1988). *Biochem. Res.* **13**, 229-35.
- Audinet, C., Dianoux A.C. & Vignais, P.V. (1986). Immunological studies on the beef heart natural ATPase inhibitor: localization of the antigenic determinants in the inhibitor molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**, 364-71.
- Baldwin, J.M., (1993). The probable arrangement of the helices in the G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **12**, 1693-103.
- Beltrán, C., Tuena de Gómez-Puyou, M., Darzon, A. & Gómez-Puyou, A. (1986). Simultaneous synthesis and hydrolysis of ATP regulated by the inhibitor protein in submitochondrial particles. *Eur. J. Biochem.* **160**, 163-68.

- Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C.O., Schirmer, N.K., Sprinzl, M., Hilgenfeld, R. (1993). Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature* **365**, 126-32.
- Bianchet, M., Yaern, X., Hulliien, J., Pedersen, P.L. & Amzel, L.M. (1991). Mitochondrial ATP synthase. Quaternary structure of the F₁ moiety at 3.6 Å determined by X-ray diffraction analysis. *J. Biol. Chem.* **266**, 21197-201.
- Boyer, P.D., Cross, R.L. & Momsen, W. (1973). A new concept of energy coupling in oxidative phosphorylation based on a molecular explanation of the oxygen exchange reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 2837-39.
- Boyer, P.D. (1993). The binding-change mechanism for ATP synthase. Some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 215-50.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-54.
- Bullough, D.A. Ceccarelli, E.A. Roise, D. & Allison, W.A. (1989a) Inhibition of the bovine heart mitochondrial F₁-ATPase by cationic dyes and amphipathic peptides. *Biochem. Biophys. Acta.* **975**, 377-83.
- Bullough, D.A. Ceccarelli, E.A., Verburg, J.G., & Allison, W.A. (1989b). Localization of sites modified during inactivation of the bovine heart mitochondrial F₁-ATPase by quinacrine mustard using [³H]-aniline as a probe. *J. Biol. Chem.* **264**, 9155-63.
- Capaldi, R.A., Aggeler, R., Gogol, E.P. & Wilkens, S. (1992). Structure of the *Escherichia coli* ATP synthase and role of the γ and ϵ subunits in coupling catalytic site and proton channeling functions. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 435-9.
- Capaldi, R.A., Aggeler, R., Turina, P., & Wilkens, S. (1994). Coupling between catalytic sites and the proton channel in F₁F₀-type ATPases. *TIBS* **19**, 284-9.
- Chandra, S., Adhikary, G., Sikdar, R. & Sen, P. (1993). An Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor protein from rat brain cytosol. *Biochim. Biophys. Acta* **1144**, 33-8.
- Chernyak, B.V., Khodjaev, E. Yu & Kozlov, I.A. (1985). The oxidation of sulfhydryl groups in mitochondrial F₁-ATPase decreases the rate of its inactivation by the natural protein inhibitor. *FEBS Lett.* **187**, 253-6.
- Chernyak, B.V., Dukhovich, V.F. & Khodjaev, E. Yu. (1987). The effect of the natural protein inhibitor on H⁺-ATPase in hepatoma 22a mitochondria. *FEBS Lett.* **215**, 300-4.
- Cintrón, N.M. & Pedersen, P.L. (1979). A protein inhibitor of the Mitochondrial Adenine triphosphatase complex of rat liver. *J. Biol. Chem.* **254**, 3439-43.
- Codd, R., Cox, G.B., Guss, J.M., Solomon, R.G. & Webb, D. (1992). The expression, purification and crystallization of the ϵ subunit of the F₁ portion of the ATPase of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **238**, 306-9
- Collinson, I.R., Runswick, M.J., Buchanan, S.K., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., van Raaij, M.J., Griffiths, D.E., & Walker, J.E. (1994). F₀ membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition and reconstitution with F₁-ATPase. *Biochemistry* **33**, 7971-8.
- Cox, G.B., Jans, D.A., Fimmel, A.I., Gibson, E. & Hatch, I. (1984). The mechanism of ATP synthase conformational change by rotation of the b-subunit. *Biochim. Biophys. Acta* **768**, 201-8.

- Cross, R.L., Grubmeyer, C., & Pekefsky, H.S. (1982). Mechanism of ATP hydrolysis by beef heart mitochondrial ATPase (Rate enhancements resulting from cooperative interactions between multiple catalytic sites). *J. Biol. Chem.* **257**, 12102-5.
- Cunningham, D. & Cross, R.L. (1988). Catalytic site occupancy during ATP hydrolysis by MF₁-ATPase. Evidence for alternating high affinity sites during steady state turnover. *J. Biol. Chem.* **263**, 18850-6.
- Dabbeni-Sala, F., Pitotti, A. & Bruni, A. (1981). *Biochem. Biophys. Acta* **637**, 400-7.
- Dabbeni-Sala, F., Vázquez-Laslop, N., Fachinetti, A., Devars, S. & Dreyfus, G. (1989). Modulation of mitochondrial F₁F₀ catalysis by boundary bulk phase phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **158**, 1013-20.
- Dallman, H.G., Flynn, T.G., & Dunn, S.D. (1992). Of the 2-ethyl-3-(3-dimethylamino)propyl-carbodiimide induced cross-link between the β and ϵ subunits of *E. coli* F₁ ATPase. *J. Biol. Chem.* **267**, 18953-60.
- Damuni, Z., Humphreys, J.S. & Reed, L.J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 285-89.
- Das, A.M. & Harris, D.A. (1990). *Am. J. Physiol.* **259**, H1264-69.
- Das, A.M. & Harris, D.A. (1991). *Biochim. Biophys. Acta.* **1096**, 284-90
- de Meis, L., Tuena de Gómez-Puyou, M., & Gómez-Puyou, A. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**, 274-9.
- Dempsey, M. (1984) *Current Topics in Cellular Regulation* **24**, 63-86.
- Dianoux, A.C., Tsugita, A., Klein, G. & Vignais, P.V. (1982) *FEBS Lett.* **140**, 223-8.
- Dianoux, A.C. & Hoppe, J. (1987). Complete amino-acid sequence of the natural inhibitor protein from the mitochondria of yeast *Candida utilis* Eur. *J. Biochem.* **163**, 155-60.
- Di Pietro, A., Penin, F., Julliard, J., H., Godinot, C. & Gautheron, D., C. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**, 1319-25.
- Dreyfus, G., Gómez-Puyou, A. & Tuena de Gómez-Puyou, M. (1981). Electrochemical gradient induced displacement of the natural ATPase inhibitor protein from mitochondrial ATPase as detected by antibodies. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **100**, 400-6.
- Dreyfus, G. & Satre, M. (1984). The ϵ subunit as an ATPase inhibitor of the F₁-ATPase in *E. coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **229**, 212-9.
- Dreyfus, G., Celia, H. & Ramirez, J. (1984). Isolation of the mitochondrial F₁F₀ adenosine triphosphatase by sepharose-hexylammonium chromatography: properties and reconstitution in liposomes. *Anal. Biochem.* **142**, 215-20.
- Duncan, T.M., Parsonage, D. & Senior, A.E. (1986). Structure of nucleotide-binding domain in the β -subunit of *E. coli* F₁-ATPase. *FEBS Lett.* **208**, 1-6.
- Dunn, S.D. (1982). The isolated gamma subunit of *E. coli* F₁-ATPase binds the ϵ subunit. *J. Biol. Chem.* **257**, 7354-9.
- Dunn, S.D., Zadorozny, V.D., Tozer, R.G. & Orr, L.E. (1987). ϵ subunit of *E. coli* F₁-ATPase: effects on affinity for aurovertin on inhibition of product release in unisite ATP hydrolysis. *Biochemistry* **26**, 4488-93.
- Fabiato, A. (1988). Computer programs for calculating total from specified free or free specified total ionic in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *En Methods in Enzymology*. (Fleisher S. & Fleisher B. eds.) **157**, 378-417 Academic. Press. New York & London.

- F Feinstein, D.L. & Moudrianakis, E.N. (1984). Response of the adenosine triphosphatase activity of soluble latent F_1 enzyme from beef heart mitochondria to changes in Mg^{2+} and H^+ concentrations. *J. Biol. Chem.* **259**, 4230-6.
- Feldman, R.I. & Sigman, D.S. (1982). The synthesis of enzyme-bound ATP by a soluble chloroplast coupling factor. *J. Biol. Chem.* **257**, 1676-83.
- Fillingame, R.H. (1990). Molecular mechanics of ATP Synthesis by F_1F_0 -Type H^+ -transporting ATP Synthases. En: *The Bacteria* Vol. XII (Editor, T.A. Krulwich) Academic Press, Inc. USA. New York. páginas 345-91.
- Fishman, M.C. (1979). Endogenous digitalis-like activity in mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4661-3.
- Fillingame, R.H. (1992). H^+ transport and coupling by the F_0 sector of the ATP synthase: Insights into the molecular mechanism of function. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 485-92.
- Fiske, C.H. & Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375-400.
- Frangione, B., Rosenwasser, E., Penefsky, H.S. & Pullman, M.E. (1981). Amino acid sequence of the protein inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7403-7407.
- Fujii, S., Hashimoto, T., Miura, R., Yamano, T. & Tagawa, K.J. (1983) *J. Biochem. (Tokyo)* **93**, 189-196.
- Futai, M., Sternweis, P.C., & Heppel, L.A. (1974). Purification and properties of reconstitutively active and inactive adenosine triphosphatase from *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 2725-9.
- Futai, M., Noumi, T., & Maeda, M. (1989). ATP synthase (H^+ -ATPase): Results by combined biochemical and molecular biological approaches. *Annu. Rev. Biochem.* **58**, 111-36.
- Galante, Y.M., Wong, S.Y., & Hatefi, Y. (1979). Composition of complex V of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J. Biol. Chem.* **254**, 12372-8.
- Garrett, N.E. & Penefsky, H.S. (1975). Interaction of the adenine nucleotides with multiple binding sites on beef heart mitochondria adenine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **250**, 6640-7.
- Girvin, M.E. & Fillingame, R.H. (1993). Helical structure and folding of c of F_1F_0 ATP synthase: 1H NMR resonance assignments and NOE analysis. *Biochemistry* **32**, 12167-77.
- Girvin, M.E. & Fillingame, R.H. (1994). Harpine folding of subunit c of F_1F_0 ATP synthase: 1H distance measurements to nitroxide-derivatized aspartyl-61. *Biochemistry* **33**, 665-74.
- Glynn, I.M. & Chappell, J.B. (1964). A simple method for the preparation of ^{32}P -labeled adenosine triphosphatase of high specific activity. *Biochem. J.* **90**, 147-9.
- Gogarten, J.P., Kibar, H., Dittrich, P., Taiz, L., Bowman, E.J., Bowman, B., Manolson, M., Poole, R., Date, T., Oshima, T., Konoshi, J., Denda, T. & Yoshida, M. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6661-5.
- Gogol, E.P., Johnston, E., Aggeler, R., & Capaldi, R.A. (1990). Ligand-dependent structural variations in *Escherichia coli* F_1F_0 ATPase revealed by cryoelectron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9585-9.
- Gómez-Fernández, J.C. & Harris, D.A. (1978). A thermodynamic analysis of the interaction between the mitochondrial coupling adenosine triphosphatase and its naturally occurring inhibitor protein. *Biochim. J.* **176**, 967-75.
- Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. & de Meis, L. (1986). Synthesis of ATP by soluble mitochondrial F_1 ATPase and F_1 -inhibitor-protein complex in the presence of organic solvents. *Eur. J. Biochem.* **159**: 133-40.

- Gornall, A.G., Bardawill, C.J., & David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reactions. *J. Biol. Chem.* **177**, 751-66.
- Gräber, P. & Labahn, A. (1992). Proton transport-coupled unisite catalysis by the H(+)-ATPase from chloroplasts. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 493-7.
- Gromet-Elhanan, Z. (1992). Identification of subunits required for the catalytic activity of the F₁-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 447-52.
- Grubmeyer, C., Cross, R.L. & Penefsky, H.S. (1982). Mechanism of ATP hydrolysis by beef heart mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.* **257**, 12092-100.
- Guerrieri, F., Zanotti, F., Che, Y.W., Scarfo, R. & Papa, S. (1987). Inactivation of the mitochondrial ATPase inhibitor protein by chemical modification with diethylpyrocarbonate. *Biochim. Biophys. Acta* **892**, 284-93.
- Hatefi, Y., Yagi, T., Phelps, D.C., Wong, S.Y., Vik, S.B. & Galante, Y.M. (1982). Substrate binding affinity changes in mitochondrial energy-linked reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1756-60.
- Harris, D.A., von Tscharner, V. & Radda, G.K. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **548**, 72-84.
- Harris, D.A. (1984) en H⁺-ATPase (ATPase): Structure, Function, Biogenesis (Papa, S., Altendorf, K., Ernster, L. & Packer, L. eds.) pp. 387-95. Adriatica Editrice, Bari.
- Harris, D.A. (1989). Azide as a probe of cooperative interactions in the mitochondrial F₁-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **974**, 156-162.
- Harris, D.A. & Das, A.M. (1991). Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem. J.* **280**, 561-573.
- Hashimoto, T., Yoshida, Y. & Tagawa, K. (1990). Regulatory protein of F₁F₀-ATPase: role of ATPase inhibitor. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**, 27-38.
- Hatefi, Y. (1993). ATP synthesis in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **218**, 759-67.
- Hekman, C., Tomich, J.M. & Hatefi, Y. (1991). Mitochondrial ATP synthase complex. Membrane topography and stoichiometry of the F₀ subunit. *J. Biol. Chem.* **266**, 13564-71.
- Horowitz, B.A. (1979). *FASEB J.* **38**, 2170-6.
- Horstman, L.I. & Racker, E. (1970). Partial resolution of enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **245**, 1336-44.
- Huang, F.L. & Glinemann, W.H., (1976) *Eur. J. Biochem.* **87**, 341-51.
- Husain, I. & Harris, D.A. (1983). ATP synthesis and hydrolysis in submitochondrial particles subjected to an acid-base transition. *FEBS Lett.* **160**, 110-4.
- Husain, I., Jackson, P.J. & Harris, D.A. (1985). Interaction between F₁-ATPase and its naturally occurring inhibitor protein. Studies using a specific anti-inhibitor antibody. *Biochim. Biophys. Acta* **806**, 64-74.
- Ichikawa, N., Yoshida, Y., Hashimoto, T., Ogasawara, N., Yoshikawa, H., Imamoto, F. & Tagawa, K. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6274-8.
- Ishizuka, N., Fukushima, Y., Urayama, O., & Akera, T. (1991). Na⁺K⁺-ATPase inhibition by an endogenous peptide, SPAI-1, isolated from porcine duodenum. *Biochim. Biophys. Acta* **1089**, 257-66.
- Iwamoto, A., Miki, J., Maeda, M., & Futai, M. (1990). H⁺-ATPase gamma subunit of *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **265**, 5043-5048

- Jackson, P.J. & Harris, D.A. (1986). Sites of protein-protein interaction on the mitochondrial F_1F_0 ATPase inhibitor protein. *Biochem. J.* **235**, 577-83.
- Jackson, P.J. & Harris, D.A. (1988). The mitochondrial ATP synthase inhibitor protein binds near C-terminus of the β subunit. *FEBS Lett.* **229**, 224-8.
- Jerome, F., Sah, G., Kumar and Mohanty (1993). pH dependent conformational changes modulate functional activity of the mitochondrial ATPase inhibitor protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 1521-8.
- Joshi, S. & Burrows, R. (1990). ATP synthase complex from bovine heart mitochondria (subunit arrangement as revealed by neighbor analysis and susceptibility). *J. Biol. Chem.* **265**, 14518-25.
- Kalashnikova, T., Y., Milgrom, Y., M. & Postanogova, N.V. (1988). The complex of mitochondrial F_1 -ATPase with the natural inhibitor protein is unable to catalyze single-site ATP-hydrolysis. *FEBS Lett.* **230**, 163-6.
- Khodjaev, E.Y., Komarnitsky, F.B., Capozza, G., Dunhovich, V.F. & Papa, S. (1990). Activation of a complex of ATPase with the natural protein inhibitor in submitochondrial particles. *FEBS Lett.* **272**, 145-8.
- Klein, G., Satre, M., Dianoux, A.C. & Vignais, P.V. (1980). Radiolabeling of natural adenosine triphosphatase inhibitor with phenyl (14 C)isothiocyanate and study of its interactions with mitochondrial adenosine triphosphatase. Localization of inhibitor. *Biochemistry* **19**, 2919-28.
- Klein, G., Satre, M., Zaccari, G. & Vignais, P. (1982). Spontaneous aggregation of the mitochondrial natural inhibitor in salt solutions as demonstrated by gel filtration and neutron scattering (Application to the concomitant purification of the ATPase inhibitor and F_1F_0 ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **681**, 226-32.
- Kluge, C., Laubinger, W. & Dimroth, P. (1992). The Na(+)-translocating ATPase of *Propionigenium modestum*. *Biochem. Soc. Trans.* **20**, 572-7.
- Kluge, C. & Dimroth, P. (1993). Specific protection by Na+ or Li+ of the F_1F_0 -ATPase of *Propionigenium modestum* from the reaction with dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* **268**, 14557-60.
- Knowles, A.F., Guillory, R. & Racker, E. (1971). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **246**, 2673-9.
- Kuki, M. (1988). Functional domains of the ϵ subunit of the *E. coli* H^+ -ATPase (F_0F_1). *J. Biol. Chem.* **263**, 17437-42.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-5.
- Laird, D.M., Eble, K.S. & Cunningham, C.C. (1986). Reconstitution of mitochondrial F_0F_1 ATPase with phosphatidylcholine using the non ionic detergent octylglucoside. *J. Biol. Chem.* **261**, 14844-50.
- Lanzetta, P.A., Alvarez, L.J., Reinach, P.S. y Candia, O.A. (1979) *Anal. Biochem.* **100**, 95-97.
- LaRoe, D.J., & Vik, S.B. (1992). Mutations at Glu-32 and His-39 in the epsilon subunit of the *Escherichia coli* F_1F_0 ATP synthase affect its inhibitory properties. *J. Bacteriol.* **174**, 633-7.
- Laubinger, W. & Dimroth, P. (1988). Characterization of the ATPase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump. *Biochemistry* **27**, 7531-7.
- Laubinger, W., Deckers-Hebestreit, G., Altendorf, K. & Dimroth, P. (1990). A hybrid Adenosine triphosphatase composed of F_1 of *E. coli* and F_0 of *Propionigenium modestum*. Is functional sodium ion pump. *Biochemistry* **29**, 5458-63.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Lebowitz, M.S., & Pedersen, P.L. (1993). Regulation of the with ATP synthase/ATPase complex: cDNA cloning, sequence overexpression, and secondary structural characterization of a functional inhibitor protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **301**, 64-70.
- Lee C.P. & Ernster, L. (1967). Energy-coupling in nonphosphorylating submitochondrial particles. *Meth. Enzymol.* **X**, 543-8.
- Lippe, G., Sorgato, M.C. & Harris, D.A. (1988a). Kinetics of the release of the mitochondrial inhibitor protein. Correlation with synthesis and hydrolysis of ATP. *Biochim. Biophys. Acta* **933**, 1-11.
- Lippe, G., Sorgato, M.C. & Harris, D.A. (1988b). The binding and release of the inhibitor protein are governed independently by ATP and membrane potential in ox-heart submitochondrial vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **933**, 12-23.
- Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E. & Trumpower, B.L. (1987). Purification of highly active cytochrome *bc*₁ complexes from phylogenetically diverse species by a single chromatographic procedure. *Biochim. Biophys. Acta* **891**, 227-41.
- Lopez-Mediavilla, C., Vigny, H. & Godinot, C. (1993). Docking the mitochondrial inhibitor protein IF₁ to a membrane receptor different from the F₁-ATPase β subunit. *Eur. J. Biochem.* **215**, 487-96.
- Lötscher, H.R., de Jong, C., & Capaldi, R.A. (1984). Interconversion of high and low adenosine triphosphatase activity forms of *E. coli* F₁ by the detergent lauryldimethylamine oxide. *Biochemistry* **23**, 4140-3.
- Löw, H. & Vallin, I. (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 361-74.
- Matsubara, H., Hase, T., Hashimoto, T., & Tagawa, K. (1981) *J. Biochem. (Tokyo)*, **90**, 1159-65.
- Matsuno-Yagi, A., Yagi, T. & Hatefi, Y. (1985). Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation: Effects of specific F₁ modifiers on ligand-induced conformation changes of F₁. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7550-4.
- Matsuno-Yagi, A. & Hatefi, Y. (1988). Role of energy in oxidative phosphorylation. *J. Bioenerg. Biomembr.* **20**, 481-502.
- Matsuno-Yagi, A. & Hatefi, Y. (1990). Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **265**, 82-8.
- Matsuno-Yagi, A. & Hatefi, Y. (1993a). Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. Different effects of F₁ inhibitors on unisite and multisite ATP hydrolysis by bovine submitochondrial particles. *J. Biol. Chem.* **268**, 1539-45.
- Matsuno-Yagi, A. & Hatefi, Y. (1993b). Studies on the mechanism of oxidative phosphorylation. ATP synthesis by submitochondrial particles inhibited at F₀ by venturicidin and organotin compounds. *J. Biol. Chem.* **268**, 6168-73.
- Mendel-Hartvig, J & Capaldi, R.A. (1991). Catalytic site nucleotides and inorganic phosphate dependence of the conformation of the ϵ subunit in *Escherichia coli* adenosinetriphosphatase. *Biochemistry* **30**, 1278-84.
- Milgrom, Y.M., (1991). When beef-heart mitochondrial F₁-ATPase is inhibited by inhibitor protein a nucleotide is trapped in one of the catalytic sites. *Eur. J. Biochem.* **200**, 789-95.
- Mimura, H., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Ichikawa, N. & Tagawa, K. (1993). Binding of an intrinsic ATPase inhibitor to the interface between alpha- and beta-subunits of F₁F₀-ATPase upon de-energization of mitochondria. *J. Biochem.* **113**, 350-4.

- Montero-Lomeli, M. & Dreyfus, G. (1987). Activation of Mg-ATP hydrolysis in isolated *Rhodospirillum rubrum* H⁺-ATPase. *Arch. Biochem. Biophys.* **257**, 345-51.
- Murataliev, M.B. & Boyer, P.D. (1992). The mechanism of stimulation of MgATPase activity of chloroplast F₁-ATPase by non-catalytic adenine-nucleotide binding, (Acceleration of the ATP-dependent release of inhibitory ADP from the catalytic site. *Eur. J. Biochem.* **209**, 681-7.
- Nakamoto, A., Futai, M. (1994), *Biophys. J.* **66**, A118.
- Nelson, N., Nelson, H. & Racker, E. (1972). Partial resolution of the enzymes catalyzing phosphorylation (Purification and properties of an inhibitor isolated from chloroplast coupling factor 1). *J. Biol. Chem.* **247**, 7657-62.
- Nelson, N., Kanner, B.I., & Gutnick, D.L. (1974). Purification and properties of Mg²⁺-Ca²⁺ adenine triphosphatase from *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 2720-4.
- Nelson, N. & Taiz, L. (1989). Evolution in ATPases. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 113-6.
- Norayanan, N., Newland, M. & Neurdorf, D. (1983). Inhibition of sarcoplasmic reticulum calcium pump by a cytosolic protein(s) endogenous to heart and slow skeletal muscle but not fast skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* **735**, 53-66.
- Norling, B., Tourikas, C., Hamasur, B. & Glaser, E. (1990). Evidence for an endogenous ATPase inhibitor protein in plant mitochondria. Purification and characterization. *Eur. J. Biochem.* **188**, 247-52.
- Noumi, T., Taniai, M., Manazawa, H., & Futai, M. (1986). Replacement of arginine 246 by histidine in beta subunit of *E coli* H⁺-ATPase resulted in loss of multi-site activity. *J. Biol. Chem.* **261**, 9196-201.
- O'Neal, C.C. & Boyer, P.D. (1984). Assessment of rate of bound substrate interconversions and mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **259**, 5761-5767.
- Ovchinnikov, Y.A., Modyanov, N.N., Ginkevich, V.A., Aldanova, N.A., Trubetskaya, O.E. Nazimov, I.V., Hundal, T., & Ernster, L. (1984), *FEBS Lett.* **166**, 19-22.
- Panchenko, M.V. & Vinogradov, A.D. (1985). Interaction between the mitochondrial ATP synthase and ATPase inhibitor protein (Active/inactive slow pH-dependent transition of the inhibitor protein). *FEBS Lett.* **184**, 226-30.
- Penefsky, H.S. (1985). Reaction mechanism of membrane bound ATPase of submitochondrial particles from beef heart. *J. Biol. Chem.* **260**, 13728-13734.
- Penefsky, H.S. & Cross, R.L. (1991). Structure and mechanism of F₁F₀-type ATP synthases and ATPases. *Adv. Enzymol.* **64**, 173-214.
- Power, R., Cross, R. L. & Harris, D. A. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **742**, 128-141.
- Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. & Racker, E. (1960). Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation (Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **233**, 3322-9.
- Pullman, M. E. & Monroy, G.C. (1963). A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **238**, 3762-9.
- Richter, M.L., Patrie, W.J. & Mccarty, R.E. (1984). Preparation of the ε subunit and ε subunit-deficient chloroplast coupling factor 1 in reconstitutively active forms. *J. Biol. Chem.* **259**, 7371-7373.

- Richter, M.L. & McCarty, R.E. (1987). Energy-dependent changes in the conformation of the ϵ subunit of the chloroplast ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **262**, 15037-40.
- Rilo, M.C., Cataldi-de Flombaun, M.A. & Stoppam, A.O. (1989) *Biochem. Int.* **18**, 447-54.
- Rothschild, K.J. (1992). FTIR difference spectroscopy of bacteriorhodopsin: toward a molecular model. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 147-67.
- Rouslin W. (1987) *Am. J. Physiol.* **252**, H662-H627.
- Rouslin, W. & Broge, C. (1989). Factors affecting the reactivation of the mitochondrial adenine-5-triphosphatase and the release of inhibitor protein during and following the reenergization of mitochondria from ischemic cardiac muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **275**, 385-94.
- Rouslin, W., Broge, C. & Chernyak, B.V. (1993). Effects of Zn^{2+} on the activity and binding of the mitochondrial ATPase inhibitor protein, IP1. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 297-306.
- Runswick, M.J., Walker, J.E., Gibson, B.W. & Williams, D. H. (1986). The frayed N-terminal of the inhibitor protein of bovine mitochondrial F_1 -ATPase *Biochem. J.* **235**, 515-9.
- Sah, J.F., Kumar, C., & Mahanty, P. (1993), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **194**, 1521-8.
- Sakamoto, J. & Tonomura, Y. (1983) *J. Biochem. (Tokyo)* **93**, 1601-14.
- Satre, M., de Jerphanion, M.B., Huet, J. & Vignais, P.V. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **397**, 241-55.
- Schwerzmann, K. & Pedersen, P.L. (1981). Proton-adenine triphosphatase complex of rat liver mitochondria. Effect of energy state on its interaction with the adenine triphosphatase inhibitor peptide. *Biochemistry* **20**, 6305-11.
- Schwerzmann, K. & Pedersen, P.L. (1986). Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 1-18.
- Schuermans-Stekhoven, F. & Bonting, S.L. (1981) *Physiol. Rev.* **61**, 1-76.
- Seeling, J., McDonald, P.M. & Scherer, P.G. (1987). Phospholipid head groups as sensor of electric charge in membranes. *Biochemistry* **26**, 7535-41.
- Senior, A.E. (1979). Tightly bound magnesium in mitochondrial adenosine triphosphatase from beef heart. *J. Biol. Chem.* **254**, 11319-22.
- Senior, A.E. & Wise, J., G. (1983). *J. Mol. Biol.* **73**, 105-24.
- Senior, A.E. (1992). Catalytic sites of *E. coli* F_1 -ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**, 479-84.
- Serrano, R., Kanner, B.I. & Raker, E., (1976). Purification and properties of the proton-translocating ATP triphosphatase complex of bovine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **251**, 4253-61.
- Shapiro, A.B. & McCarty, R.E. (1990). Substrate binding-induced alteration of nucleotide binding site properties of chloroplast coupling factor 1. *J. Biol. Chem.* **265**, 4340-4337.
- Skakoon, E.N. & Dunn, S.D. (1993). Localization of conserved residue histidine-38 of the ϵ subunit of *E. coli* ATP synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **302**, 272-278.
- Smith, T.J. & Edelman, I.S. (1979). *FASEB J.* **3**, 2150-3.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klensk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85.

- Smith, J.B. & Sterweis, M. (1977) *Biochemistry* **16**, 306-11.
- Stigall, D., Galante, Y.M. & Hatafi, Y. (1978). Preparations and properties of an ATP-Pi exchange complex (complex V) from bovine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **253**, 956-64.
- Stokes, D.L. & Nakamoto, R.K. (1994). Structures of P-type and F-type ion pumps. *Current Opinion in Structural Biology* **4**, 197-203.
- Stout, J.S., Patridge, B.E., Dibbern, D.A., & Scutser, S.M. (1993). Peptide analogs of the beef heart mitochondrial F₁-ATPase inhibitor protein. *Biochemistry* **32**, 7496-7502.
- Tal, D.M., Katchalsky, S., Lichtstein, D. & Karliah, S.J.D. (1986). Endogenous "ouabain-like" activity in bovine plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **135**, 1-8.
- Tang, C., Wilkens, S. & Capaldi, R.A. (1994). Structure of the gamma subunit of *Escherichia coli* F₁ ATPase probed in trypsin digestion and biotin-avidin binding studies. *J. Biol. Chem.* **269**, 4467-72.
- Tong, L., de Vos, A.M., Milburn, N.V., & Kim, S.H. (1991). Cristal structures at 2.2Å resolution of the catalytic domains of normal *ras* protein and an oncogenic mutant complex with GDP. *J. Mol. Biol.* **217**, 603-16.
- Tuena de Gómez-Puyou, M., Martins, O.B. & Gómez-Puyou, A. (1988) *Biochem. Cell Biol.* **66**, 677-82.
- Turina, P., Aggeler, R., Lee, R.S., Senior, A.E., & Capaldi, R.A. (1993). The cysteine introduced into the alpha subunit of the *E. coli* F₁-ATPase by the mutation alpha R376C is near the alpha-beta subunit interface and close to a noncatalytic nucleotide binding site. *J. Biol. Chem.* **268**, 6978-84.
- Valdés, A. & Dreyfus, G. (1987). Structural and functional differences in H⁺-ATPases with native and reconstituted inhibitor protein. *Biochem. Int.* **15**, 459-66.
- van de Stadt, R.J., de Boer, B.L. & van Dam, K. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **347**, 240-54.
- Vázquez-Contreras, E. (1992). Aislamiento y caracterización del complejo F₁F₀-I (ATPasa mitocondrial) de corazón de bovino. Facultad de Ciencias, UNAM, Tesis de Licenciatura. 126 pp.
- Vázquez-Contreras, E., Vázquez-Laslop, N.C. & Dreyfus, C.G. (1995). The native F₁F₀-I inhibitor protein complex from beef heart mitochondria. Reconstitution into liposomes and functional characterization. *J. Bioenerg. Biomembr.* (en prensa).
- Vázquez-Laslop, N. & Dreyfus G. (1986). Mitochondrial H⁺-ATPase Activation an amine oxide detergent. *J. Biol. Chem.* **261**, 7807-10.
- Vik, S.B. & Dao, N.N. (1992). Prediction of transmembrane topology of F₀ proteins from *Escherichia coli* F₁F₀ ATP synthase using variational and hydrophobic moment analyses. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 199-207.
- Walker, J.E., Fearnley, I.M., Gay, N.J., Gibson, B.W., Nothrop, F.D., Powell, S.J., Runswick, M.J., Sarastre, M. & Tybulewicz, V.L.J. (1985). *J. Mol. Biol.* **184**, 677-701.
- Walker, J.E., Runswick, M.L. & Poulter, L. (1987). ATP synthase from bovine mitochondria. The characterization and sequence analysis of two membrane-associated subunits and the corresponding cDNAs. *J. Mol. Biol.* **197**, 89-100.
- Walker, E., J., Lutter, R., Dupuis, A. & Runswick, J. 1991. Quantification of the subunits of the F₁F₀-ATPase from bovine mitochondrial. *Biochemistry* **30**, 5369-78.

- Walker, J. (1994). The regulation of catalysis in ATPsynthase. *Curr. Op. Struct. Biol.* **4**, 912-918.
- Webb, M.R., Grubmeyer, C., Penefsky, H.S. & Trentham, D.R. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 11637-9.
- Wilkins, S., & Capaldi, R.A. (1994). Asymmetry and structural changes in ECF1 examined by cryoelectron microscopy. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **375**, 5781-6.
- Xiao, R., & Penefsky, H. (1994). Unisite catalysis and the delta subunit of F_1F_0 -ATPase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **269**, 19232-7.
- Yamada, E.W., Schiffman, F.H. & Huzel, N.J. (1980). Ca^{2+} -regulated release of an ATPase inhibitor protein from submitochondrial particles derived from skeletal muscles of rat. *J. Biol. Chem.* **255**, 267-73.
- Yamada, E.W., Huzel, N.J. & Dickinson, J.C. (1981). Reversed by uncouplers of oxidative phosphorylation and by Ca^{2+} of the inhibition of mitochondrial ATPase activity by the inhibitor protein of rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **256**, 10203-7.
- Yamada, E.W. & Huzel, N.J. (1983) *Biosci. Rep.* **3**, 947-54.
- Yamada, E.W., & Huzel, N.J. (1988). The calcium-binding ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **263**, 11498-503.
- Yamada, E.W. & Huzel, N.J. (1989). Calcium-binding ATPase inhibitor protein of bovine heart mitochondria. Role in ATP synthesis and effect of Ca^{2+} . *Biochemistry* **28**, 9714-8.
- Yoshida, M. (1983). The synthesis of the enzyme-bound ATP by the F_1F_0 -ATPase from the thermophilic bacterium PS3 in 50% dimethylsulfoxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114**, 907-12.
- Zhang, K., Wang, Z.Q., & Gluck, S. (1992a). A cytosolic inhibitor of vacuolar H^+ -ATPases from mammalian kidney. *J. Biol. Chem.* **267**, 14593-42.
- Zhang, K., Wang, Z.Q., & Gluck, S. (1992b). Identification and partial purification of a cytosolic activator of vacuolar H^+ -ATPases from mammalian kidney. *J. Biol. Chem.* **267**, 9701-5.
- Zhang, Y., Oldenburg, M., & Fillingame, R.H. (1994). Suppressor mutations in F_1 subunit c recouple ATP-driven H^+ translocation in uncoupled Q42E F_1 subunit c mutant of *Escherichia coli* F_1F_0 ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **269**, 10221-4.
- Zhuo, S., Paik, S.R., Register, J.A. & Allison, W.S. (1993). Photoinactivation of the bovine heart mitochondrial F_1F_0 -ATPase by [^{14}C] decalium cross-links phenylalanine-403 or phenylalanine-406 of an α subunit to a site or sites contained within residues 440-459 of a β subunit. *Biochemistry* **32**, 2221-7.

PERSPECTIVAS

Las perspectivas del trabajo se pueden enmarcar dentro de diversos grupos a saberse. Uno de estos se refiere a la caracterización del intercambio de nucleótidos en el complejo ATPsintasa/ATPasa en presencia o ausencia del péptido regulador, no existen datos en la literatura acerca de la regulación de este evento mediada por la presencia de la proteína inhibidora en un complejo F_0F_1 aislado. Utilizando el sistema de luciferín-luciferasa, se puede conocer los eventos que suceden en el intercambio de nucleótidos en el complejo latente y compararse con el activo.

Dado que el complejo activo puede reconstituir al péptido regulador, es de interés el conocer cómo varían las reacciones de hidrólisis y recambio en este sistema reconstituido en liposomas. Existen reportes de que la enzima no funciona igual si contiene o no al péptido inhibidor o si se le ha reconstituido, pero estos datos se llevaron a cabo en un sistema de partículas submitocondriales. Estos resultados pueden ser diferentes en el complejo ATPsintasa/ATPasa aislado y reconstituido en partículas lipídicas. De hecho no se sabe si el complejo activo reconstituye al F_1 una vez que ha sido reconstituido en liposomas. Se pueden hacer pruebas con agentes entrecruzadores de diferentes longitudes y cuantificar que sucede con la proteína inhibidora, hacia donde se mueve en condiciones de hidrólisis o de recambio y aportar datos que despejen la duda de si este péptido se mueve de lugar en la F_1 o abandona a la enzima cuando está catalizando.

Se ha propuesto que el inhibidor natural de la F_1 se une selectivamente a un carboxilo terminal de una de las subunidades β , lo que soporta la idea de que la enzima tiene una asimetría funcional. Es posible sondear este hecho exponiendo a la enzima al compuesto DCCD marcado radioactivamente y cuantificar la existencia de carboxilos expuestos en presencia o ausencia de la proteína inhibidora y posiblemente, se encuentre que en el complejo activo, la cantidad de estos grupos expuestos sea mayor que en el complejo latente. Se puede agregar a esta idea el hecho de tener a la enzima en condiciones de hidrólisis y/o de recambio para verificar la exposición de los carboxilos.

Una posibilidad bastante fructífera es trabajar con el sistema de reconstitución con otras enzimas y probar que tan eficiente es cuando se usan otras proteínas diferentes al complejo ATPsintasa/ATPasa. Una vez que este proceso se haya verificado y de resultar satisfactorio, tratar de hacer una reconstitución heteróloga con alguna bomba de protones y cuantificar directamente la síntesis de ATP llevada a cabo por el complejo F_0F_1 en presencia o no del F_1 , pues tampoco se tienen reportes de un hecho como este en un sistema aislado.

Con técnicas de fluorescencia se puede cuantificar la estequiometría de protones bombeados por la enzima comparando estos datos para la enzima que posee y la que carece de regulación del péptido regulador.

Finalmente la composición lipídica de los liposomas que contengan a la ATPsintasa/ATPasa es un factor que se ha reportado controla la catálisis de la enzima, dado que existen diferentes tipos de fosfolípidos disponibles, se puede obtener una mezcla de ellos que se asemeje a la composición lipídica de la membrana interna mitocondrial, con esto dar al complejo F_0F_1 un ambiente hidrofóbico como el que tiene *in situ* y verificar si este hecho modifica las características encontradas hasta el momento en el sistema reconstituido en liposomas de fosfatidilcolina.

APENDICE.

Los resultados obtenidos en este trabajo fueron presentados en los siguientes congresos:

Presentación de Poster en The Second IUBMB Conference. Biochemistry of Cell Membranes. Bari, Italia. Septiembre de 1993:

On the Characterization of the Native F_0F_1 -Inhibitor Protein Complex from Beef Heart Isolated by Sepharose- HA Chromatography.

Vázquez-Contreras, E., Vázquez-Laslop, N.C. & Dreyfus, G.

Presentación Oral en VIII Congreso de Bioenergética y Biomembranas, Morelos, México, Noviembre de 1993:

Caracterización Funcional y Polipeptídica del Complejo V Mitocondrial de Corazón de Bovino.

Vázquez-Contreras, E. y Dreyfus, G.

Presentación Oral en el XX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, Zacatecas, México, Octubre de 1994:

El Complejo ATPsintasa/ATPasa Mitocondrial y su Inhibidor Endógeno: Relaciones Hidrólisis/Recambio.

Vázquez-Contreras, E. y Dreyfus, G.

Parte de los experimentos mostrados en esta tesis fueron sometidos a revisión y fueron aceptados para publicación Vázquez-Contreras, E., Vázquez-Laslop, N.C. & Dreyfus, C.G. (1995). The native F_0F_1 -Inhibitor protein complex from beef heart mitochondria. Reconstitution into liposomes and functional characterization. *J. Bioenerg. Biomembr.* (en prensa). Dos manuscritos más están en preparación, uno referente a la metodología desarrollada para la reconstitución del complejo ATPsintasa/ATPasa y otro referente a las relaciones hidrólisis/recambio.