

03062

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

Z
rey

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL CCH**



**PURIFICACION Y RECONSTITUCION A VESICULAS LIPIDICAS
DE UNA GLICOPROTEINA DE MEMBRANA INTERNA
MITOCONDRIAL ASOCIADA AL SISTEMA UNIORTADOR
DE Ca²⁺**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A:

LIC. IBB NORMA ANGELICA CORONA DE LA PEÑA

MEXICO, D. F.

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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

**Esta tesis fue realizada en el departamento de
Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología
"Ignacio Chávez" bajo la dirección del
Dr. Edmundo Chávez Cossio**

Miembros del jurado:

**Dr. Edmundo Chávez Cossio
Dr. Edgar Zenteno-Galindo
Dr. Salvador Uribe Carvajal
Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyou
Dr. Juan Pablo Pardo**

A Emma, a Jaime, a Pedro

Vivir lo simple y lo complejo.
y amar el reflejo de un lago
que ahoga al atardecer,
por los sueños,
los infinitos sueños...

A quienes con su apoyo me han hecho comprender tantas cosas. Por haberme dado la oportunidad de conocer un mundo en el que el interés por algo que parece pequeñito, y la sincera dedicación, llevan a una persona a perseguir incansablemente una meta. Aquel mundo en el que la pasión por el trabajo y el amor al conocimiento son la fuerza que lo puede todo: la Ciencia. Gracias a todos ellos.

Agradezco al Dr. Edmundo Chávez Cossio por su guía y por el decidido apoyo y la confianza que mostró hacia mí desde el momento en que ingresé a su laboratorio.

Agradezco de igual manera a los Drs. Edgar Zenteno Galindo, Diego González-Halphen y Felipe Masso por su asesoramiento y valiosas observaciones acerca este trabajo.

Por último, quiero agradecer al Dr. Keith Carlid y su grupo; en especial a Martin Jaburek, Boui, Creg, y Peter del Instituto de Graduados de Oregon, por su hospitalidad y por la asesoría brindada para la realización de los experimentos de reconstitución y transporte.

Índice

	Pag.
Presentación	I
Dedicatoria	III
Agradecimientos	V
Índice	VI
Abreviaturas	VIII
Resumen	I
Introducción	2
<i>Importancia del transporte de Ca^{2+} en el</i>	
<i>metabolismo mitocondrial</i>	2
<i>Captación de Ca^{2+} y daño mitocondrial</i>	4
<i>Características del sistema de captación</i>	
<i>de Ca^{2+} mitocondrial</i>	6
A. <i>Características cinéticas del uniportador</i>	
mitocondrial de Ca^{2+}	7
B. <i>Dependencia de la entrada de Ca^{2+} a la temperatura</i>	9
<i>Purificación del uniportador mitocondrial de Ca^{2+}</i>	13
A. <i>Los primeros intentos</i>	16
B. <i>Evidencia de la presencia de glicoproteínas</i>	
<i>en la mitocondria</i>	17
C. <i>Purificación de una glicoproteína mitocondrial</i>	
<i>asociada a movimientos de Ca^{2+}</i>	19
D. <i>Otras proteínas asociadas con el uniportador</i>	22

E. La glicoproteína aislada por el grupo de Mironova	23
F. La obtención de un extracto con las propiedades ionofóricas del uniportador	26
Objetivo	29
Materiales y Métodos	30
Aislamiento de mitocondrias	30
Obtención de partículas submitocondriales	30
Preparación de extractos proteicos	31
Purificación de la glicoproteína de 36 KDa	31
Reconstitución de proteínas en liposomas	32
Ensayos de transporte de Ca^{2+}	34
Determinación del volumen intravesicular	34
Determinación de las velocidades de transporte de Ca^{2+}	35
Detección de citocromos	37
Determinación de la composición de aminoácidos de la fracción rCA	37
Determinación del contenido total de carbohidratos	37
Determinación de la composición de carbohidratos de la fracción rCA	37
Ensayos de unión de Ca^{2+} de la fracción rCA	37
Determinación de proteína por el método de Biuret	38
Determinación de proteína por el método de Amido-Negro	38
Otras metodologías	38
Electroforesis	38
Enfoque isoelectrico	39
Tinción con rojo de rubino	40

Tinción con azul alciano	40
Resultados	41
Purificación de la fracción glicoprotéica	41
A. Solubilización con colato y precipitación con sulfato de amonio	41
B. Separación en columna de Sefarosa 4B-Con A	44
Caracterización electroforética de la fracción rCA y contenido de citocromos de las diferentes fracciones	46
Reconstitución de las fracciones proteicas a vesículas lipídicas	50
Ensayos de transporte de Ca^{2+}	51
Sensibilidad del transporte de Ca^{2+} a inhibidores y activadores	59
Composición de aminoácidos	63
Ensayos de unión de Ca^{2+}	58
Composición de carbohidratos de la fracción rCA	66
Contenido de carbohidratos de las diferentes fracciones	67
Ensayos de unión de Ca^{2+}	68
Discusión	71
Conclusiones y perspectivas	80
Bibliografía	81

Abreviaturas

ADP	Adenosin-5'difosfato
CCP	Carbonilcianuro-n-cloro-fenilhidrazona
DOC	Desoxicolato de sodio
DTT	ditiotriteil
EDTA	etilendiamina tetraacetico
EPR	Resonancia paramagnetica de espin
FMA	Fluoresceinmercuriaetate
HEDTA	N-hidroxi-etilendiamina tetraacetico
HEPES	(N-[hidroxietil]piperacina-N'-[2-etanosulfonico])
HQNO	N-oxo-2-heptil-4-hidroxiquinoleina
HPLC	Cromatografia liquida de alta resolucion
Pi	fosfato
SDS	dodecil sulfato de sodio
TCA	ácido tricloroacético
TEA	trietanolamina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
Tris	[Tris(hidroxi metil)aminometano]

FALLA DE COPIA

Resumen

El transporte de Ca^{2+} al interior de la mitocondria está mediado por un uniportador electroforético, dependiente del potencial eléctrico transmembranal e inhibible por rojo de rutenio, Mg^{2+} y lantánidos (para una revisión ver Gunter y Pfeifer, 1990). Este acarreador es altamente selectivo (Drahota y cols., 1969; Vainio y cols., 1970), extremadamente rápido (McMillin-Wood y cols., 1980; Vercesi y cols., 1978) y probablemente de naturaleza glicoprotéica (Sotocasa y cols., 1971; Gomez-Puyou y cols., 1971; Mironova y cols., 1982). Dicho uniportador tiene una importante participación en la regulación del metabolismo mitocondrial, y se han hecho numerosos intentos por purificarlo (Lehninger, 1971; Sotocasa y cols., 1971; Gómez-Puyou, 1972; Blondin, 1974; Carafoli y Sotocasa, 1974; Jeng y Shamoo, 1980; Moronova y cols., 1982; Ying y cols., 1991; Zazueta y cols., 1994). Recientemente, Zazueta y cols. (1994) aislaron una fracción mitocondrial capaz de mediar el transporte de Ca^{2+} a vesículas lipídicas, este transporte es dependiente del potencial negativo interno e inhibible por rojo de rutenio. Con el objeto de purificar al uniportador mitocondrial de Ca^{2+} , en este trabajo se intentó determinar cuál de los componentes en el extracto obtenido por Zazueta y cols. (1994) es el responsable de la actividad de transporte de Ca^{2+} . Utilizando cromatografía de afinidad en una columna de Concanavalina A, se obtuvo una preparación glicoprotéica que contiene un componente predominante de 36 kDa. Dicha preparación fue reconstituida a vesículas lipídicas cargadas con el indicador fluorescente fura-2, encontrándose que es capaz de mediar el transporte de Ca^{2+} . El proceso es dependiente de un potencial transmembranal y es inhibible por rojo de rutenio. La actividad de esta fracción fue mayor que la que presenta el extracto crudo de este mismo sistema. Además se calculó una K_i para el rojo de rutenio de 16 nM, y una K_i para La^{3+} de 3.9 μM . La actividad de la fracción glicoprotéica obtenida es inhibible por espermina con una K_i de 140 nM. Se hicieron además estudios de composición de aminoácidos y composición de carbohidratos, y se encontró que la porción glicosídica de la preparación representa menos del 10% del peso de ésta, y de acuerdo a su composición, es probablemente una estructura oligomerosa sencilla. Estos resultados sin embargo, no aportan datos conclusivos acerca de la composición del acarreador de Ca^{2+} ya que nuestra preparación contiene al menos un 20% de otros componentes, además de la proteína de 36 kDa. Los resultados que se presentan en este trabajo muestran que la fracción glicoprotéica obtenida a partir del extracto de Zazueta y cols. (1994) contiene a los componentes del sistema uniportador de Ca^{2+} . Sin embargo, a pesar de que las constantes de inhibición, y la dependencia en el potencial electroquímico transmembranal corresponden a lo reportado en la literatura, la actividad de transporte de Ca^{2+} es significativamente menor, por lo que no se puede identificar plenamente a esta preparación como el uniportador de Ca^{2+} , y, por otra parte, es necesario establecer su relación con algún contaminante de otro compartimento celular, que lleve a cabo la función.

Introducción

Importancia del transporte de Ca^{2+} en el metabolismo mitocondrial

La concentración de Ca^{2+} dentro de la mitocondria es regulada por 3 mecanismos independientes. La entrada de Ca^{2+} se efectúa a través de un uniportador rápido, y la salida involucra 2 procesos que pueden depender o no de la presencia de Na^+ en el medio. Además, existe un cuarto mecanismo que permite la liberación de grandes cantidades de Ca^{2+} , a través de un poro inespecífico que se forma en la membrana interna mitocondrial en respuesta a varios agentes (Gunter y Pfeiffer, 1990) (Figura 1).

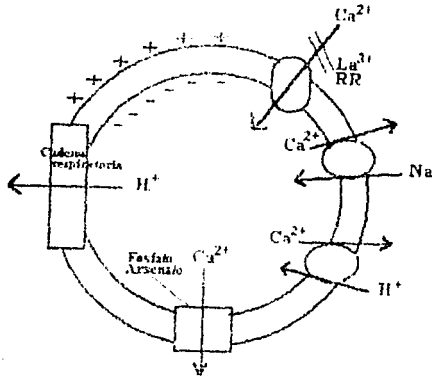


Figura 1. Transporte de Ca^{2+} a través de la membrana interna mitocondrial. El Ca^{2+} entra a la mitocondria por medio de un uniportador dependiente del potencial eléctrico transmembranal mantenido por el bombeo de protones a través de los complejos respiratorios. Este transporte es inhibible por rojo de rutenio (RR), Mg^{2+} y La^{3+} . La salida de Ca^{2+} se efectúa en intercambio con Na^+ o H^+ , y a través de un poro inespecífico que se forma en la membrana interna mitocondrial cuando la concentración de Ca^{2+} es elevada y están presentes ciertos agentes como el arsenato o el fosfato.

FALLA DE ORIGEN

La principal función de los sistemas de transporte de Ca^{2+} en la mitocondria es regular la concentración de este ión dentro de la matriz; debido a que la concentración de Ca^{2+} ionizado (libre) afecta directamente la velocidad de flujo de la vía de fosforilación oxidativa. La velocidad de síntesis de ATP varía en presencia de concentraciones de Ca^{2+} entre 0.1 y 1 μM , mismo intervalo en el que puede variar la concentración de este ión en respuesta a estímulos hormonales o eléctricos en condiciones fisiológicas (Denton y McCormack, 1980; Hansford, 1985; Brand y Murphy, 1987). Algunas hormonas como el glucágon y la vasopresina, así como algunos agonistas α -adrenérgicos pueden incrementar la concentración citoplásmica de Ca^{2+} de 0.1 μM hasta 0.5 o 1 μM (para una revisión ver Marban y Rink, 1980; Hoek, 1992), y esto puede traducirse en un incremento en la concentración intramitocondrial Ca^{2+} (Moreno-Sánchez y Hansford, 1988), por lo que se ha propuesto que el Ca^{2+} es un regulador de la velocidad de síntesis de ATP mitocondrial in vivo (Hansford, 1985; McCormack y cols., 1990).

Varios sistemas enzimáticos mitocondriales son activados o inhibidos por la presencia de Ca^{2+} . La **tabla 1** muestra las concentraciones de Ca^{2+} libre necesarias para obtener la mitad del efecto máximo sobre la enzima ($K_{0.5}$ para Ca^{2+}).

Tabla 1. Sistemas enzimáticos mitocondriales regulados por Ca^{2+} . Tomada de Moreno Sánchez, 1982.

Activación	Localización	$K_{0.5}$ para Ca^{2+} (μM)	Referencias
Glicerol 1-Pi deshidrogenasa	Cara externa de la membrana interna mitocondrial.	0.6	Wernette y cols., 1981
Piruvato deshidrogenasa fosfatasa	Matriz mitocondrial	1.08	McCormack y Denton, 1980
Isocitrato deshidrogenasa	Matriz mitocondrial	1.19	Denton y cols., 1978
Oxoglutarato deshidrogenasa	Matriz mitocondrial	1.03	McCormack y Denton, 1979

Succinato deshidrogenasa	Cara interna de la membrana interna mitocondrial	1.3	Ezawa y Ogata, 1979
--------------------------	--	-----	---------------------

Inhibición			
Piruvato carboxilasa	Matriz mitocondrial	10-25 nmol/mg	Foldes y Barritt, 1977
Piruvato deshidrogenasa cinasa	Matriz mitocondrial	0.05-0.1	Cooper y cols., 1974
Carbamil fosfato sintetasa	Matriz mitocondrial	10-15 nmol/mg	Meijer y cols., 1981

El Ca^{2+} ejerce su efecto activador a través de una disminución de la K_m para el sustrato de la enzima, teniendo un pequeño o nulo efecto sobre la V_{max} . En la oxoglutarato deshidrogenasa, la K_m para oxoglutarato cambia de 2.5 mM a 0.31 mM con 1.9 μM de Ca^{2+} (McComack y Denton, 1979). La piruvato deshidrogenasa cinasa es inhibida de un modo no competitivo por el calcio disminuyendo un 55% la V_{max} con 7 μM de Ca^{2+} (Cooper y cols., 1974); y otras enzimas son afectadas por concentraciones de Ca^{2+} algo mayores, como es el caso de la isocitrato deshidrogenasa, cuya K_m disminuye de 0.28 mM a 0.5 mM con 28 μM de Ca^{2+} (Denton y cols., 1978), la NADH ubiquinona reductasa ($K_{0.5} = 5.7-6$ mM) (Kotlyar y cols., 1992), la piruvato carboxilasa y el transportador de piruvato (sensibles a concentraciones de Ca^{2+} entre 10 y 100 M) (Foldes y Barritt, 1977).

Además de las deshidrogenasas antes mencionadas, ciertos componentes de la cadena respiratoria son probablemente regulados por Ca^{2+} , como complejo bc1 mitocondrial (Murphy y cols., 1990), y el acarreador de adenin nucleótidos (Foldes y Barritt, 1977) ya que el Ca^{2+} es capaz de aumentar el flujo fosforilante en presencia de succinato y rotenona, o NADH a concentraciones saturantes (Doussiere y cols., 1984).

Captación de Ca^{2+} y daño mitocondrial

La mitocondria es el organelo con la mayor capacidad de acumulación de Ca^{2+} , siendo capaz de acumular más de 2 mol/mg, debido a esto algunos

investigadores han evaluado la idea de que la mitocondria funcione en condiciones fisiológicas como regulador de la concentración citoplásmica de Ca^{2+} (Nicholls y Crompton, 1980; Nicholls y Scott, 1980). La velocidad de salida de Ca^{2+} se mantiene esencialmente constante una vez que se han acumulado 10 nmol de Ca^{2+}/mg , mientras que la actividad de la vía de entrada de Ca^{2+} es altamente dependiente de la concentración de Ca^{2+} externo; si la entrada es lo suficientemente rápida para contrarrestar el efecto de los sistemas de salida, se producirá una acumulación neta del catión. En esta situación llamada acumulación masiva, el Ca^{2+} puede precipitarse en la matriz mitocondrial en forma de fosfato de calcio formando gránulos de hidroxapatita.

Suspensiones de mitocondrias aisladas son capaces de bajar la concentración de Ca^{2+} extramitocondrial hasta 1 μM ; en este estado estacionario la entrada de Ca^{2+} a través del uniportador es balanceada por el flujo de Ca^{2+} (Puskin y cols., 1976). Esta acumulación masiva han sido observada en condiciones patológicas como la necrosis coagulativa (Farber, 1981; Farber, 1982), en las que las células están expuestas a daños en sus estructuras por altas concentraciones de Ca^{2+} . Una concentración de Ca^{2+} de más de 100 μM puede dañar la estructura de los ácidos nucleicos y de algunas proteínas (Farber, 1990; Nicotera y cols., 1990; Reed, 1990). Y aún concentraciones menores de este ión pueden interferir con cinasas dependientes de Mg-ATP (Blackshear y cols., 1988), además de producir una activación de proteasas y fosfolipasas sensibles a Ca^{2+} . Además, la acumulación masiva de Ca^{2+} produce ciertas alteraciones del metabolismo mitocondrial, como el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, la inhibición de la respiración, y la estimulación de la actividad hidrolítica de la ATPasa (Slater y Cleland, 1953; Brierley y cols., 1964). Por lo tanto, en condiciones fisiológicas, como se había mencionado anteriormente, la principal función de los sistemas mitocondriales de transporte de Ca^{2+} es la de regular la concentración de este ión dentro de la matriz.

Dada la importancia que tiene el proceso de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria para la transducción de energía celular, es perfectamente justificable la caracterización cinética así como la purificación de la proteína responsable de este sistema de transporte, con el fin de entender su funcionamiento y regulación.

Características del sistema de captación de Ca^{2+} mitocondrial

Vasington y Murphy (1962) descubrieron que la mitocondria es capaz de acumular Ca^{2+} . La captación de Ca^{2+} está asociada a la respiración y a la hidrólisis de ATP, pudiéndose captar este catión incluso en contra de su gradiente. En presencia de P_i y ADP la mitocondria es capaz de acumular hasta $3 \mu\text{mol}$ de Ca^{2+} por mg de proteína (Scarpa y Azzone, 1970) y debido a esto se dedujo que era un proceso activo (Chance, 1965). Sin embargo, inhibidores de la cadena respiratoria inhiben la entrada de Ca^{2+} inducida por sustratos oxidables, mientras que en presencia de ATP el transporte es inhibido por oligomicina, un inhibidor de la ATPasa mitocondrial (Lehninger y cols., 1967). Aún más, el transporte de Ca^{2+} también puede ser promovido por la salida de K^+ inducida por valinomicina (Scarpa y Azzone, 1970). Todas estas evidencias indican que la entrada de Ca^{2+} depende de la energía del potencial transmembranal, es decir, el mecanismo de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria es un proceso secundario dependiente de la respiración o de la hidrólisis del ATP.

Las mitocondrias de todos los vertebrados y de muchos invertebrados estudiadas son capaces de transportar Ca^{2+} (Bygrave, 1977; Lehninger y cols., 1967), manifestándose este transporte en ciertas especies desde las etapas embrionarias (Bygrave y Ash, 1977). En condiciones cercanas a las fisiológicas la cantidad de Ca^{2+} que se acumula es mucho menor a $3 \mu\text{M}/\text{mg}$, alrededor de 50 nmol de $\text{Ca}^{2+} / \text{mg}$ en ausencia de P_i , o de $100\text{-}200 \text{ nmol}/\text{mg}$ con P_i . En estas condiciones las funciones mitocondriales no se alteran (Slater y Cleland, 1953; Brierley y cols., 1964).

Varios cationes son transportados a la matriz mitocondrial aparentemente a través del mismo acarreador. La selectividad de este transporte es la siguiente: $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} \gg \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$ (Drahota y cols., 1969; Vainio y cols., 1970; Reed y Bygrave, 1974), además son transportados Fe, Pb y lantánidos (Kapeor y cols., 1985; Reed y Bygrave, 1974b; Vainio y cols., 1970). En mitocondrias de corazón, el transporte de Mg^{2+} ocurre por un transportador diferente al acarreador de Ca^{2+} (Brierley y cols., 1987; Cronpton y cols., 1976; Diwan, 1987) mientras que en cerebro e hígado los inhibidores del transporte de Ca^{2+} inhiben también el transporte de Mg^{2+} (Rugolo y Zoccarato, 1984; Kum, 1976). Aún cuando el transportador de Ca^{2+} tiene baja actividad de transporte de Mg^{2+} (Chapell y cols., 1963; Vainio y cols., 1970), la completa exclusión del transporte de Mg^{2+} a través del acarreador de Ca^{2+} parece ser tejido específica.

La entrada de Ca^{2+} es reversible en presencia de desacoplantes. Esto es más fácil de demostrar utilizando Sr^{2+} o Mn^{2+} en vez de Ca^{2+} : el rojo de rutenio, que es un inhibidor de la entrada de Ca^{2+} (Mela, 1969; Puskin y cols., 1976; Vasington y cols. 1972; Wingrove y Gunter, 1986) inhibe la rápida salida de Mn^{2+} inducida por CCCP, en mitocondrias previamente cargadas con Mn^{2+} (Gunter y Gunter, 1978); por tanto, la mayor parte de esta salida de Mn^{2+} debe ser debida al transporte reverso de Mn^{2+} a través del transportador de Ca^{2+} .

Existe evidencia que la entrada de Ca^{2+} no se efectúa en intercambio con algún otro ión (Lehninger y cols., 1967; Rottenberg y Scarpa, 1974; Scarpa y Azzone, 1970). La entrada de Ca^{2+} a la mitocondria ocurre a favor su gradiente electroquímico, como se esperaría para un uniportador, siguiendo la relación

$$\Delta\mu_{\text{Ca}^{2+}} = RT \ln \frac{[\text{Ca}^{2+}]_f}{[\text{Ca}^{2+}]_d} + 2F(\varphi_f - \varphi_d)$$

donde $\Delta\mu_{\text{Ca}^{2+}}$ es el potencial electroquímico transmembranal de Ca^{2+} , R es la constante de los gases, T es la temperatura, $[\text{Ca}^{2+}]_f$ es la concentración de Ca^{2+} fuera de la mitocondria, $[\text{Ca}^{2+}]_d$ es la concentración de Ca^{2+} dentro de la mitocondria, F es la constante de Faraday, y φ_f y φ_d corresponden al potencial eléctrico transmembranal fuera y dentro de la mitocondria respectivamente.

A. Características cinéticas del uniportador mitocondrial de Ca^{2+}

El estudio cinético del transporte de Ca^{2+} debe tomar en cuenta tanto la concentración de Ca^{2+} como el potencial transmembranal. Esto implica un problema metodológico, ya que en presencia de concentraciones micromolares de Ca^{2+} la velocidad de transporte puede ser lo suficientemente elevada como para competir con el transporte de protones generado por la cadena respiratoria, lo que disminuye el potencial transmembranal de 200 a 150 mV. Por tanto, las velocidades de transporte de Ca^{2+} registradas a diversas concentraciones del ión resultan menores que en condiciones de potencial constante.

El uniportador de Ca^{2+} presenta alta afinidad por este catión. La concentración de Ca^{2+} a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima

($K_{0.5}$) se ha reportado entre 1-189 μM (Åkerman, 1977b; Crompton y cols., 1976; Hutson, 1977; Pfeiffer y cols., 1976; Vinogradov y Scarpa, 1973). Los valores de velocidad máxima (V_{max}) en mitocondrias de hígado oscilan entre 700 y 1200 $\text{nmol}/\text{min mg}$ (Bragadin y cols., 1979; Hutson y cols., 1976; Vinogradov y cols., 1972), mientras que en mitocondrias de corazón tienen un valor entre 400 y 1170 $\text{nmol}/\text{min mg}$ (McMillin-Wood y cols., 1980; Vercesi y cols., 1978). Generalmente se dice que el transporte es mayor en hígado que en corazón, pero la velocidad más alta que se ha reportado se midió en mitocondrias de corazón de perro: 1750 $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ (McMillin-Wood y cols., 1980). Por otro lado, aún los valores más altos de velocidad reportados resultan subestimados, ya que la velocidad es limitada por el transporte de electrones.

Algunos autores encuentran una dependencia sigmoideal con respecto a la concentración de Ca^{2+} , con un coeficiente de Hill que varía entre 1.7 y 2 (Bragadin y cols., 1979; Bygrave y cols., 1971; Heaton y Nicholls, 1976; Hutson y cols., 1976; Reed y Bygrave, 1975; Scarpa y Graziotti, 1973; Vinogradov y Scarpa, 1973). Sin embargo, otros autores no observan este fenómeno, o mencionan que depende de la temperatura o de la fuerza iónica del medio, así como de la presencia de Mg^{2+} u otras condiciones (Åkerman, 1977b; Åkerman, 1977; Bragadin y cols., 1979; Crompton y cols., 1976). Una alta concentración de iones impermeables como Mg^{2+} o Li^{2+} o bajas temperaturas incrementan la sigmoidealidad del proceso (Bragadin y cols., 1979). Además, como se necesita estimar el valor de V_{max} para calcular el coeficiente de Hill, tampoco estos valores son confiables. Pero se puede considerar, en general, que el mejor estimado del coeficiente de Hill está alrededor de 2.

Un coeficiente de Hill de 2 indica que el Ca^{2+} se une al menos a dos sitios en el uniprotector, que pueden ser ambos de transporte o bien, uno de ellos de transporte y otro de regulación. Se ha descrito (Vinogradov y Scarpa, 1973) que cuando se unen pequeñas cantidades de Ca^{2+} , la sigmoidealidad del transporte de Mn^{2+} se pierde y su velocidad aumenta, lo cual se explica diciendo que el Ca^{2+} se une a un sitio de activación que aumenta la velocidad de transporte de Mn^{2+} . La velocidad de disociación de Ca^{2+} de este sitio es lenta, comparada con la velocidad de transporte (Kröner, 1986; Riley y Pfeiffer, 1986).

B. Dependencia de la entrada de Ca^{2+} a la temperatura

La dependencia del transporte de Ca^{2+} a la temperatura puede utilizarse para calcular la energía de activación del proceso si se construye una gráfica de Arrhenius (\ln de la velocidad contra $1/T$). Como la velocidad de determinado proceso depende de su paso limitante, es importante determinar adecuadamente la naturaleza de este último. El proceso de transporte de Ca^{2+} debe comprender un paso de activación además de los pasos de asociación, transporte y liberación característicos de los acarreadores. Ya que la entrada de Ca^{2+} depende de la formación de un potencial eléctrico transmembranal, este pudiera ser el paso limitante del proceso.

En un medio con sacarosa, utilizando succinato como sustrato, Akerman (1977) calculó una energía de activación de 40 kJ/mol, y la adición de 2 mM de Mg^{2+} redujo esta energía a 18 kJ/mol, mientras que la adición de 0.4 mM de espermina redujo casi a cero la energía de activación. Como el Mg^{2+} generalmente inhibe el transporte, esta disminución de la energía de activación parecería anómala, sin embargo, esto puede reflejar la unión de Mg^{2+} al sitio activador, mientras que la inhibición se presentaría cuando el Mg^{2+} se uniera al sitio de transporte, inhibiendo de manera competitiva el transporte de Ca^{2+} , aún cuando sea o no transportado al otro lado de la membrana. Por su parte, el lantano, que probablemente interactúe con el sitio activo, no tiene efecto significativo sobre la energía de activación. En un medio que contenía potasio la energía de activación fue de 70 kJ/mol ($<21^\circ\text{C}$) y ni el Mg^{2+} ni la espermina alteraron significativamente este valor. En cuanto al pH, la velocidad de entrada de Ca^{2+} aumenta dentro del intervalo de pH entre 7 y 8 (Heaton y Nicholls, 1976).

C. Inhibición de la entrada de Ca^{2+}

Los inhibidores del transporte de Ca^{2+} pueden ser de cuatro tipos. Entre los inhibidores competitivos se encuentran iones que también son transportados a través del unportador, como el Sr^{2+} , el Mn^{2+} , el Ba^{2+} , el Fe^{2+} y los lantánidos. Existe otro grupo de inhibidores que está formado por cationes como el Mg^{2+} , las poliaminas, y protones, que, a pesar de no ser transportados por el unportador, interfieren en el proceso de transporte de Ca^{2+} por unión o apantallamiento de cargas. El tercer grupo de inhibidores lo componen

policationes como el rojo de rutenio y la hexamina de cobalto (Tashmukhamedov y cols., 1972). Estos inhibidores son muy potentes y presentan una baja constante de inhibición (K_i). Finalmente, existen algunos agentes farmacológicos como los β -bloqueadores (Noack y Greeff, 1971), las guanidinas (Davidoff, 1974) y los diuréticos (Gamba, 1974) que actúan como inhibidores del transporte de Ca^{2+} .

Debido a que la entrada de Ca^{2+} es un proceso cooperativo, no es fácil demostrar la inhibición competitiva. Por ejemplo, la adición de Ca^{2+} (Vinogradov y Scarpa, 1973) o Pr^{2+} (Vaino y cols., 1970) en los primeros instantes del transporte de Mn^{2+} cambia la cinética de transporte de una forma sigmoidal a una forma hiperbólica, pero también estimula el proceso (Vinogradov y Scarpa, 1973; Vaino et al. 1970). Esto debido probablemente a la ocupación de un sitio activador por los iones adicionados. Como los lantánidos se transportan muy lentamente a través del uniportador, pueden ser utilizados como inhibidores competitivos efectivos (Reed y Bygrave, 1974b). De los datos de inhibición del transporte de Ca^{2+} se ha calculado que existe un máximo de 0.001 nmol/mg de sitios de transporte sensibles a lantano en la membrana interna mitocondrial (Reed y Bygrave, 1974). Este dato representa uno de los estimados más confiables del número de acarreadores de Ca^{2+} en este organelo.

La inhibición del transporte de Ca^{2+} por Mg^{2+} , especialmente en mitocondrias de corazón (Vaino y cols., 1970) es parcialmente revertida por Mn^{2+} (Allsläre y cols., 1985). El cadmio es otro catión que inhibe competitivamente el transporte de Ca^{2+} (Chavez y cols., 1985). El efecto del cadmio es prevenido por la presencia de ditrotreitol, lo que indica que, así como el Ca^{2+} y el cadmio entra a la mitocondria e interactúa con algún grupo sulfidrilo en la membrana, el cual es esencial para la translocación del Ca^{2+} (Chavez y cols., 1985). Las poliaminas, espermina y espermidina, inhiben el transporte de manera similar al Mg^{2+} , con una K_i de 180 μM (Akerman, 1977b; Lenzen y cols., 1992). Sin embargo, a bajas concentraciones de Ca^{2+} dichas poliaminas activan el transporte con una $K_{(1)}$ de 50 μM en vez de inhibirlo (Lenzen y cols., 1992). La inhibición por Mg^{2+} o poliaminas puede ser debida a la unión de estos agentes cerca del sitio de transporte o a efectos de apantallamiento de cargas.

El inhibidor más utilizado en el estudio del transporte de Ca^{2+} mitocondrial ha sido el polication rojo de rutenio (Rossi y cols., 1973) un catión hexavalente que tiñe mucopolisacáridos (Gustafson y Phil, 1967). El rojo de rutenio es capaz de unirse a sitios dentro de proteínas a los que se une también

el Ca^{2+} (Lutt, 1971), sin embargo, la inhibición que produce sobre el transporte de Ca^{2+} es de tipo no competitiva (Reed y Bygrave, 1974), con una K_i de 30 nM. Concentraciones 15-50 veces mayores que la K_i inhiben completamente el transporte de Ca^{2+} . Además, debe tenerse mucho cuidado en estas determinaciones, ya que el rojo de rutenio puede unirse al vidrio así como al plástico y a otros componentes del medio como la albúmina.

Purificación del uniportador mitocondrial de Ca^{2+}

Se han hecho múltiples intentos por purificar el acarreador mitocondrial de Ca^{2+} (Lehninger, 1971; Sottocasa y cols. 1971; Gómez-Puyou, 1972; Blondin, 1974; Carafoli y Sottocasa, 1974; Jeng y Shamoo, 1980; Moronova y cols, 1982; Ying y cols. 1991). Sin embargo, es difícil hacer una evaluación inequívoca de las diferentes preparaciones mitocondriales que han sido asociadas a este uniportador, ya que su actividad ionofóretica no ha sido ensayada en los mismos sistemas experimentales. En la **tabla 2** se sintetizan las características principales de los extractos mitocondriales asociados al uniportador de Ca^{2+} .

Después de los primeros estudios de transporte de Ca^{2+} en mitocondrias, Reynafarje y Lehninger (1969) describieron la existencia de dos tipos de sitios a los que puede unirse el Ca^{2+} dentro de la mitocondria: Un sitio de baja afinidad, que puede unir hasta 40 nmol de Ca^{2+} /mg, y un sitio de alta afinidad que une hasta 1.2 nmol de Ca^{2+} /mg y se satura un 50% en presencia de 0.025 μM de Ca^{2+} . La unión de Ca^{2+} es extremadamente rápida y aparentemente independiente de la temperatura. El Mn^{2+} y el Sr^{2+} también se unen a los sitios de alta afinidad, mientras que el Mg^{2+} y el K^+ no lo hacen. Se observó que partículas sonicadas y preparaciones de membrana interna conservan los sitios de unión de alta afinidad, pero que estos se pierden en mitocondrias lisadas con agua o tratadas con detergente. Todos estos resultados no permite distinguir entre el proceso de unión y el de transporte debido a la naturaleza del ensayo utilizado por estos autores para evaluar la unión de Ca^{2+} , así que muy probablemente lo que se observó fue la entrada de Ca^{2+} , ya que el proceso era sensible a desacoplantes.

Tabla 2. Preparaciones asociadas al uniprotador mitocondrial de Ca^{2+}

AUTORES	METODO DE PREPARACION	SITIOS DE PEGADO DE ALTA AFINIDAD	Kd	NUMERO DE COMPONENTES	INHIBIDORES DE LA UNIÓN A Ca^{2+}	CONTENIDO DE CARBOHIDRATOS Y LIPIDOS	TRANSPORTE DE Ca^{2+}	PORCENTAJE DE LA PROTEINA MITOCONDRIAL
Gomez-Puyol y cols . 1972	Choque osmotico con agua destilada y precipitacion con 10^6 de sulfato de amonio	48-70 nmoles/mg. ensayado por dialisis en equilibrio	0.7-4 μM	Una proteina prominente de 67 kDa y 4 bandas menores	La^{3+} , rojo de rutenio	40-45 nmoles de hexosaminas por mg, 0.8 mg de carbohidratos /mg, 1 nmol de ácido siálico/mg, 900 natomos de fosfato/mg	No evaluado	0.5-1%
Sottocasa y cols . 1972	Choque osmotico en solucion de fosfatos o tratamiento con yodosalicilato de litio Electroforesis preparativa	72 nmoles/mg evaluado por dialisis en equilibrio	100 nM	Una proteina de 42 kDa	La^{3+} , rojo de rutenio	5.7 μg /mg de ácido siálico, 18 μg /mg de hexosaminas y 33 μg /mg de azúcares neutros 300 μg /mg de fosfolípidos	Baja la resistencia de bicapas en presencia de Ca^{2+}	0.5-1%
Blondin, 1974	Tratamiento con FMA, extracción con acetona, amonio, fraccionamiento en sílica/alumina	No evaluado	No evaluado	No evaluado	No evaluado	No evaluado	Transporta cationes inespecificamente, se evaluó por ensayos de hinchamiento	No evaluado
Jeng y cols , 1978	Solubilizacion con 0.3% de desoxicolato y 1 M de KCl. Separacion en sephadex G-50	170 nmol/mg Evaluado por pegado de Mn^{2+} , EPR	0.5 μM	Una proteina de 3 kDa	No evaluado	No contiene lipidos ni carbohidratos	Extrae Ca^{2+} de una fase organica, inhibido por rojo de rutenio, La^{3+} y dependiente de un gradiente de pH	0.3%

Sokolov y Brenza, 1981	Solubilización con 0.3 mg DOC/mg, cromatografía en Sephadex G-50, delipidación en una columna de sephadex LH-20. Aíslan también los lípidos	1 mol/mol, evaluado por extracción de Ca^{2+} a fase orgánica	1-2 μM	Un componente de 3 kDa. Lípidos de la preparación	Mg, Sr, Ba	30 mol P _i /mol de proteína	3.4 nmol Ca^{2+} /hr a 4.5 μM de proteína, evaluado por extracción a fase orgánica	0.19
Fry y Green, 1970	Subunidad I de la citocromo oxidasa	No evaluado	No evaluado	Una proteína correspondiente a la subunidad I de la citocromo oxidasa	No evaluado	No evaluado	Transporta Ca^{2+} sin selectividad, se incorporó a liposomas	No evaluado
Mironova y cols., 1982	Precipitación con 90% de etanol, delipidación cromatografía con Sephadex G-15, y electroforesis preparativa	No evaluado	3.8 μM	Una proteína de 40 kDa	No evaluado	30-40% de carbohidrato, 2-3 moles de ácido siálico por molécula de glicoproteína	Aumenta la conductancia al Ca^{2+} en bicapas lipídicas, inhibido por 1-10 μM de rojo de rutemo	0.2-0.1%
Mironova y cols., 1982, 1993	Precipitación con 90% de etanol, delipidación, cromatografía en Sephadex G-15 y cromatografía en Sephara 4B o cromatografía en tiotropil-sefarosa, Sephadex G-50 y HPLC	No evaluado	43 μM	Un péptido de 2 kDa	No evaluado	No contiene ni carbohidratos ni lípidos	Forma canales de Ca^{2+} en bicapas lipídicas, inhibido por rojo de rutemo	0.02-0.05%

Zazueta y cols . 1991	Solubilización con 1.2% de colato, separación en gradiente discontinuo de 30-40% de glicerol	No evaluado	No evaluado	Gran cantidad de componentes	No evaluado	No evaluado	Transporta 260 nmol de Ca/mg en 30 min a vesículas lipídicas, inhibido por rojo de rutenio y dependiente del potencial transmembranal, inhibido por Mg con K _{0.5} de 29.2 mM	No evaluado
Zazueta y cols, 1994	Solubilización con 1.2% de colato, precipitación con 90% de sulfato de amonio	No evaluado	No evaluado	Aproximadamente 10 componentes	0.654 μmol Pi/mg	No evaluado	Transporta 88 nmol de Ca ²⁺ /mg min, sensible a rojo de rutenio y dependiente de un potencial transmembranal. Evaluado también en fase orgánica.	1.52%
Zazueta y cols . 1994	Solubilización con 1.2% de colato, precipitación con 90% de sulfato de amonio, extracción orgánica	No evaluado	No evaluado	Aproximadamente 10 componentes	No evaluado	No evaluado	Transporta 1194 nmol de Ca ²⁺ /mg/5min sensible a rojo de rutenio y dependiente de un potencial transmembranal	0.093%

Este trabajo	Solubilización con 1.2% de colato, precipitación con 90% de sulfato de amonio, cromatografía en concanavalina A	No evaluado	No evaluado	Una glicoproteína de 36 kDa y 3 componentes menores	No evaluado	10% de azúcares, estructura glicosídica oligomanosa, bajo contenido de ácido siálico	Transporta 100 nmol Ca^{2+} /min mg a vesículas cargadas con fura 2, inhibido por rojo de rutenio con una $K_{0.5}$ de 16.11 nM, por La^{3+} con una $K_{0.5}$ de 3.91 μ M, y inhibido por espermina con una $K_{0.5}$ de 140 nM	0.011%
--------------	---	-------------	-------------	---	-------------	--	--	--------

La existencia de los sitios de alta afinidad ha sido cuestionada por Ackerman y cols. (1974), quienes observaron la desaparición de dichos sitios al preincubar a las mitocondrias con antimicina o HQNO. Aun así existe suficiente evidencia de la existencia de un acarreador mitocondrial para Ca^{2+} . Estas evidencias pueden resumirse en dos:

1.- El transporte de Ca^{2+} es inhibido por muy bajas concentraciones de lantano (0.08 nmol/mg), o de rojo de rutenio (0.4 nmol/mg) (Mela, 1969; Moore, 1971); a bajas concentraciones estos inhibidores no inhiben la respiración ni el transporte de algún otro sustrato. Ambos inhibidores se unen con alta afinidad ($K_d = 0.01 \mu\text{M}$) y mucha especificidad (0.08 nmol/mg) (Vasington y cols., 1972; Reed y Bygrave, 1974).

2.- El transporte de Ca^{2+} al interior de la mitocondria exhibe un comportamiento cinético característico de una molécula transportadora sigmoidicidad, saturabilidad, alta afinidad por su sustrato, y de 1 a 2 sitios activos (Vinogradov y Scapa, 1973).

A. Los primeros intentos

El trabajo de Reynararje y Lehninger (1969) mencionado en la sección anterior sugería que el uniportador de Ca^{2+} podría ser aislado en forma soluble; así que posteriormente estos autores separaron una fracción a partir de mitocondrias expuestas a choque osmótico (Lehninger, 1971). Esta fracción contiene tanto sitios de alta afinidad (1.47 nmol/mg de proteína mitocondrial), como sitios de baja afinidad (133 nmol/mg de proteína mitocondrial) y la constante de disociación del sitio de alta afinidad es un poco mayor a la constante calculada para mitocondrias completas

La unión de Ca^{2+} a esta fracción no es inhibida por Mg^{2+} (sólo se utiliza 2 mM de Ca^{2+} , concentración a la que también es inhibida por Mg^{2+} de baja afinidad) ni por desacoplantes. Además, las constantes calculadas permanecen inalteradas al variar la cantidad de proteína, lo que indica que el proceso de unión no es cooperativo. Se especuló que el peso molecular de la partícula responsable de la unión debía exceder los 150 kDa, ya que sólo se retardada en una columna de Sephadex G-200, y no por columnas de Sephadex G-100 o G-50.

Gómez-Puyou y cols. (1972) intentaron purificar el factor que une Ca^{2+} con gran afinidad a partir del extracto acuoso obtenido por Lehninger (1971) (tabla 2). Precipitaron el extracto obtenido por choque osmótico con 4 mg/ml de sulfato de amonio después de haber intentado, sin éxito, separar el componente activo por medio de cromatografía en Sephadex G-100 y G-200. La separación por cromatografía resultó especialmente difícil debido a que todas las proteínas de la preparación presentaban aproximadamente el mismo radio de Stokes. Con el tratamiento con sulfato de amonio obtuvieron un material insoluble que tiene actividad de unión a Ca^{2+} . Con respecto a la proteína inicial se calculó que el factor de unión a Ca^{2+} fué purificado de 50 a 100 veces.

El factor contiene tanto sitios de baja afinidad ($K_d = 500 \mu\text{M}$ y un número de sitios de 900 nmol/mg de proteína mitocondrial), como sitios de alta afinidad (48-70 nmol/mg de proteína mitocondrial); cuya actividad de unión no es inhibida por desacoplantes ni por inhibidores de la respiración. Se compone de una proteína predominante de 67 kDa y 4 proteínas menores. Este extracto se convirtió en insoluble después de la diálisis, lo que impidió la posterior purificación del factor, por tanto se procedió a analizar la composición de esta preparación (tabla 2). Su contenido de ácido siálico (1-1.2 nmol de ácido siálico por mg) corresponde al 0.2-2% de los sitios de unión de Ca^{2+} , por lo que se especuló que el ácido siálico no interviene en el proceso de unión a Ca^{2+} .

Esta preparación, como muchas otras descritas aquí no fueron incorporadas a vesículas o bicapas lipídicas para evaluar su capacidad ionofórica para Ca^{2+} , y por tanto no puede establecerse su relación con el proceso de transporte de Ca^{2+} mitocondrial. Sin embargo, esta preparación en particular constituyó la primera sugerencia de la presencia de grupos carbohidratos como componentes del sistema uniportador de Ca^{2+} .

B. Evidencia de la presencia de glicoproteínas en la mitocondria

Moore (1971) sugirió que la insolubilidad del factor aislado por Lehninger era indicativo de que este extracto contenía pequeños fragmentos mitocondriales que precipitan a bajas concentraciones de sal, probablemente fragmentos que contienen grupos carbohidratos. Este mismo autor, conociendo

la observación hecha por Bondareff (1970) de que la mitocondria se tiñen por el colorante para mucopolisacáridos rojo de rutenio (Gustafson y Pihl, 1967; Luft, 1965), y sabiendo que los grupos sulfato y carboxilos de los mucopolisacáridos son buenos candidatos para unir Ca^{2+} , estudió el efecto de este colorante en la unión y transporte de Ca^{2+} . El rojo de rutenio a una concentración de $12 \mu\text{M}$ impide que el Ca^{2+} estimule la respiración, sin inhibir la estimulación de la respiración inducida por ADP o valinomicina. La curva de inhibición del transporte de Ca^{2+} por rojo de rutenio muestra 2 pendientes, y la efectividad del inhibidor es mucho mayor por arriba de $24 \mu\text{M}$. Con esto se pudo calcular que se unen aproximadamente 0.35 nmol de rojo de rutenio por mg de proteína, lo que representa el 25-30% del valor estimado por Lehninger (1969) para sitios de unión de alta afinidad (1.2 nmol/mg). Dichos estudios de inhibición, aunados a las evidencias de pegado de Ca^{2+} de alta afinidad (ver sección anterior) establecen de manera inequívoca que la molécula responsable de la captación de Ca^{2+} en mitocondrias es una proteína. El trabajo de Moore (1971) sugiere además que el transportador mitocondrial de Ca^{2+} es de naturaleza glicoproteica.

La presencia de glicoproteínas en la mitocondria ha sido evidenciada por de Bernard y cols. (1971) quienes encontraron que aproximadamente el 80% del material que contiene grupos carbohidratos en la mitocondria se libera en forma soluble y que las membranas externa e interna también contienen carbohidratos (tabla 3). Estos carbohidratos están probablemente asociados a macromoléculas.

Tabla 3. Contenido de carbohidratos en los compartimentos mitocondriales según de Bernard y cols. (1971)

	nmol/mg	
	hexosamina	ácido siálico
membrana interna	135	11
membrana externa	263	40
mitocondria completa	168	19

Bosmann y Martin (1969), conociendo la presencia de glicoproteínas en la mitocondria (Brunngraber y Brown, 1963; 1964), investigaron la capacidad de la mitocondria para incorporar monosacáridos a proteínas, encontrando que las mitocondrias aisladas son capaces de incorporar monosacáridos (fructosa,

manosa, glucosa y galactosa, pero no xilosa) a partir de carbohidratos unidos a nucleótidos difosfatados, proceso para el cuál no es necesario que la mitocondria se encuentre íntegra. Los monosacáridos así incorporados se localizan en la membrana interna mitocondrial, en el mismo compartimento en el que se observó la incorporación de leucina; por esto se concluyó que la mitocondria es capaz de sintetizar glicoproteínas e incorporarlas en su membrana interna. Se sabe también que tanto la membrana interna como la externa de la mitocondria contienen distintos sistemas de síntesis de N-glicocojugados a través de la vía de dolicolpírofosfato (Levrat y cols., 1989). La membrana interna además es capaz de transferir azúcares unidos a nucleótidos a aceptores proteicos (Levrat y cols, 1990).

C. Purificación de una glicoproteína mitocondrial asociada a movimientos de Ca^{2+}

Los trabajos de Moore (1971), de Bernard y cols. (1971) y Bosmann y Martin (1969) dirigieron los esfuerzos de algunos grupos hacia la búsqueda de una glicoproteína como el uniportador mitocondrial de Ca^{2+} . Entre estos grupos se encuentra el de Sottocasa (Sottocasa y cols., 1971) quienes describieron la purificación de una glicoproteína localizada en el espacio intermembranal (tabla 2). En ese trabajo se recuperó una fracción soluble (se calculó que el 30% de la proteína mitocondrial es liberada después de un proceso de hinchamiento) que contenía una serie de proteínas las cuales fueron detectadas en un gel de poliacrilamida. Entre las proteínas obtenidas destaca una banda de 51 kDa correspondiente al 20% de la proteína del extracto acuoso. Dicha proteína reacciona positivamente con el reactivo de Schiff, con toluidina, con azul alciano y con rojo de rutenio, lo que denota su naturaleza glicoproteica. Sin embargo, en cuanto a su relación con el uniportador de Ca^{2+} , la cantidad de glicoproteína así obtenida contrasta claramente con el número de acarreadores calculados por Reed y Bygrave (1972b).

Posteriormente se determinó que la banda prominente de 51 kDa está compuesta por varias proteínas, incluyendo a una glicoproteína. Esta última fue separada por un sistema combinado de electroforesis preparativa, y sus propiedades más importantes se resumen en la tabla 2. La glicoproteína puede ser purificada también sometiendo a las mitocondrias a un proceso de sonicación, esto hizo suponer a Sottocasa y cols. (1971) que su localización dentro de la mitocondria se distribuye entre la membrana interna y el espacio

intermembranal, o bien que se encuentra expuesta en la cara interna de la membrana interna mitocondrial.

Con el fin de purificar una mayor cantidad de glicoproteína se utilizaron para su preparación mitocondrias de hígado de bovino (Sottocasa y cols., 1972), calculándose un peso molecular de 42 kDa. La glicoproteína contiene cantidades variables de Ca^{2+} y Mg^{2+} unido (hasta 400 nmol/mg), y por lo que toca a su capacidad para unir Ca^{2+} , se observaron dos componentes con distintas afinidades: el componente de alta afinidad une hasta 72 nmol Ca^{2+} /mg mientras que el de baja afinidad une hasta 600 nmol de Ca^{2+} /mg con una constante de disociación de 10 μM . Los inhibidores de la respiración mitocondrial así como los desacoplantes no afectan el proceso de unión de Ca^{2+} a esta preparación. Ya que el peso molecular de la glicoproteína es de 42 kDa, se calculó que un mol de proteína une aproximadamente 3 moles de Ca^{2+} con gran afinidad. Por otro lado, la glicoproteína aislada corresponde al 0.5-1% de la proteína mitocondrial total, y por tanto constituiría toda la capacidad de la mitocondria para unir Ca^{2+} con alta afinidad.

Para establecer si la glicoproteína participa en los movimientos mitocondriales de Ca^{2+} se efectuaron varios ensayos diferentes. Uno de estos estudios incluyó la incorporación de la glicoproteína aislada por Sottocasa y cols. (1972) a bicapas lipídicas. Se encontró de esta manera que la glicoproteína produce una disminución notable de la resistencia eléctrica, pero sólo en presencia de Ca^{2+} , y que este efecto es sensible a rojo de rutenio (Prestipino y cols., 1974).

Por su parte, Sandri y cols. (1976) encontraron que la liberación de la glicoproteína disminuye a medida que disminuye la salida de Ca^{2+} , y estudiaron la liberación de la glicoproteína hacia el medio, después de someter a las mitocondrias a choque osmótico. La cantidad de glicoproteína liberada fue estimada por medidas densitométricas en geles de poliacrilamida y se encontró que la cantidad de proteína liberada en ausencia de Ca^{2+} era el doble de la liberada en presencia del catión. Además, el EDTA, un quelante de cationes (más específico para Mg^{2+}), es capaz de extraer también a la glicoproteína. Sin embargo, el EGTA, que es un quelante más específico para Ca^{2+} no fue capaz de liberar a la glicoproteína. Por lo anterior estos autores atribuyen al Mg^{2+} un papel en la asociación de la glicoproteína a la membrana.

Parte de la glicoproteína aislada por Sottocasa y cols. (1972) y también por otros (Carafoli y cols., 1972; Carafoli y cols., 1973) es solubilizada fácilmente en medio acuoso por choque hipotónico; mientras que otra parte requiere de extracción con iodosalicilato de litio (Marchesi y Andrews, 1971). En cuanto a los ensayos de liberación de la glicoproteína, ambas preparaciones son similares en composición pero presentan diferente grado de liberación de la membrana, lo que puede deberse a un diferente contenido de fosfolípidos.

En presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} e inhibidores de la respiración, las membranas pueden asociar una cantidad considerable de la glicoproteína, lo que indica que el fenómeno de asociación a la membrana es reversible y controlado por la presencia de los cationes. Por otro lado, en condiciones en las que se produce el transporte de Ca^{2+} , la cantidad de glicoproteína en el espacio intermembranal disminuye. Así, estos autores concluyen que la glicoproteína actúa como un acarreador móvil, y que se asocia a la membrana sólo en presencia de Ca^{2+} , lo cuál además coincide con observaciones anteriores hechas por otros grupos (Güter y Montal, 1972).

Gómez-Puyou y cols. (1972) hicieron una comparación entre el factor insoluble aislado por ellos y la fracción soluble obtenida por Sottocasa y cols. (1972), los aspectos más importantes de dicha equiparación se pueden resumir como sigue:

1. Ambos factores presentan sitios de unión de Ca^{2+} de alta y baja afinidad. La constante de disociación del componente de alta afinidad es $0.75\text{-}4\ \mu\text{M}$ para el factor insoluble, y $0.1\ \mu\text{M}$ para la glicoproteína soluble. El número de sitios de alta afinidad oscila entre 48 y 60 nmol/mg para el factor insoluble, y está alrededor de 70 nmol/mg para la glicoproteína soluble.
2. Ambos factores contienen fosfolípidos y cantidades apreciables de carbohidratos.
3. Ambas preparaciones se componen de una banda prominente detectada en un gel de poliacrilamida, pero éstas difieren en su peso molecular. La glicoproteína soluble tiene una masa molecular de 42 kDa, mientras que el factor insoluble pesa aproximadamente 67 kDa.

4. Ambas preparaciones representan entre el 0.5 y el 1% de la proteína total de las mitocondrias.

Es posible que la glicoproteína aislada por Sottocasa (1972) provenga de un compartimento mitocondrial distinto al de la fracción aislada por Gómez-Puyou y cols (1972), ya que este último fue obtenido de extracciones con agua destilada, lo que elimina una cantidad considerable de proteínas de la matriz mitocondrial, así como proteínas membranales que se tornan insolubles en soluciones salinas diluidas. Puede ser también que el factor insoluble sea una forma agregada o desnaturalizada del extracto obtenido por Sottocasa y cols. (1972).

D. Otras proteínas asociadas con el uniportador

Algunos otros autores trataron de purificar al uniportador de Ca^{2+} , sin buscar específicamente a una glicoproteína. Blondin (1974) por ejemplo, afirmaba que el comportamiento del uniportador correspondía al de un acarreador móvil del tipo de los ionóforos, y por tanto soluble en la membrana mitocondrial. Su estrategia de purificación consistió entonces en utilizar un agente que afectara la asociación del uniportador a la membrana; este factor fué el mercurio, que se sabe afecta los flujos de Ca^{2+} en mitocondria. Suponiendo que este agente se pegaría específicamente al uniportador, Blondin (1974) sometió a las mitocondrias a un tratamiento con fluoromercuriacetato, y posteriormente las delipidó con una mezcla de acetona:amonio. Obtuvo 53 mg de extracto por mg de proteína mitocondrial, este extracto era soluble en cloroformo y fué sometido a fraccionamiento cromatográfico. Se encontró en una de las fracciones propiedades ionofóricas para Mg^{2+} (tabla 2). Sin embargo, el ensayo de hinchamiento utilizado para evaluar la relación de esta preparación con el transporte de Ca^{2+} no es una medida confiable de las propiedades ionofóricas de la fracción, además de que muy probablemente se presentaron artificios debidos al uso de solventes orgánicos.

Jeng y cols. (1978) realizaron el primer trabajo de purificación del uniportador en el que se utilizó un detergente. Obtuvieron una fracción solubilizada con desoxicolato de sodio y separada posteriormente por medio de filtración en gel (tabla 2). Estos autores, bajo la suposición de que el Mn^{2+} es un buen análogo del Ca^{2+} para interactuar con el uniportador, evaluaron por la técnica de EPR la unión de Mn^{2+} no reemplazable por Mg^{2+} como un

indicativo de la presencia del uniportador de Ca^{2+} . De entre las fracciones obtenidas después de la cromatografía de exclusión molecular, se encontró una con el mayor número de estos sitios de unión de Mn^{2+} ; ésta contenía una proteína predominante de 3 kDa a la cual se le dio el nombre de "calciporina" debido a que presenta dos sitios de unión a Ca^{2+} . El sitio de alta afinidad une hasta 170 nmol Ca^{2+} /mg, (tomando una masa molecular de 3 kDa esta proteína une 0.5 moles de Ca^{2+} por mol de proteína) y otro de baja afinidad que une hasta 1.3 moles de Ca^{2+} /mg con una constante de disociación de 33 μM . La calciporina puede extraer Ca^{2+} de una fase orgánica, siendo más selectiva para Ca^{2+} que para Sr^{2+} , Mn^{2+} o Mg^{2+} . Por otro lado, cuando se sometió a delipidación no se encontraron ácidos grasos libres o hexosaminas asociadas a la proteína (Jeng y Shamoo, 1980), además de conservar sus propiedades ionofóricas, pero con solamente un sitio de unión para Ca^{2+} ; este último une 1 mol de Ca^{2+} por mol de calciporina con una constante de disociación de 5.2 μM (Jeng y Shamoo, 1980b).

Sokolove y Brenza (1983) demostrarían más tarde que las propiedades ionofóricas de la calciporina son debidas a lípidos contaminantes, ya que al separarlos, éstos presentan la misma actividad de unión y transporte de Ca^{2+} que la preparación completa.

Se ha sugerido también que la subunidad I del complejo citocromo c oxidasa está involucrada en el proceso de transporte de Ca^{2+} (Fry y Green, 1979), pero este transporte no es selectivo para Ca^{2+} .

E. La glicoproteína aislada por el grupo de Mironova

Algunos acarreadores mitocondriales se han podido purificar con simples separaciones proteicas en base a su peso molecular, después de una solubilización con detergente o solventes orgánicos (Weihua y cols. 1992), y más recientemente se han utilizado técnicas inmunológicas para identificar a dichos acarreadores. Mironova y cols. (1982), describieron la purificación de una glicoproteína mitocondrial de 40 kDa y un péptido de 3 kDa (tabla 2) utilizando estas técnicas. El método de purificación incluyó una separación de exclusión molecular en cromatografía en gel después de una extracción orgánica con etanol, y la capacidad ionofórica de las fracciones obtenidas fué evaluada en bicapas planas en presencia de 12 mM de Ca^{2+} . Dos de las

fracciones fueron capaces de mediar el transporte de Ca^{2+} . A partir de una de ellas se purificó una glicoproteína de 40 kDa, por elución de un gel de electroforesis, y de la otra fracción se purificó un péptido de 2 kDa por cromatografía de afinidad en una columna que une grupos sulfidrilo (sefárosa 4B), este péptido es soluble en agua y en etanol. El tratamiento con acetona no separa al carbohidrato de la glicoproteína, lo que sí le ocurre a otras preparaciones (Panfili y cols., 1976), esto es indicativo de que la porción glicosídica se encuentra fuertemente unida a la proteína. Las glicoproteínas purificadas por Panfili y cols. (1976), y Mironova y cols. (1982) contienen gran cantidad de aminoácidos ácidos, sin embargo la composición de aminoácidos entre estas dos preparaciones es notablemente distinta.

La relación del aumento en la conductancia de bicapas planas con respecto a la cantidad de glicoproteína añadida tiene un comportamiento sigmoidal, lo que ocurre también en presencia del péptido de 3 kDa. El aumento en la conductividad es selectivo para Ca^{2+} ; ni el K^+ el Na^+ o el Mg^{2+} lo producen. Además, a cierta concentración de proteína (1-2 μg de péptido por ml, o 5-7 μg de glicoproteína por ml), se producen variaciones en la corriente transmembranal, y estos autores (Mironova y cols., 1982) asocian dichas variaciones a la apertura y cierre de canales. El estado abierto de los canales varía entre 1 seg y decenas de minutos, mientras que los canales de 0.5-1.0 nseg y los de 20 pS son selectivos para Ca^{2+} . Esto último indica que los canales mayores son agregados de los canales pequeños. En cuanto a la inhibición del proceso, el rojo de rutenio a una concentración entre 1 y 10 μM inhibe el aumento de la conductancia inducido tanto por la glicoproteína como por el péptido.

Después de delipidar a la glicoproteína la capacidad ionofórica no disminuyó, ni tampoco su sensibilidad al rojo de rutenio, sin embargo, después de un tratamiento con una proteasa, la actividad de la glicoproteína se perdió totalmente. Por otro lado, reactivos que se unen a grupos tioles como el mercuriacetato de iluoresceína o el mercuriacetato abaten la actividad tanto de la glicoproteína como del péptido; mientras que el ditiotritol restaura la actividad de ambos factores. La alta selectividad y efectividad de los ionóforos aislados es atribuida a que el método de purificación descrito por Mironova y cols. (1982) elimina el uso de detergentes, agentes caotrópicos, reactivos que reaccionan con grupos tioles, así como de enzimas proteolíticas, ya que dichos agentes dificultan la obtención de una preparación activa. Las enzimas

proteolíticas inestabilizan a las proteínas, y los detergentes y reactivos para grupos tioles inducen por sí mismos transporte a través de las bicapas planas.

Anticuerpos preparados contra la glicoproteína inhiben el transporte de Ca^{2+} en mitoplastos (Saris y cols., 1993) y 0.5 mM de espermina, un estimulador del transporte de Ca^{2+} en mitocondrias (Necchi y Williamson, 1984; Allshire y Saris, 1986; Kröner, 1988) evita en cierto grado dicha inhibición. Sin embargo, los anticuerpos, efectivos en el reconocimiento de la glicoproteína aislada por Mironova y cols. (1982) no reaccionan con la glicoproteína purificada por Sottocasa y cols. (1972), y no son ni órgano, ni especie específicos (Dolgachova y Scarga, 1984), además de que en una preparación de fibroblastos reaccionan específicamente con mitocondrias.

Más tarde, el grupo Mironova y cols. (1994) purificó aún más el péptido de 2 kDa utilizando columnas de tiopropil-sefarosa, Sephadex G-50 y HPLC sucesivamente. El péptido forma canales selectivos para Ca^{2+} inhibibles por rojo de rutenio así como por tratamiento con proteinasa. Sin embargo, en estos ensayos en bicapas planas se utilizaron concentraciones de Ca^{2+} relativamente altas (en el rango milimolar), por lo que no se puede saber qué tan específica para Ca^{2+} es esta preparación. El péptido aislado por el grupo de Mironova también fue reconstituido en el modelo de proteoliposomas con el cual se pueden utilizar concentraciones de Ca^{2+} mucho menores, calculándose una K_m para Ca^{2+} de 20 μM , y una I_{50} para rojo de rutenio de 2-3 μM (Zhou G, Mironova G y Garlid K., 1993 *Biophys J* 64, A80, datos no publicados). Ya que el péptido fue purificado a partir de la preparación glicoproteína-péptido, el grupo de Mironova (Mironova y cols., 1993) sugirió que el uniportador de Ca^{2+} esta contenido en esta última preparación y comprende a más de un componente.

Para que se formen canales, el péptido tiene que agregarse en ambos lados de la membrana, esto sugiere que dicho canal esta formado por dos o mas de los péptidos de 2 kDa. En cuanto a la capacidad de estas preparaciones para unir Ca^{2+} , el complejo glicoproteína-péptido contiene sitios de alta ($K_d \approx 3.8 \times 10^{-6}$ M), y baja afinidad ($K_d = 4.3 \times 10^{-5}$ M) para Ca^{2+} . La glicoproteína sólo contiene los sitios de alta afinidad; y se desconoce que tipo de sitios de unión a Ca^{2+} se presentan en el péptido, pero se asumió que contiene a los sitios de baja afinidad (Utesheva y cols., 1989), idea que es apoyada por el hecho de que los ensayos de transporte con el péptido necesitan mucho más Ca^{2+} que los que se llevan a cabo con el complejo glicoproteína-péptido.

Se ha sugerido, debido a todo lo anterior que los sitios de baja afinidad están involucrados en el transporte (Happel y Krall, 1979), mientras que los sitios de alta afinidad contenidos en la parte glicoprotéica están involucrados en el reconocimiento del Ca^{2+} y, a pesar de los estudios antes mencionados, no puede afirmarse que la preparación de Mironova y su grupo (1984) sea el uniportador de Ca^{2+} , ya que existe evidencia de que la glicoproteína es un contaminante citoplásmico; porque su secuencia amino terminal es muy similar a la de la proteína plasmática orosomucoide (Mironova y cols., 1994).

Como se ha mencionado, la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína parece corresponder a la $\alpha 1$ -glicoproteína humana (orosomucoide), sin embargo, aún permanece la controversia acerca de la identidad de la preparación de Mironova y cols. (1982), ya que los anticuerpos preparados contra la glicoproteína reaccionan también contra la orosomucoide, mientras que anticuerpos preparados contra la orosomucoide no inhiben el transporte de Ca^{2+} ni reaccionan con mitocondrias (Mironova y cols., 1994). Además, en estos trabajos no se evaluó el transporte utilizando únicamente a la glicoproteína y por tanto tampoco se pudo hacer una comparación de éste transporte con la actividad del complejo glicoproteína-peptido así como con la actividad del péptido aislado.

F. La obtención de un extracto con las propiedades ionofóricas del uniportador

La identificación inequívoca de alguna preparación proteica con el uniportador mitocondrial de Ca^{2+} está necesariamente condicionada al desarrollo de técnicas confiables para la evaluación del transporte de Ca^{2+} . Las técnicas fluorométricas, así como las técnicas isotópicas constituyen las metodologías más utilizadas para evaluar el transporte a vesículas lipídicas reconstituidas. Zazueta y cols. (1991) han utilizado el sistema de vesículas reconstituidas evaluando la captación de ^{45}Ca . El extracto obtenido por estos autores (Zazueta y cols., 1991), después de solubilizar partículas submitocondriales con colato (tabla 2), media la acumulación de Ca^{2+} en las vesículas mediante un proceso dependiente de un potencial electroquímico, e inhibible por rojo de rutenio. Las vesículas reconstituidas con el extracto solubilizado con colato transportaron 43 nmol de Ca^{2+} /mg min, lo que

corresponde al doble de las vesículas con citocromo c oxidasa sin extracto incorporado. En presencia de rojo de rutenio, dichas vesículas solo transportan 30 nmol de Ca^{2+} /mg min, calculandose una K_i para rojo de rutenio de $3.5 \mu\text{M}$ a pH 7.0. Por otro lado, el potencial transmembranal en las vesículas, fué abatido por la entrada de Ca^{2+} .

En dicho trabajo también se hicieron separaciones de proteínas en un gradiente discontinuo de 20, 30, 40 y 50 % de glicerol, encontrandose la actividad de transporte de Ca^{2+} en las fases de 30 y 40% de glicerol. Este método de purificación, sin embargo no resultó efectivo ya que la actividad específica de las fracciones no se incrementa con respecto a la del extracto crudo.

Es necesario mencionar también que vesículas con citocromo c oxidasa incorporada, sin ninguna otra proteína reconstituida son capaces de transportar de 2-3 nmol de Ca^{2+} /mg de citocromo c oxidasa, de una manera dependiente de potencial transmembranal (Fry y Green, 1979; Rosier y Gunter, 1980; Rosier y cols., 1981), sin embargo, este transporte no es sensible a rojo de rutenio (Rosier y Gunter, 1980; Zazueta y cols., 1991). Las vesículas lipídicas utilizadas en el trabajo de Zazueta y cols. (1994) incorporan 40 μg de extracto crudo /mg de fosfolípido, y 20 μg de extracto de 30% o 40% de glicerol/mg de fosfolípido (predominantemente proteínas entre 35-60 kDa de peso molecular); y de ensayos utilizando antopirilazo se pudo distinguir entre el proceso de unión de Ca^{2+} a las vesículas y el transporte del ión al interior de éstas. Se calculó una I_{50} para Mg^{2+} de 29.2 mM. Estas vesículas acumulan una cantidad similar de Sr^{2+} , pero en un proceso menos sensible al rojo de rutenio.

Posteriormente, el grupo de Zazueta y cols. (1994) purificó aún más estos extractos mitocondriales haciendo precipitaciones con 50 y 50-90% de sulfato de amonio. El extracto crudo transporta 127 nmol Ca^{2+} /mg/5 min, mientras que el extracto precipitado con 50% de sulfato de amonio no es capaz de transportar Ca^{2+} , y el extracto precipitado con 50-90% de sulfato de amonio transporta 443 nmol de Ca^{2+} /mg/5 min, lo que representa una purificación de 3 veces, esta actividad desaparece si el extracto es hervido. La extracción orgánica de la fracción de 50-90% de sulfato de amonio tiene una actividad mayor: 1194 nmol de Ca^{2+} /mg/5 min, lo que representa una purificación de 8 veces. También se probó el transporte a través de una fase orgánica, encontrándose que es sensible a $5 \mu\text{M}$ de rojo de rutenio. Los lípidos

contenidos en la preparación no son capaces de mediar el transporte de Ca^{2+} en este sistema.

Se prepararon anticuerpos contra la fracción F90. Tanto los anticuerpos control como los anticuerpos dirigidos contra F90 inhiben el transporte de Ca^{2+} en vesículas con citocromo c oxidasa y extracto mitocondrial incorporados, pero el transporte es la mitad utilizando los anticuerpos dirigidos contra el extracto F90. En mitoplastos estos anticuerpos inhiben el transporte de Ca^{2+} pero no la respiración. Además, los anticuerpos no reconocen proteínas en inmunoréplicas tipo Western cuando se transfieren proteínas hervidas, lo que indica que probablemente el epitope que reconoce sea conformacional. Estos anticuerpos reconocen 2 bandas de 75 y 20 kDa tanto en partículas submitocondriales como en el extracto F90, por lo que fueron eluidos de ambas porciones del gel. Los anticuerpos que reconocen a la proteína de 75 kDa inhiben el transporte de Ca^{2+} en un 40%, mientras que los que reconocen a la proteína de 20 kDa inhiben en un 67% el transporte de Ca^{2+} . Por lo tanto se concluyó que esta proteína de 20 kDa forma parte del sistema uniportador de Ca^{2+} mitocondrial, sin embargo, no se hicieron ensayos control utilizando anticuerpos contra alguna otra proteína de 20 kDa, ácida o hidrofílica, para ver si éstos también son capaces de inhibir el transporte de Ca^{2+} de una manera similar.

Con el objetivo de purificar el componente mitocondrial responsable del transporte de Ca^{2+} , en este trabajo se preparó la fracción activa descrita por Zazueta y cols. (1994), ya que los estudios inmunológicos y de reconstitución de estas fracciones indican claramente su relación con el uniportador mitocondrial de Ca^{2+} . Ya que alguno de los componentes del sistema uniportador de Ca^{2+} pudiera estar glicosilado (Gómez-Puyou y cols., 1972; Sottocasa y cols., 1972; Mironova y cols., 1982), se buscaron componentes glicoprotéicos utilizando la lectina concanavalina A en una columna de afinidad. El sistema experimental utilizado para evaluar la capacidad de transporte de Ca^{2+} de las fracciones obtenidas fue el modelo de vesículas lipídicas con el indicador fluorescente para Ca^{2+} fura 2 en su interior. Este sistema ha sido utilizado para evaluar transporte en la purificación de otros acarreadores mitocondriales (Weilma y cols., 1992), y tiene la ventaja de permitir la detección de pequeños movimientos de Ca^{2+} en vesículas de gran volumen y con poca proteína reconstituida.

Objetivo

Purificar el componente mitocondrial responsable del transporte de Ca^{2+} a partir de la fracción obtenida por Zazueta y cols. (1994).

Objetivos particulares:

- Aislar una fracción glicoproteica del extracto obtenido por Zazueta y cols. (1994)

- Reconstituir las proteínas obtenidas en vesículas lipídicas con el indicador fluorescente Fura 2 en el interior

- Evaluar la acumulación de Ca^{2+} mediada por las proteínas obtenidas, así como la sensibilidad del proceso a rojo de rutenio, lantano, y su dependencia en un potencial transmembranal.

- Caracterizar las fracciones obtenidas por medio de electroforesis, análisis de carbohidratos y análisis de aminoácidos

Materiales y Métodos

Los corazones de bovino fueron obtenidos frescos gracias a la colaboración del Sr. Alfonso Milo del mercado de Coyoacán de la Ciudad de México. El indicador fluorescente fura-2 fue obtenido de Calbiochem. Todos los demás reactivos fueron obtenidos de SIGMA Chem. Co.

Aislamiento de mitocondrias (Low y Vallin, 1963): De 3 a 4 corazones de bovino fueron limpiados de grasa y tejido conectivo. La carne cortada en trozos pequeños fue molida en un procesador de alimentos. Aproximadamente 200 g de carne molida se añadieron a 1.5 l de amortiguador STE (sacarosa 250 mM, Tris-HCl pH 7.3, EDTA 1 mM) y se licuó 3 veces durante 10 segundos en una licuadora Waring Blendor modelo PB-5 a velocidad baja. Después de ajustar el pH de la suspensión a 7.3 con Tris saturado, ésta se filtró a través de una gasa y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min a 4°C en el rotor Sorvall GSA (1020 X g). El precipitado se desechó, y el sobrenadante se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C en el mismo rotor (16319 X g). Las mitocondrias se encontraron en el precipitado, y fueron resuspendidas y centrifugadas 2 o 3 veces más agregando amortiguador STE, hasta que el sobrenadante apareció claro. La concentración de proteína se determinó por el método de biuret, y las mitocondrias se congelaron a -70°C hasta la preparación de las partículas submitocondriales.

Obtención de partículas submitocondriales (Lee y Ernster, 1967): Se utilizaron de 1 a 3 g de mitocondrias en cada preparación. Se ajustó la concentración de proteína a 20 mg/ml con STE, a pH 8.0. Dividida en volúmenes de 30 ml, la suspensión se sonicó a 14 micrones durante 12 ciclos de 15 segundos con intervalos de descanso de 1 minuto. La suspensión translúcida se centrifugó a 10000 rpm en el rotor Sorvall SS34 (12062 X g) durante 10 min a 4°C. El precipitado se desechó, y el sobrenadante se centrifugó a 38000 rpm en el rotor Beckman 60 Ti (145393 X g) durante 45 min a 4°C. Las partículas submitocondriales (PSM) se encontraron en el precipitado. Se determinó la concentración de proteína por el método de biuret (ver más adelante) y se congelaron a -70°C durante algunos días antes de ser utilizadas para preparar los extractos proteicos.

Preparación de extractos proteicos (Zazueta y cols., 1994): De 0.5 a 1 g de PSM se llevarón a una concentración de 20 mg/ml con amortiguador ST (sacarosa 250 mM, Tris-HCl pH 7.3). A la suspensión se agregó lentamente 1.2 % de colato a 4°C y bajo agitación. Para la primera precipitación se agregaron 313 g de sulfato de amonio por litro de suspensión. El sulfato de amonio se agregó en polvo, lentamente, a 4°C y en agitación. Después de 15 min se centrifugó la suspensión a 10000 rpm en el rotor Sorvall SS34 (12062 X g). El precipitado se resuspendió en el amortiguador ST y fue denominado F50. El sobrenadante volvió a precipitarse y centrifugarse de la misma manera pero utilizando 303 g de sulfato de amonio por litro de suspensión. Esta vez el precipitado se encontró flotando en la parte superior de la suspensión y se denominó F90, este precipitado se resuspendió en Tris 10 mM pH 7.0 y se dializó contra 20 volúmenes del mismo amortiguador, durante 15 hr con dos cambios de amortiguador. Una vez dializado se centrifugó a 100000 X g durante 45 min para eliminar el material insoluble.

Purificación de la glicoproteína de 36 kDa: La glicoproteína se purificó por cromatografía de afinidad utilizando concanavalina A-Sefarosa 4B. La resina contenía 10-16 mg de concanavalina A por ml de gel, y se encontraba almacenada en acetato 1 M pH 6.0, NaCl 1 M, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM y 20% de etanol. Este amortiguador se eliminó lavando la resina con 10 volúmenes de Tris 10 mM pH 7.0. Después de eliminar el amortiguador de acetato, la resina se equilibró con 10 volúmenes de Tris 10 mM pH 6.8, NaCl 0.5 M, CaCl₂ 0.15% y MnCl₂ 0.1%. Aproximadamente 10 mg de la fracción F90 en 10-20 ml de Tris 10 mM pH 7.0 se incubaron durante 15 horas a 4°C con 2-3 ml de la resina equilibrada, agitando suavemente en un agitador orbital. Después de la incubación, la resina se centrifugó a 1000 X g durante 2 minutos para separar el material no retenido en la columna (denominado nCA), que se encuentra en el sobrenadante, la resina entonces se colocó en una columna de vidrio de 3 ml, a 4°C, y se lavó con NaCl 0.9% pH 6.8 hasta que la absorbancia del eluido a 280 nm fuera menor a 0.01 (unidades arbitrarias). El material retenido (rCA) se eluyó con 3 ml de α -dimetil piranosido (DMM) 0.1 mM pH 7.1 ajustado con Tris, y la columna se lavó de nuevo con 10 volúmenes

de NaCl 0.9% pH 6.8. Tanto la fracción nCA como rCa fueron liofilizadas o concentradas por centrifugación utilizando el sistema "Centricón" de AMICON.

Reconstitución de proteínas en liposomas (Weihua et al, 1992): 50 mg de lecitina de soya se disolvieron en aproximadamente 2 ml de cloroformo y se secaron bajo flujo de nitrógeno formando una capa homogénea, los lípidos se disolvieron en aproximadamente 2 ml de éter etílico y se volvieron a secar bajo flujo de nitrógeno. La película de lípidos se mantuvo al vacío durante 15 hr, manteniendo el tubo que contenía los lípidos en una cámara conectada a una bomba de vacío. Los lípidos se resuspendieron en KCl 130 mM, HEPES 25 mM pH 7.2, EDTA 5 mM, a una concentración de 50 mg/ml. La mezcla se sonicó a claridad y se agregó octilpentaoxietileno a una concentración de 10% y 200 μ M de fura 2 en forma ácida. Posteriormente se agregaron 50 μ l de la muestra de proteína, disuelta en Triton X-100 0.5% o 50 μ l de KCl 130 mM, HEPES 25 mM pH 7.2, EDTA 5 mM en el caso de liposomas sin proteína incorporada (los cuales fueron utilizados como control). Para formar los proteoliposomas y eliminar el detergente, la mezcla se aplicó a una columna de BioBeads SM-2 de 2-3 ml preequilibrada con KCl 130 mM, HEPES 25 mM pH 7.2, EDTA 5 mM, en una relación 2.5 ml resina por cada 550 μ l de mezcla. La resina con la mezcla se mantuvo a 4°C durante 60min, para posteriormente centrifugarse a 400 X g durante 2 min y coleccionar los proteoliposomas. La mezcla se volvió a aplicar a una columna de BioBeads SM, esta vez del doble de tamaño, y se incubó durante 30 min a 4°C. Después de centrifugar, la mezcla se aplicó a una columna de Sephadex G25-300 preequilibrada con KCl 130 mM, HEPES 25 mM pH 7.2, EDTA 5 mM, en una relación 3 ml de resina/ 500 μ l de mezcla. Las columnas se centrifugaron a 400 X g durante 2 minutos y este procedimiento se repitió una vez más para quitar el indicador fluorescente que no entró a los liposomas. La **figura 2** muestra un esquema de los proteoliposomas con el indicador fluorescente.

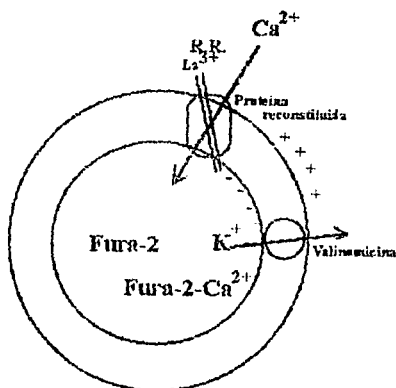


Figura 2. Sistema de liposomas con Fura-2 en el interior. Se muestra un esquema de una vesícula lipídica de lecitina, que contiene en su interior al indicador Fura 2 en su forma ácida. La vesícula contiene K^+ en el interior, mientras que el medio externo no. De esta manera, el Ca^{2+} entra al liposoma a través de la proteína reconstituida (P), en respuesta a un potencial transmembranal generado con la adición de valinomicina (V). El Ca^{2+} entonces se une al fura 2 en el interior de la vesícula y se forma el complejo Fura 2- Ca^{2+} (fluorescente). En este tipo de liposomas se puede evaluar también la sensibilidad del transporte de Ca^{2+} a inhibidores como rojo de rutenio (RR) y lantano (La^{3+}), calibrando la señal con respecto a una fluorescencia máxima, que se obtiene al añadir Ionomicina.

Ensayos de transporte de Ca^{2+} (Weihua et al, 1992): Se hicieron determinaciones fluorométricas con los proteoliposomas. La longitud de onda de excitación fue 340 nm (ancho de banda 8 nm), y la de emisión fue 500 nm (ancho de banda 8 nm), en un fluorómetro SLM-Aminco 8000C. El volumen final del ensayo fue de 2 ml. Después de registrar una señal basal con un medio que contiene HEPES/TEA 25 mM pH 7.2, HEDTA 5 mM, 5-20 μM de Ca^{2+} libre, y TEA para ajustar fuerza iónica a 130 mM, se agregaron 20 μl de proteoliposomas. Después de 50 seg se agregó 1 μM de valinomicina para medir el transporte dependiente de energía, y después de 130 seg se agregó 1 nM de Ionimicina para obtener la fluorescencia máxima. La fluorescencia mínima se consideró como la obtenida antes de la adición de los liposomas. La concentración libre de Ca^{2+} fue calculada con el programa CHELATOR utilizando EGTA como quelante.

Determinación del volumen intravesicular: El volumen interno de los liposomas se estimó por medio del volumen de distribución del indicador fluorescente. Se agregaron proteoliposomas con fura-2 en el interior y sin proteína incorporada, a una celdilla con el mismo medio que se utilizó para los ensayos de transporte de Ca^{2+} , un exceso de Ca^{2+} y 0.5% de octilpentaoxietileno para lisar a los liposomas. La cantidad de indicador dentro del liposoma se determinó por medio de adiciones estándar de fluoróforo (**figura 3**) de acuerdo a la función:

$$[\text{Fura-2}] = F_0 / m$$

Donde [Fura-2] es la cantidad de fluoróforo dentro de la vesícula, F_0 es la fluorescencia antes de adicionar Fura-2 fuera de la vesícula y m es la pendiente de la curva obtenida al final de las adiciones de fluoróforo. Conociendo la cantidad de Fura-2 que se encuentra dentro de la vesícula puede estimarse el volumen de ésta asumiendo que la concentración se equilibró a 50 μM durante el proceso de formación de los liposomas (sabiendo que 50 μmoles se encuentran en un litro; se utilizó una regla de 3 para calcular en qué volumen se encuentra la cantidad de Fura-2 obtenida en este ensayo).

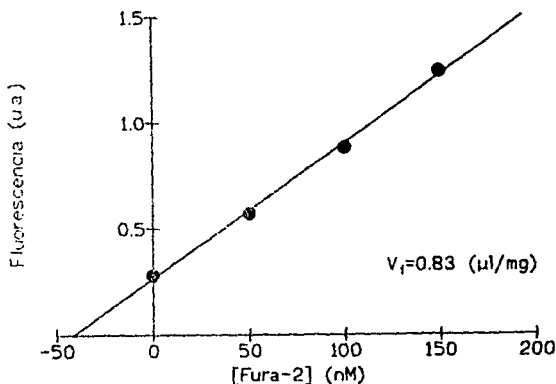


Figura 3. Evaluación del volumen intravesicular. La cantidad de Fura-2 contenida dentro del liposoma se calculó a partir de una curva formada por adiciones conocidas del fluoróforo, como se muestra en la figura. Para la determinación se incubaron 20 μl de liposomas sin proteína incorporada en 2 ml de KCl 130 mM, HEPES 25 mM pH 7.2, y EDTA 5 mM, en presencia de 20 μM de Ca^{2+} libre y se añadieron las cantidades indicadas de Fura 2 en forma ácida. De esta manera, el intersección con las abscisas corresponde a la cantidad de fluoróforo dentro de la vesícula y puede calcularse el volumen de ésta, como se explica en el texto asumiendo que la concentración interna es de 50 μM .

Determinación de las velocidades de transporte de Ca^{2+} : La respuesta de la fluorescencia del indicador al Ca^{2+} fue determinada en cada preparación por adiciones consecutivas del catión, equilibrando la concentración de uno y otro lado de la membrana con 1 nM de ionomicina en KCl 130 mM, HEPES 25 mM pH 7.2 y EDTA 5 mM (figura 4). Los valores obtenidos de esta calibración fueron utilizados para convertir las intensidades de fluorescencia de cada experimento en cantidades de Ca^{2+} , las velocidades iniciales fueron obtenidas por regresión lineal del trazo de fluorescencia. La relación entre la velocidad de transporte y el cambio de fluorescencia está dado por:

$$F = F_0 + \alpha[\text{Ca}^{2+}]$$

$$d[\text{Ca}^{2+}]_T/dt = (1/\alpha) dF/dt$$

Donde F_0 es la fluorescencia mínima y α es la tangente inicial de la gráfica de calibración F contra $[\text{Ca}^{2+}]_T$ (Zhou y cols., 1993).

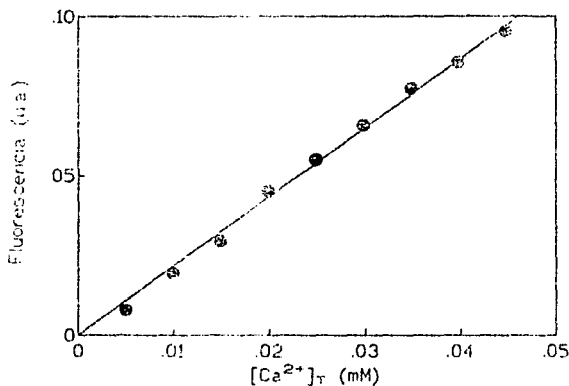


Figura 4 Curva de calibración de cambios de fluorescencia contra la concentración total de Ca^{2+} . Se incubaron 20 μl de liposomas con el indicador fluorescente Fura-2 en su interior, en 2 ml de HEPES/TEA 25 mM pH 7.2, HEDTA 5 mM y en presencia de 1 nM de ionomicina. Después de hacer las adiciones indicadas de Ca^{2+} total se graficaron los cambios de fluorescencia con respecto a las adiciones de Ca^{2+} . Los valores representan un experimento representativo

Los ensayos de reconstitución y transporte de Ca^{2+} fueron realizados en el laboratorio del Dr. Keith D. Garlid (Department of Chemistry, Biochemistry, and Molecular Biology del Oregon Graduate Institute of Science and Technology, Portland, Oregon 97291-1000 USA).

Detección de citocromos: Se hicieron espectros de absorción de luz entre 400 y 700 nm para cada una de las fracciones obtenidas, los máximos de absorción obtenidos fueron comparados con los máximos de absorción típicos para cada tipo de citocromo. Se reporta la presencia o ausencia de cada uno de estos citocromos de manera cualitativa.

Determinación de la composición de aminoácidos de la fracción rCa: 100 μg de proteína purificada en 30 μl de 0.3% de fenol para prevenir la degradación de residuos de tirosina, se sometió a hidrólisis en HCl 6 N durante 25 hr a 110°C y al vacío. Se utilizó un compartimento sellado y la composición aminoácida se determinó en un analizador de aminoácidos Beckman 119-C1.

Determinación del contenido total de carbohidratos (Dubois y cols., 1956): 0.1 ml de muestra se adicionó con 0.1 ml de fenol al 5%, seguido de 0.5 ml de ácido sulfúrico. Las muestras se hirvieron durante 5 min y se leyó la absorbancia a 490 nm. Se utilizó una curva estándar de glucosa.

Determinación de la composición de carbohidratos de la fracción rCA (Montreuil y cols., 1986): La composición de carbohidratos fue evaluada por metanólisis en presencia de meso-inositol como estándar y los glicósidos después de reacetilarse fueron analizados por cromatografía gas-líquida en una columna capilar de silicon OV 101 de 25 mm X 0.32 mm.

La composición de aminoácidos y de carbohidratos fueron determinadas por el Dr. Edgar Zenteno-Galindo en la universidad de Lille, Francia (Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, Bâtiment C9 59655, Villeneuve D'Asco Cedex, France).

Ensayos de unión de Ca^{2+} (Penefski, 1977): Los extractos proteicos (1mg/ml) fueron suspendidos en 1 ml de TrisCl 10 mM pH 7.0 en presencia de 5 μM de

$^{45}\text{CaCl}_2$ como se describe para el ensayo de unión de Ca^{2+} de alta afinidad (Reynafarje y Lehninger, 1969). La actividad específica de la solución de Ca^{2+} fue 1000 cpm/nmol. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, la suspensión fue aplicada a una columna de 1 ml de Sephadex G-50, e inmediatamente se centrifugó a 1000 X g durante 30 seg. La radioactividad del material eluido fue determinado en un contador de centelleo Beckman.

Determinación de proteína método de Biuret (Gornall y cols., 1949): Este método se utilizó para determinar la concentración de proteína de las preparaciones de mitocondrias PSM y de la fracción F50. Se utilizó albúmina sérica bovina como estándar (1-3 mg), en presencia de desoxicolato de sodio: 20-40 μl de la muestra se llevó a 0.6 ml con agua bidestilada, se añadieron 200 μl de desoxicolato de sodio 1%, 2 ml de NaOH 10% y 0.2 ml de sulfato de cobre 1%, y después de 15 min se leyó la absorbancia a 540 nm.

Determinación de proteína método de Amido-Negro (Kaplan y Pedersen, 1985): Esta metodología permite detectar μg de proteína en presencia de miligramos de lípidos: 20 o 40 μl de la solución de liposomas se llevan a 2 ml con agua bidestilada, se agregan sucesivamente 0.2 ml de SDS 10%, 0.3 ml de Tris/HCl 1M pH 7.5, SDS 1% y 0.6 ml de TCA 100% (w/v). Después de incubar 3 min a temperatura ambiente la solución se filtra a través de un filtro Millipore de 45 μm de poro, y se lava al vacío con 2 ml de TCA 6% (w/v). Los filtros se incuban por 3 min en 250 ml de solución teñidora (Amido Negro 10B 0.1% (w/v) disuelto en metanol:ácido acético:agua bidestilada 45:10:45 v/v). Después de la incubación los filtros se lavan con 200 ml de agua. Se incuban 3 veces durante 1 min en 200 ml de solución desteñidora (metanol:ácido acético:agua 90:2:8). Se lavan los filtros en 200 ml de agua durante 2 min. Los filtros se secan sobre toallas de papel, y se colocan en tubos de ensayo y se añade 0.7 ml de NaOH 25 mM, EDTA 0.05 mM, etanol 50% (v/v). Se agitan, se incuban durante 20 min y se mide la absorbancia a 630 nm. Como estándar se utilizó albúmina serica bovina 0.1 mg/ml (1-10 μg).

Otras metodologías:

Electroforesis (Shägger y cols., 1986): El gel de corrida se preparó mezclando 16 ml de acrilamida 30%/bisacrilamida 0.98%, 10 ml de amortiguador

electroforético (Tris 3 M, SDS 0.3%) y 4 ml de glicerol 79.5%. Se añadieron posteriormente 100 µl de persulfato de amonio 10% y 10 µl de TEMED. Con esta mezcla se formó un gel de 1.5 mm de ancho en placas de 20X15 cm. Se dejaron 5 cm sin mezcla, llenados temporalmente con amortiguador electroforético. Después de polimerizado el gel de corrida (20-30 min), se retiró el amortiguador electroforético y se añadió el gel de muestra formado por una mezcla de 1.6 l de acrilamida 30%/bisacrilamida 0.98%, 3 ml de amortiguador electroforético, 7.4 ml de agua bidestilada, 100 µl de persulfato de amonio 10% y 10 µl de TEMED introduciéndose un peine para formar los carriles en los que se aplicarían las muestras. Las muestras se digirieron a una concentración de 1 mg/ml en glicerol 30%, SDS 10% Tris 100 mM, azul de bromofenol 0.3%, y 2-mercaptoetanol 4% y se aplicaron en los carriles del gel. Para el ánodo se utilizó como amortiguador Tris 0.1 M, tricina 0.1%, y SDS 0.1%, mientras que para el cátodo se utilizó Tris 0.2 M pH 8.9. El gel se sometió a 30 V (voltaje constante) hasta que el frente del colorante pasó el gel de muestra, posteriormente se sometió a 100 V durante 15 hr, hasta que el frente salió del gel de corrida. Terminada la corrida el gel se fijó 15 min en metanol 50%, ácido acético 10%, y se tñió durante 3 horas en azul de Coomassie 0.1% y ac. acético 10%. Una vez tñido, el gel se destñió durante 15 hr en ac. acético 10%.

Enfoque isoeléctrico (Vázquez-Acevedo y cols., 1993): Se llevó a cabo en un gel continuo de 20 x 15 cm. La solución del gel contenía: 23.8 g de urea, 10 ml de acrilamida 30%/bisacrilamida 0.98%, 9.8 ml de Nonidet P-40, 7 ml de agua destilada y la siguiente mezcla de anfolinas: pH 3-10 (400 µl); pH 7-9 (200µl) y pH 9-11 (200 µl). La mezcla se degasificó y se polimerizó en presencia de 120 µl de TEMED y 120 µl de persulfato de amonio 10% preparado fresco. Las muestras se solubilizaron como sigue: 100 µg de proteína se llevaron a a 45 µl con agua destilada, y se agregó: 60 mg de urea en polvo, 30 µl de Tritón X-100 20%, 2.5 µl de Tris-HCl 1M pH 7.0, 1 µl de 0.2 M EDTA, 1.2 µl de 2-mercaptoetanol y 5 µl de glicerol por cada 50 µl de mezcla. El reservorio superior de la cámara contenía H₂SO₄ 0.2% degasificado, y el contenedor inferior etilendiamina 0.4% degasificada. Como el amortiguador intercambia CO₂ con el ambiente cuando se localiza en la cámara superior, los electrodos se conectaron de manera invertida (el negativo en el reservorio inferior, y el positivo en el superior). Antes de añadir la muestra, se añadieron 25 µl de

anfólicas pH 9-11 1% y glicerol 5% a cada carril. El gel se precorrío a 250 V (voltaje constante) por una hora. Las muestras digeridas se aplicaron (100 µg de proteína por carril), y se aplicaron los siguientes voltajes: 300 V por 30 min, 350 V por 30 min y 400 V por 15 horas. Antes de teñir el gel se fijó en metanol 50%, ácido acético 10% durante 30 min, posteriormente en ácido tricloroacético 10%, etanol 33% por una hora, apareciendo un precipitado blanco. Se lavó luego el gel en ácido tricloroacético 5%, etanol 33% por 30 min y posteriormente en metanol 30%, ácido acético 10% durante 30 min, luego se tiñó durante 2 horas en metanol 30%, ácido acético 10% y azul brillante de Coomassie 0.2%. se destiñó posteriormente durante 15 horas en metanol 30%, ácido acético 10%.

Tinción con rojo de rutenio (Charuk y cols. 1990): Se corte la electroforesis de la manera indicada anteriormente y el gel se fija en isopropanol 10% durante 48 horas, después de lo cual se tiñe durante 1 hora en rojo de rutenio 25 mg/l. KCl 60 mM, MgCl₂ 5 mM y Tris 10 mM pH 7.5. Si es necesario se destiñe en ac. acético 7%.

Tinción con azul alciano (Wardi, 1972): Se colocan los geles durante 30 min en ácido tricloroacético 12.5%. Se lavan ligeramente con agua destilada y se colocan en ácido periódico 1% (disuelto en ácido acético 30%) durante 50 min Después de lavar muy bien con agua destilada se colocan en metabisulfito de potasio 0.5% (disuelto en ácido acético al 3%) y se destiñen en ácido acético al 7%.

Resultados

Purificación de la fracción glicoprotéica

A. Solubilización con colato y precipitación con sulfato de amonio

Con el objetivo de obtener una preparación de proteínas integrales de membrana interna mitocondrial se utilizó el método de solubilización con colato descrito por Zazueta y cols. (1991). Estos autores demostraron que en presencia de 1.2% del detergente colato se puede obtener una fracción proteica con actividad de transporte de Ca^{2+} , es decir, que el uniportador de Ca^{2+} puede ser solubilizado y conserva su actividad en presencia de este detergente.

Con el solubilizado obtenido a partir de PSM de corazón de bovino, se procedió a precipitar la proteína con sulfato de amonio, también siguiendo la técnica descrita por Zazueta y cols. (1991). Se hizo una primera precipitación con 50% de sulfato de amonio, y después de centrifugar la suspensión se obtuvo un precipitado café/verdoso (al cual se le denominó F50). Esta fracción contiene la mayor parte de las proteínas del solubilizado (Zazueta y cols., 1994), así como probablemente también fragmentos membranales.

La proteína no precipitada con 50% de sulfato de amonio se separó mediante un segundo tratamiento, esta vez utilizando una saturación de sulfato de amonio de 50-90%. En el caso del sulfato del amonio, la solubilidad de las proteínas disminuye a medida que aumenta la concentración de este agente precipitante. Y el proceso es dependiente del pH, la fuerza iónica y el tamaño de la molécula de proteína

Después la centrifugación se obtuvo una fracción de color rojo intenso en la parte superior de la suspensión (F90). Lo anterior indica que dicha fracción es

de naturaleza hidrofóbica, y por tanto, se sale de fase en presencia del detergente utilizado: colato.

Dicha fracción representa menos del 10% de la proteína de las PSM y corresponde al extracto F90 obtenido por Zazueta y cols. (1994), quienes mostraron que F90 es capaz de mediar el transporte de Ca^{2+} en vesículas lipídicas de una manera dependiente en un potencial transmembranal, e inhibible por rojo de rutenio. Es entonces el colato un agente que permite la separación adecuada de dos fracciones claramente distinguibles: F50 y F90.

Después de dializar la fracción F90 (aprox 10 mg disueltos en 10 ml de Tris 10mM pH 7.0) durante 15 hr contra 20 volúmenes de Tris 10 mM pH 7.0, parte de la fracción se tornó insoluble. Este fenómeno ya había sido descrito por Gómez-Puyou y cols. (1972) y es probablemente debido a que cierta cantidad de lípidos contenidos en la fracción hacen que ésta se salga de fase en ausencia de la sal de amonio.

El material insoluble no pudo ser resuspendido ni en presencia de colato, ni en presencia de desoxicolato; y por esto se procedió a centrifugar la fracción F90 a 100,000 X g durante 45 min. Después de esta centrifugación se separó el material precipitado, y el sobrenadante obtenido, que probablemente contiene en su mayoría proteínas solubles fue utilizado para las purificaciones descritas a continuación.

Como una evaluación inicial de la actividad de transporte, de la fracción F90 se hicieron ensayos utilizando el mismo sistema empleado por Zazueta y cols. (1994): se incorporaron los extractos en vesículas lipídicas con citocromo c oxidasa reconstituida, y se encontró que la actividad de transporte de Ca^{2+} solo se presenta en la fracción precipitada con 50-90% de sulfato de amonio (F90). La incorporación de la proteína total de las partículas submitocondriales a las vesículas con citocromo c oxidasa produjo un transporte de 3.09 nmol Ca^{2+} /mg/5 min, de la fracción F50, 0.29 nmol Ca^{2+} /mg/5 min, y de la fracción F90 68.2 nmol Ca^{2+} /mg/5 min. Las actividades mencionadas son menores a las reportadas por Zazueta y cols. (1994) para extractos preparados a partir de

mitocondrias de riñón de rata (la fracción F90 obtenida por estos autores transporta $80 \text{ nmolCa}^{2+}/\text{min}$).

El extracto activo F90, a pesar de haber sido dializado, produce cierta distorsión en los geles de acrilamida cuando se somete a electroforesis; inconveniente que impide una buena resolución de las bandas protéicas (datos no mostrados). Aún así, se pudo distinguir que dicho extracto contiene un número considerable de bandas protéicas; más de las reportadas por Zazueta y cols. (1994) para el F90 aislado de mitocondrias de riñón de rata.

Con el objetivo de separar los componentes del extracto F90 se ensayaron varios métodos. El uso de gradientes de glicerol, a pesar de no dañar significativamente a las proteínas, no permitió separar una fracción activa de manera adecuada, lo que ya había sido reportado anteriormente (Zazueta y cols., 1991). Por otro lado, el fraccionamiento con cantidades intermedias de sulfato de amonio entre 50 y 90% de saturación tampoco fue útil para la separación de una fracción con una actividad de transporte mayor a la encontrada para la fracción F90.

Algunos métodos de precipitación como el uso de polímeros no iónicos y solubles, como el polietilenglicol evitan el deterioro de la muestra, ya que a diferencia de agentes precipitante orgánicos o etanol, el polietilenglicol tiene poca tendencia a desnaturalizar a las proteínas, o a afectar las interacciones entre éstas.

Este tipo de métodos, a diferencia del uso de sales concentradas, como el sulfato de amonio, requieren de menos tiempo para precipitar la proteína hasta un estado físico adecuado para su separación por centrifugación. Sin embargo, la contaminación por grupos carbohidratos impediría una adecuada separación posterior en la columna de concanavalina A.

El método de precipitación utilizado por Mironova (1982), por ejemplo, incluye el uso de 90% de etanol, así como la concentración de las fracciones bajo vacío a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, en estas condiciones es difícil que las proteínas no hayan sido dañadas.

Por el contrario, estos autores refieren que su método de purificación permite el aislamiento de fracciones activas.

B. Separación en columna de Sefarosa 4B-Con A

Con el extracto activo F90 (10 mg/ml. en Tris 10 mM pH 7.0) se procedió a la búsqueda de componentes glicoprotéicos utilizando cromatografía de afinidad con la lectina Concanavalina A (Sefarosa 4B-Con A).

Una adecuada separación utilizando cromatografía de afinidad requiere que el ligando biospecífico esté covalentemente unido a la matriz de la columna, conservando su afinidad de unión por la sustancia de interés; además de que exista un método para separar al ligando en forma activa, después de lavar al material no retenido.

El perfil de elución obtenido se muestra en la **figura 5**. Se observa que la mayor parte de la proteína del extracto F90 no se une a la resina, ya que es eluida después de los lavados con solución salina (fracción nCA). Sin embargo, una pequeña parte si es retenida en la columna y se desprende de ésta con la adición de β -dimetil-piranosido (DMM); este material fue denominado rCA.

La sefarosa utilizada, que es un gel de agarosa, forma una matriz en la que grupos hidroxilo del azúcar están derivatizados para unir covalentemente a la concanavalina A. La sefarosa 4B es una de las resinas más ampliamente utilizadas ya que su estructura forma mallas de poro abierto (su límite de exclusión en filtración en gel es de 20 kDa); y el poro abierto permite el acoplamiento de moléculas grandes como la concanavalina A.

En ensayos preliminares se había adoptado el método de resuspensión de la fracción F90 en un amortiguador que contiene fosfatos, como el utilizado por Zazueta y cols. (1994), sin embargo, en este amortiguador no pudo lograrse la unión de ningún componente a la columna de Sefarosa 4B-Con A. Por tanto, las condiciones utilizadas durante la cromatografía de afinidad incluyeron alta

fuerza iónica y largo tiempo de incubación, además de la exclusión del ión fosfato.

La sefarosa 4B tiene una adsorción no específica extremadamente baja, con lo que solamente se unen a la columna moléculas afines por la concanavalina A. Por otro lado, la malla del gel proporciona excelentes propiedades de flujo, con el mínimo de retardamiento de las moléculas en la red de agarosa. Esto permitió que las separaciones se efectuaran rápidamente.

Por último, esta columna es estable bajo diversas condiciones experimentales, como pH extremo y la presencia de detergentes, y es específica para grupos terminales α -D-glucopiranosil, α -d-manopiranosil o residuos estéricos similares.

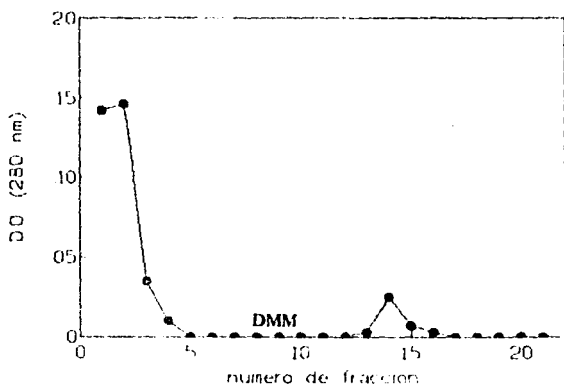


Figura 5. Perfil de elución de la cromatografía en Seafarosa 4B-concanavalina A. Aproximadamente 10 mg de extracto F90 (fracción precipitada con 50-90% de sulfato de amonio) en 10 ml de Tris 10 mM pH 7.0 se incubaron durante 15 hr a 4°C con 2-3 ml de Seafarosa 4B-Con A equilibrada con Tris 10 mM pH 6.8, NaCl 0.5 M, CaCl₂ 0.15% y MnCl₂ 0.1%. Posteriormente se lavó la columna con NaCl 0.9% pH 6.8, recolectándose

fracciones de 2 ml. En la gráfica se muestra la absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas. En donde se indica se adicionaron 3 ml de α -dimetil piranosido (DMM), seguido de lavados con agua bidestilada.

La lectina concanavalina A presenta una baja afinidad por glicoproteínas, además de requerir para su actividad de cationes como el Ca^{2+} y el Mn^{2+} . En este sentido, las condiciones de elución de la columna de Sefarosa 4B-Con A resultaron altamente favorables para la separación específica de una fracción glicoprotéica

La alta fuerza iónica empleada, impidió la unión inespecífica de algún componente no glicoproteico a la resina; y, la ausencia de aniones como el fosfato impidió que el Ca^{2+} o el Mn^{2+} fueran quelados separándose del complejo de la concanavalina A.

Hay que mencionar también que la concanavalina A se forma un complejo tetramérico, que tiende a disociarse a pH menor a 5. Para evitar este efecto, así como para no cambiar de manera importante la solubilidad del extracto F90 (que fue resuspendido a pH 7.0) se eligió utilizar un pH de 6.8 durante todo el proceso de la cromatografía de afinidad.

Caracterización electroforética de la fracción rCA y contenido de citocromos de las diferentes fracciones

En la figura 6 se muestra el resultado de la electroforesis en un gel de acrilamida, utilizando la fracción rCA y estándares de peso molecular rCA consta de una proteína predominante de 36 kDa, así como de pequeñas cantidades de contaminantes, al menos 3 de bajo peso molecular que son difícilmente distinguibles. No se realizaron geles en condiciones nativas, por lo que es difícil especular acerca de si estos componentes forman un complejo o son independientes entre sí. Además, es difícil que existan más componentes menores debido al tamaño del poro de la membrana de diálisis utilizada (PM10).

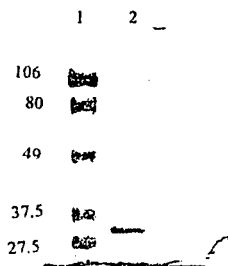


Figura 6. Electroforesis en presencia de SDS de la fracción rCA. Se corrió la electroforesis al 14% de acrilamida como se indica en la metodología. En el carril 1 se corrieron estándares de los pesos moleculares indicados y en el carril 2 se aplicaron 50 μ g de la fracción rCA.

Moore (1971), al observar que el rojo de rutenio, un colorante para carbohidratos (Gustafson y Phil, 1967; Luft, 1965) inhibía específicamente el transporte de Ca^{2+} a la mitocondria, sugirió que el uniportador de Ca^{2+} estaba glicosilado. El rojo de rutenio tiñe específicamente moléculas del tipo de los mucopolisacáridos, y por tanto, la idea de Moore (1971) implica que el sistema uniportador de Ca^{2+} contiene un fracción glicosídica importante, así como un alto contenido de ácido siálico. Sin embargo, podemos observar que de entre las fracciones que han sido asociadas con el uniportador de Ca^{2+} (tabla 2), ninguna contiene cantidades considerables de ácido siálico, y, que a pesar de esto, existe un reporte de la participación de grupos carbohidratos en el proceso de unión del Ca^{2+} al uniportador (Carafoli y Sottocasa, 1974).

La naturaleza glicoprotéica de la fracción rCA trató de ser evaluada en base a tinciones utilizadas para la identificación de moléculas glicosiladas: como la tinción de azul alciano y la de rojo de rutenio. Los resultados de estos ensayos indican que la banda de 36 kDa puede ser teñida con azul alciano, pero no por

rojo de rutenio. Además, ninguno de los colorantes mencionados pudo teñir específicamente glicoproteínas en nuestro sistema electroforético. Por esta razón dichos resultados no fueron útiles en la caracterización de nuestras fracciones mitocondriales. Aunque la presencia de glicoproteínas en las PSM pudo ser detectada por ensayos de tinción con el sistema Avidina-Biotina para detección de carbohidratos, ya que en estos ensayos se evidenció la existencia de al menos 2 componentes glicoprotéicos (datos no mostrados).

El rojo de rutenio, que es el inhibidor más efectivo del transporte de Ca^{2+} en mitocondrias, es capaz de teñir proteínas que unen Ca^{2+} con alta afinidad, como la calsecuestrina. Intentamos teñir la fracción glicoproteica rCA con rojo de rutenio de acuerdo al método de Charuk y cols. (1990), pero, en nuestro sistema no se teñió la fracción rCA; y únicamente fue teñida cierta proteína de alto peso molecular en una fracción completa de PSM. El hecho de que nuestra fracción rCa no haya sido teñida por rojo de rutenio, no excluye la posibilidad de que pueda pegar Ca^{2+} con alta afinidad, ya que nuestra fracción rCA difiere de las proteínas solubles ensayadas por Charuk y cols. (1990), además de que el sitio de unión a rojo de rutenio o de unión a Ca^{2+} pudo disociarse durante la electroforesis en presencia de SDS.

Para determinar el contenido (en proteína) de la banda de 36 kDa en la fracción rCA se hicieron digitalizaciones de un gel electroforético (figura 7). Se obtuvieron valores de densidad óptica de las bandas de albúmina utilizada como estándares, y de la banda de 36 kDa en la fracción rCA. Posteriormente, la cantidad de proteína en la banda de 36 kDa fué comparada con la cantidad de proteína del extracto rCA añadida al gel. De esta manera se estimó que el 80% de la fracción glicoproteica rCA corresponde a la proteína de 36 kDa, y el 20% restante corresponde a otros componentes.

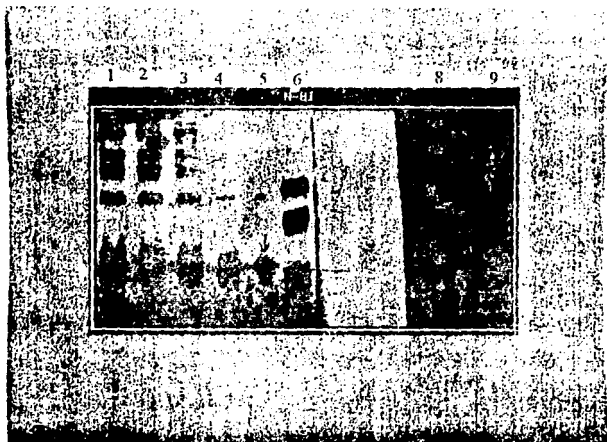


Figura 7. Determinación del contenido de proteína por digitalización del gel de acrilamida. Se corrió la electroforesis al 14% de acrilamida como se indica en la metodología. Los carriles del 1-5 contienen las siguientes cantidades de albúmina sérica bovina: 1.- 8 μg , 2.- 7 μg , 3.- 6 μg , 4.- 5 μg y 5.- 1 μg . Los carriles 6 y 8 muestran estándares de peso molecular (106 kDa, 80 kDa, 49 kDa, 32,5 kDa; y 27,5 kDa); y el carril 9 contiene 50 μg de la fracción rCA. Una vez teñido con azul de Coomassie, el gel fue digitalizado para registrar la intensidad de las bandas. Con estos datos se construyó una curva de intensidad de las bandas de albúmina con respecto a la cantidad de proteína que contienen (la cual era conocida), y se interpoló sobre esta gráfica la intensidad de la banda en el extracto rCA.

Se evaluó también la presencia de citocromos en las diferentes fracciones obtenidas. La **tabla 4** muestra el tipo de citocromos detectados en cada una de estas fracciones. La muestra de partículas submitocondriales, así como la fracción F50, contienen la mayor parte de los citocromos mitocondriales, a diferencia de la fracción F90 que solo contiene citocromo tipo c. Este último citocromo aparece en la fracción no retenida en la columna de concanavalina A (nCA), mientras que en la fracción retenida (rCA) no se detectó ningún citocromo, estos datos apoyan la idea de que la actividad de transporte de Ca^{2+}

de la fracción glicoprotéica no puede ser atribuida a algún componente catalítico de la cadena respiratoria.

Tabla 4. Citocromos presentes en los extractos mitocondriales^a

Extracto	Citocromos presentes
PSM	b,c1,c,a,a3
F50	a,a3,b,c
F90	c
nCa	c
rCA	ninguno

^aSe detectó cualitativamente el contenido de citocromos en las muestras, por medio de corrimientos espectroscópicos entre 400 y 700 nm. PSM: partículas submitocondriales F50 fracción precipitada con 50% de sulfato de amonio, F90 fracción precipitada con 50-90% de sulfato de amonio, nCA fracción no retenida en una columna de concanavalina A, rCa: fracción retenida en la columna de concanavalina A.

Reconstitución de las fracciones proteicas a vesículas lipídicas

La reconstitución de transportadores mitocondriales ha sido difícil debido a la complejidad de la membrana mitocondrial. La reconstitución del translocador de adenin nucleótidos en vesículas de lecitina de soya es un ejemplo exitoso de este tipo de experimentos (Hentzer y Racker, 1994).

Prestopino y cols. (1974), por su parte, utilizaron bicapas de lecitina para evaluar el cambio de conductancia debido a la glicoproteína aislada por Sottocasa y cols. (1972), en presencia de 2-4 μM de Ca^{2+} . Sin embargo, estos autores no pudieron demostrar la generación de potenciales de Nerst debidos a la glicoproteína, y por tanto, no se demostró que esta fracción fuera capaz de inducir movimientos de Ca^{2+} de uno al otro lado de la membrana.

Los extractos parcialmente purificados, así como la fracción glicoproteica rCA aislados en este trabajo fueron incorporados a liposomas de α -lecitina con el indicador fluorescente Fura 2 y KCl en el interior. El sistema de liposomas a base de α -lecitina ha sido utilizado con éxito para la reconstitución del canal mitocondrial de K^+ y del intercambiador Ca^{2+}/Na^+ (Paucek y cols., 1992; Weihua y cols., 1992).

Los liposomas fueron incubados en un medio que no contiene potasio, como se indica en la metodología (figura 2). La cantidad de proteína incorporada a los liposomas fue generalmente: 370 $\mu\text{g/ml}$ en liposomas con F90 (la solución contiene 50 μg de lecitina por ml); 174 $\mu\text{g/ml}$ en liposomas con nCA y 16 $\mu\text{g/ml}$ en liposomas con rCA. El volumen intravesicular calculado fue en general 0.8-1 $\mu\text{l/mg}$ de fosfolípido.

Ensayos de transporte de Ca^{2+}

Los indicadores fluorescentes como el Quin-2 (T sien y cols., 1982), Fura-2 e Indo-1 (grynkievitz y cols., 1985) y Fluo-3 (Kao y cols., 1989) han sido utilizados preferentemente a otros indicadores de Ca^{2+} como la aequorina, el arsenazo III o el electrodo de Ca^{2+} , para determinar la concentración de Ca^{2+} libre en la matriz mitocondrial (para una revisión ver Moreno-Sánchez y cols., 1993). Estos indicadores tienen la ventaja de que no afectan la integridad membranar, ni la homeostasis del Ca^{2+} , además de permitir una determinación cuantitativa de la concentración libre de Ca^{2+} si se efectúa una calibración adecuada de la señal fluorescente.

El Fura-2 ha sido el indicador fluorescente más estudiado, ya que el indicador libre tiene su máximo de fluorescencia de excitación a los 380 nm, mientras que el complejo indicador- Ca^{2+} presenta su máximo de absorción a los 340 nm, que fue la longitud de onda de excitación utilizada en este trabajo.

La velocidad de respuesta de los indicadores fluorescentes es mayor que la de otros indicadores, y su intervalo de sensibilidad está dentro del intervalo de

concentraciones de Ca^{2+} encontradas en la mitocondria en condiciones fisiológicas (0.1-1.0 μM), pero son fotolábiles así como termolábiles. El funcionamiento de este tipo de indicadores se basa en la coordinación del catión Ca^{2+} con 4 grupos carboxilo en la molécula del indicador. Dichos grupos carboxilo proximales son similares a los que se encuentran en la molécula del agente quelante EGTA (**figura 8**). una vez unido al indicador, el Ca^{2+} induce cambios conformacionales en el indicador que se reflejan en sus propiedades fluorescentes.

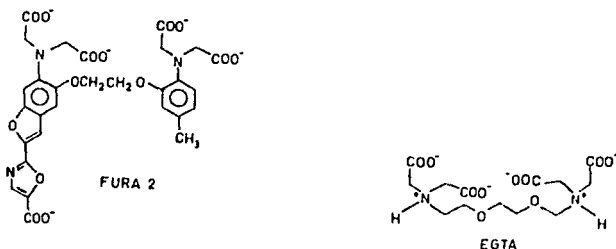


Figura 8. Estructura química del EGTA y de l Fura-2. Tomada de Moreno-Sánchez y cols. (1993)

El Fura-2 tiene una alta eficiencia cuántica (0.49) lo que permite que se utilicen concentraciones bajas, entre 1-10 μM del compuesto en forma de acetoximetil éster (AM) en el proceso de internalización del fluoróforo a mitocondrias. En el caso de mitocondrias completas, dentro de la matriz, las esterasas convierten al indicador en la forma ácida (**figura 8**), que es la que es capaz de unirse al Ca^{2+} . En el caso de vesículas lipídicas puede utilizarse directamente la forma ácida del fluoróforo durante el proceso de formación de los liposomas para que de esta manera quede atrapada dentro de ellas.

En este trabajo se utilizó una concentración de 200 μM de Fura-2 en su forma ácida, para el proceso de internalización del indicador; como había sido descrito por Weihua y cols. (1992) para ensayos de reconstitución del intercambiador mitocondrial de Na/Ca^{2+} .

Para determinar cuantitativamente la concentración de Ca^{2+} libre dentro de la vesícula es necesario utilizar un valor de K_d del complejo indicador- Ca^{2+} determinado en el mismo sistema experimental, sobre todo si durante el experimento cambian drásticamente las condiciones de pH, polaridad o fuerza iónica del microambiente donde se localiza el indicador.

Con este fin utilizamos una curva de calibración de los cambios de fluorescencia con respecto a los cambios en la concentración de Ca^{2+} (figura 3) De la gráfica obtenida no puede calcularse la K_d ya que no se llegó a la saturación del indicador, sin embargo podemos tener la confianza de que utilizamos concentraciones de Ca^{2+} que caen dentro del intervalo lineal de la curva de calibración. Y, utilizamos la relación empírica entre $[\text{Ca}^{2+}]$ y fluorescencia que se menciona en la metodología, que incluye el término α , correspondiente a la pendiente de la curva de calibración.

En el caso de mitocondrias, la captación de solo unos cuantos nmoles de Ca^{2+} induce cambios de hasta 1-2 unidades de pH y cambios en el volumen y en la fuerza iónica de la matriz mitocondrial (Konishi y cols., 1988; Roe y cols., 1990). Durante los experimentos con liposomas cargados con Fura-2, el pH de la solución no varió considerablemente, manteniéndose entre 7.2 y 7.17.

Un trazo típico de fluorescencia obtenido utilizando los liposomas cargados con Fura-2 se muestra en la figura 9: al adicionar los liposomas al medio de incubación se produce el mayor incremento en fluorescencia (figura 9 a.), este incremento no es debido al Ca^{2+} , sino a la fluorescencia intrínseca del indicador, así como a cierta dispersión causada por la partícula de liposoma.

A este respecto hay que mencionar que la concentración final de fosfolípido en el ensayo fue de 0.5 mg/ml, el agregar una cantidad mayor de liposomas hubiera

causado una fluorescencia inicial mucho mayor que hubiera dificultado la interpretación de los cambios de fluorescencia en presencia de Ca^{2+} , y por el contrario, el uso de menos liposomas en el ensayo no producen una señal cuantificable después de las adiciones de Ca^{2+} .

Para hacer cuantitativas las mediciones de Ca^{2+} libre se tiene que efectuar una calibración de la señal fluorescente. Para establecer qué fracción de la fluorescencia registrada corresponde a un cambio en la concentración de Ca^{2+} dentro de la vesícula se determina la fluorescencia mínima y la fluorescencia máxima en cada experimento.

En experimentos con mitocondrias e indicadores fluorescentes, la fluorescencia mínima se obtiene permeabilizando la membrana con detergente y añadiendo Mn^{2+} , que tiene mayor afinidad por los indicadores que el Ca^{2+} , y por tanto apaga la fluorescencia. Con este método se puede estimar la contribución del indicador que se encuentra fuera de la mitocondria si se invierte el orden de adición, y se adiciona el Mn^{2+} antes de adicionar el detergente.

Sin embargo, el uso de detergentes para determinar la fluorescencia mínima tiene la desventaja de que al disolver las membranas se podría liberar a moléculas del indicador que se hallen unidas a proteínas, y de esta manera se modificarían las propiedades fluorescentes del indicador (Konishi y cols., 1988). Además, la lisis, de los liposomas podría modificar la viscosidad del medio así como la polaridad del microambiente donde está localizado el indicador.

Otra manera de obtener la fluorescencia mínima es adicionando un exeso de EGTA y elevando el pH de la solución por arriba de 7.5 para que todo el Ca^{2+} se una a este quelante y se apague la fluorescencia del indicador.

La fluorescencia antes de la adición de los liposomas se consideró como fluorescencia mínima. El valor de fluorescencia mínima se restó del valor de fluorescencia obtenido con la adición de Ca^{2+} , así como de la fluorescencia máxima.

Después de registrar una línea basal durante 20-50 seg, en presencia de los liposomas, se añadió valinomicina para generar un potencial negativo interno en la vesícula. El cambio de fluorescencia producido corresponde a la captación de Ca^{2+} a través de la proteína incorporada en las vesículas de lecitina (**figura 9 b.**), dependiente en un potencial transmembranal.

En comparación con el tamaño del trazo total de fluorescencia, el cambio producido por la adición de valinomicina es pequeño (**figura 9**). Esto indica que la captación de Ca^{2+} a través de la fracción glicoprotéica (que es la fracción con mayor actividad de transporte) es baja. Aunque esto es en parte debido a la poca proteína utilizada en el ensayo, también la actividad específica de la fracción rCA evaluada en este sistema es considerablemente menor a la reportada por Zazueta y cols. (1994) para el extracto F90, como se verá más adelante.

Cuando se utiliza valinomicina para generar un potencial negativo interno en la vesícula es necesario hacer una titulación cuidadosa en presencia de este ionóforo en liposomas sin proteína incorporada, ya que a altas concentraciones pueden observarse movimientos de Ca^{2+} debidos a la adición del ionóforo. Los resultados aquí mostrados se obtuvieron utilizando una concentración de valinomicina que no aumenta la permeabilidad de la vesícula por Ca^{2+} (datos no mostrados).

El trazo de fluorescencia (**figura 9 b.**) muestra también la inhibición obtenida con 20 nM de rojo de rutenio o 4 μM de lantano. Esta sensibilidad a los inhibidores del uniportador mitocondrial de Ca^{2+} permite relacionar a esta fracción con el uniportador. La sensibilidad de rCA es mucho mayor que la reportado para otras preparaciones mitocondriales (Mironova, 1982; Zazueta y cols., 1994).

Para obtener la fluorescencia máxima se añadió ionomicina. Con la adición de este ionóforo se equilibra la concentración de Ca^{2+} de uno y otro lado de la membrana del liposoma, y todo el Ca^{2+} entra en contacto con el indicador, obteniéndose la máxima fluorescencia.

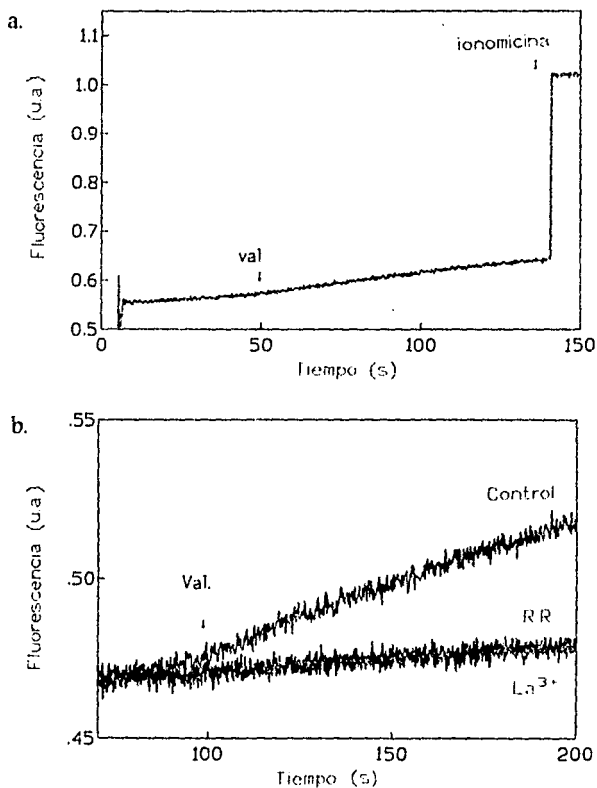


Figura 9. Trazo de fluorescencia obtenido de la acumulación de Ca^{2+} en las vesículas lipídicas. a. Se registró una línea basal con 2 ml de HEPES/TEA 25 mM pH 7.2, HEDTA 5 mM, y se añadieron 20 μl de vesículas lipídicas reconstituidas con la fracción rCA. Después de 50 seg se añadió 1 μM de valinomicina, y finalmente, después de 150 seg, se añadió 1 nM de de ionomicina para calibrar la señal. b. El mismo trazo pero en tamaño aumentado, se muestra la inhibición del transporte con rojo de rutenio (20 nM) y lantano (4 μM).

La **figura 10** muestra la actividad específica de transporte de Ca^{2+} para las diferentes fracciones obtenidas. La fracción F50 no fue capaz de mediar la acumulación de Ca^{2+} a la vesícula, mientras que la fracción F90 transporta 10 nmol Ca^{2+} /min mg, la actividad de transporte se incrementa unas 10 veces en la fracción rCa, hasta 90 nmol/min mg; actividad que es inhibida aproximadamente en un 50% por 20 nM de rojo de rutenio o 4 μM de lantano. La fracción no retenida en la columna de concanavalina A (nCA) tampoco fue capaz de mediar el transporte de Ca^{2+} .

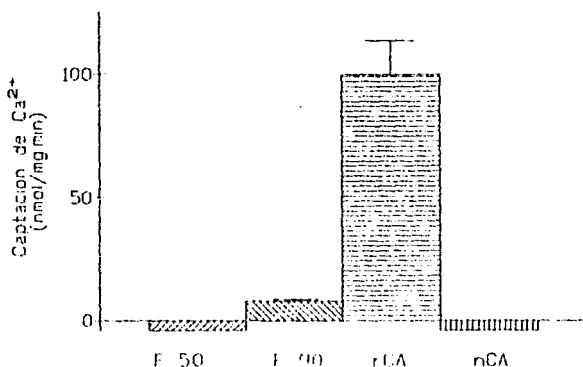


Figura 9. Actividad específica de las fracciones protéicas. Se muestra la velocidad de transporte de Ca^{2+} de las diferentes fracciones. Después de registrar una señal basal con 2 ml de HEPES/TEA 25 mM pH 7.2, HEDTA 5 mM, se añadieron 20 μl de vesículas lipídicas. Después de 50 seg se añadió 1 μM de valinomicina, y finalmente, después de 150 seg se añadió 1 nM de de ionomicina para calibrar la señal. Los valores representan la media \pm error estándar de un total de 3-5 preparaciones.

Las actividades encontradas para las fracciones F50 y F90 en este sistema son significativamente menores que las reportadas anteriormente (Zazueta y cols., 1994), sin embargo, la única fracción que presentó actividad de transporte fue la fracción F90.

Lo anterior indica que para la preparación de la fracción glicoprotéica se partió de un extracto que contiene al uniportador de Ca^{2+} . Por otro lado, no pudo detectarse actividad de transporte de Ca^{2+} en la fracción nCA y esto es indicativo de que muy probablemente los componentes del sistema uniportador de Ca^{2+} estén contenidos solamente en la fracción glicoprotéica rCA. Aunque no podemos, hasta el momento, atribuir la actividad de transporte de Ca^{2+} a alguno de los componentes de esta fracción en particular.

La **tabla 5** muestra la relación entre la cantidad de proteína y la actividad de transporte de Ca^{2+} obtenida para cada fracción: puede observarse que la fracción F90, que corresponde al 1.3% de la proteína de las partículas submitocondriales, si transporta Ca^{2+} , mientras que la fracción F50 (97% de la proteína de las partículas submitocondriales) no.

Esta actividad se ve enriquecida cuando se separa, a partir de F90, la fracción glicoprotéica rCA (correspondiente al 4% de la proteína de la fracción F90, o al 0.05% de la proteína total de las partículas submitocondriales), que transporta aproximadamente 100 nmol de Ca^{2+} /min/mg; en comparación con la fracción no retenida en la columna de concanavalina A (nCA), la cual no es capaz de mediar el transporte de Ca^{2+} , y corresponde al 92% de la proteína de la fracción F90.

Tabla 5. Actividad específica de transporte de Ca^{2+} en las diferentes fracciones^a

Fracción	Cantidad de proteína (mg)	Actividad de transporte (nmol Ca^{2+} /min/mg)	Porcentaje de la proteína total de las partículas submitocondriales
F50	765.00	0.00	92.05
F90	10.18	15.00	1.22
nCA	9.40	0.00	1.13
rCa	0.41	98.00	0.049

^aSe muestra la cantidad de proteína purificada de acuerdo a los procedimientos explicados en la metodología, con respecto a su actividad específica de transporte de Ca^{2+} . La actividad de transporte fue evaluada incorporando cada fracción en liposomas de asolectina con el indicador fluorescente Fura-2 en el interior (ver metodología). F50: fracción precipitada con 50% de sulfato de amonio, F90: fracción precipitada con 50-90% de sulfato de amonio, nCA: fracción no retenida en una columna de concanavalina A, rCa: fracción retenida en la columna de concanavalina A.

Sensibilidad del transporte de Ca^{2+} a inhibidores y activadores:

Se hicieron curvas de titulación de rojo de rutenio y lantano utilizando liposomas reconstituidos con la glicoproteína rCA. La sensibilidad a estos inhibidores del transporte de Ca^{2+} (Gunter y Pfeifer, 1990) se encontró en el orden de lo reportado para mitocondrias completas.

Estas curvas de inhibición presentadas en este trabajo representan el primer estudio cinético de este tipo con una preparación purificada del uniportador mitocondrial de Ca^{2+} (figura 10), lo cual pudo ser realizado debido a que con el sistema de vesículas lipídicas con Fura 2 en el interior, es posible estimar velocidades iniciales de transporte, a diferencia de otros métodos como la captación de ^{45}Ca , que miden los cambios en la concentración de Ca^{2+} total una vez que se ha alcanzado el equilibrio. Se encontró una $K_{0.5}$ para rojo de rutenio de 16.11 ± 1.31 nM (3), y una $K_{0.5}$ para La^{3+} de 3.91 ± 0.27 μ M.

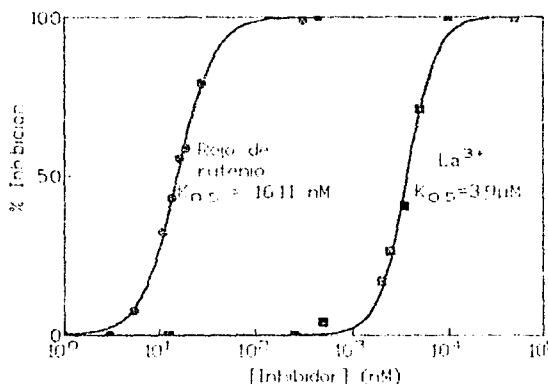


Figura 10. Inhibición por rojo de rutenio y La^{3+} del transporte de Ca^{2+} , mediado por la fracción glicoprotéica rCA. Se hicieron ensayos de transporte de Ca^{2+} en las vesículas lipídicas reconstituidas con la fracción retenida en la columna de concanavalina A (rCA). Después de registrar una señal basal con 2 ml de HEPES/TEA 25 mM pH 7.2, HEDTA 5 mM, en presencia de las concentraciones indicadas de rojo de rutenio o La^{3+} . Se añadieron 20 μ l de vesículas lipídicas. Después de 50 seg se añadió 1 μ M de valinomicina, y finalmente, después de 150 seg se añadió 1 nM de ionomicina para calibrar la señal. Los valores representan experimentos representativos.

Se ha descrito que poliaminas como la espermina pueden activar el transporte de Ca^{2+} a concentraciones bajas de este ión, en nuestros ensayos utilizamos concentraciones libres de Ca^{2+} en el rango nanomolar (entre 10^{-9} y 10^{-6} M), y encontramos que el transporte de Ca^{2+} mediado por la proteína rCA es inhibido por la espermina con una $K_{0.5}$ de 140 μ M (figura 11). Este dato resulta interesante porque podría sugerir una regulación de la actividad de transporte de la glicoproteína por poliaminas, sin embargo, es necesario que se apoye esta

información con ensayos de transporte en presencia de espermina y sin glicoproteína incorporada a la vesícula.

El Mg^{2+} , otro inhibidor del transporte de Ca^{2+} en mitocondrias fue utilizado en este sistema. Los resultados fueron poco confiables debido a que el Mg^{2+} aumentó la fluorescencia del indicador Fura 2 de una manera similar a como lo hace el Ca^{2+} .

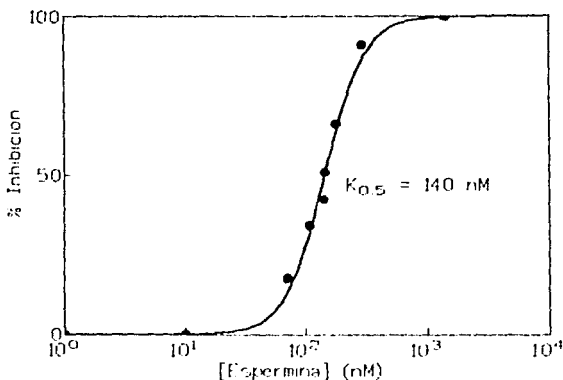


Figura 11. Inhibición por espermina del transporte de Ca mediado por la glicoproteína rCa.

Se muestra el porcentaje de inhibición producido por las concentraciones indicadas de espermina. El experimento se hizo como en la figura 10, los valores representan un experimento representativo.

El uso de amortiguadores de Ca/HEDTA hizo posible la determinación de velocidad de transporte de Ca^{2+} en presencia de diferentes concentraciones de Ca^{2+} libre. La concentración de Ca^{2+} se calculó utilizando el programa CHIELATOR (Schoenmakers y cols, 1992) que toma en cuenta la influencia de la

temperatura, la fuerza iónica y el pH sobre el valor de la constante de disociación del complejo HEDTA-Ca²⁺.

La consecuencia principal del uso de los amortiguadores de Ca²⁺/HEDTA es el hecho de que la concentración libre de Ca²⁺ es la misma a una determinada relación [Ca²⁺]/HEDTA, no importando las concentraciones totales de Ca²⁺ y HEDTA, de tal manera que se puede fijar la [Ca²⁺] libre preparando de antemano el amortiguador de Ca²⁺ con las concentraciones adecuadas de quelante y de Ca²⁺, o bien, utilizar una concentración baja de quelante (HEDTA) en el medio y luego variar la concentración de Ca²⁺ libre mediante la adición de una cantidad determinada del amortiguador Ca²⁺/HEDTA. En los experimentos expuestos en secciones anteriores se utilizó la primera estrategia, mientras que para calcular la K_{0,5} de Ca²⁺ se utilizó la segunda.

La **figura 13** muestra una curva de captación de Ca²⁺ con respecto a variaciones en la concentración de Ca²⁺ libre. Los liposomas se reconstituyeron con la fracción F90. En estos experimentos se utilizaron concentraciones relativamente altas del amortiguador de pH (HEPES) ya que la adición del amortiguador puede acidificar en cierta medida el medio cuando el Ca²⁺ se une al quelante; y un cambio de pH en el orden de 0.1 unidades es suficiente para cambiar de manera importante la afinidad del quelante por Ca²⁺, alterando la concentración de Ca²⁺ libre. Por otro lado, a pH mayor a 7.4 la afinidad del HEDTA por Ca²⁺ es tan alta que prácticamente no existe un equilibrio entre el HEDTA libre y el complejo Ca²⁺-HEDTA.

El comportamiento sigmoidal de la curva de la figura no es una evidencia de la cooperatividad del proceso de acumulación de Ca²⁺ en la vesícula, pero se calculó de esta gráfica una K_{0,5} para Ca²⁺ de 14.2 μM y un coeficiente de Hill de 2, que si es indicativo de que el proceso es cooperativo, y coincide con lo reportado para el transporte de Ca²⁺ en mitocondrias completas (Gunter y Pfeifer, 1990).

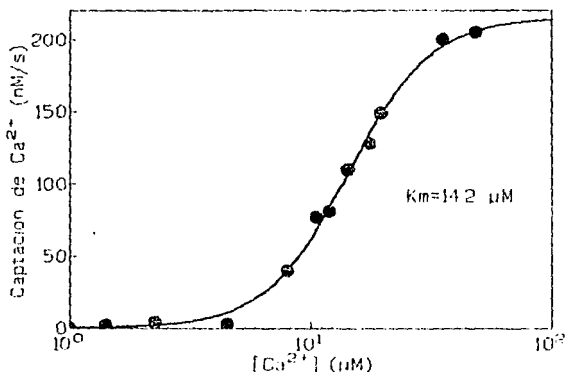


Figura 13. Velocidad de transporte de Ca^{2+} mediada por la fracción F90 en respuesta a diferentes concentraciones de Ca^{2+} . Después de registrar una señal basal con 2 ml de HEPES/TEA 25 mM pH 7.2, HEDTA 5 mM, en presencia de las concentraciones indicadas de Ca^{2+} . Se añadieron 20 μl de vesículas lipídicas. Después de 50 seg se añadió 1 μM de valinomicina, y finalmente, después de 150 seg se añadió 1 nM de de ionomicina para calibrar la señal. Los valores representan experimentos representativos.

Composición de aminoácidos

La fracción rCa está compuesta en un 80% por un componente de 36 kDa (figura 7), mientras que solamente un 20% corresponde a componentes menores. Tomando en cuenta el peso molecular del componente mayoritario se evaluó la composición de aminoácidos (tabla 6), y hicieron los estudios presentados en esta sección.

Tabla 6. Composición de aminoácidos la fracción glicoprotéica rCA^a

Aminoácido	Porcentaje	Residuos por molécula
Asx	3.00	11.78
Glx	5.80	14.92
Ser	25.60	100.56
Gly	23.20	91.14
His	3.00	11.78
Arg	1.70	6.67
Thr	7.20	28.28
Ala	10.10	39.67
Pro	2.60	10.21
Tyr	0.30	1.17
Val	4.60	18.07
Met	0.40	1.57
1/2Cys	0.20	0.78
Ile	2.90	11.39
Leu	4.40	17.28
Phe	2.60	10.21
Lys	4.40	17.28

^aSe sometió a hidrólisis ácida la fracción rCA, en HCl 6 N durante 25 hr a 110°C. La composición de aminoácidos fue determinada en un analizador de aminoácidos Beckman 119-C1. Los valores representan el porcentaje de cada uno de los aminoácidos con respecto al total, y el número de residuos por molécula. Se utilizó un peso molecular de 40 kDa para el péptido rCA, y un peso promedio por aminoácido de 110 Da.

Respecto a la naturaleza de los componentes membranales involucrados en el transporte de Ca²⁺, se pueden dividir las fracciones aisladas hasta la fecha: en solubles e hidrófobas (tabla 2).

Utilizando el método descrito por Capaldi y Vanderkooi (1972) se calculó una polaridad de 48.7% para esta fracción glicoprotéica. Dicha polaridad es ligeramente mayor al valor promedio encontrado por estos autores para proteínas membranales. Podríamos entonces catalogar a la fracción rCA dentro del grupo de las fracciones solubles, sin que se descarte la interacción de dicha fracción con la membrana mitocondrial.

El punto isoeléctrico del componente de 36 kDa, fue evaluado por isoelectroenfoque, encontrándose un valor de 6.0, éste valor indica que la molécula, a pH fisiológico se encontrará cargada negativamente.

La fracción rCA tiene un alto contenido de serina y glicina (tabla 6), y, asumiendo un peso molecular de 36 kDa contiene una sola molécula de cisteína por molécula de proteína.

Chávez y cols. (1985) estudiaron el efecto de modificadores de grupos tioles sobre el transporte de Ca^{2+} . El Cd induce la salida de Ca^{2+} en mitocondrias, pero también inhibe la fosforilación oxidativa y estimula la actividad de la ATPasa en un proceso inhibible por rojo de rutenio. Además, el ditioneitol evita la inhibición producida por el Cd.

Debido a esto, se sugirió que existen grupos tioles involucrados en la actividad del uniportador de Ca^{2+} , y que estos se encuentran en una región hidrofóbica, accesible al Cd pero no accesible a reactivos impermeables a la membrana, como el mersalyl, ya que éste no fue capaz de inhibir el transporte de Ca^{2+} . Se sugirió también que el Cd pudiera unirse al sitio de unión del Ca^{2+} o a un sitio alostérico, dentro del uniportador.

Mironova y cols. (1982), por su parte, también mostraron la participación de estos grupos en el transporte de Ca^{2+} , ya que purificaron un péptido activo utilizando una columna de sefarosa 4B activada para unir grupos tioles.

El análisis de los aminoácidos funcionales ha mostrado que al menos 3 grupos carboxilo están involucrados en la unión y transporte de Ca^{2+} al uniportador (Reed y Bygrave, 1975)

El alto contenido de serina de la fracción rCA provee a la molécula de una gran cantidad de grupos hidroxilo, los cuales son sitios potenciales de unión de Ca^{2+} . Es posible que estos grupos carboxilos e hidroxilos jueguen un papel importante en el proceso de unión a Ca^{2+} .

Sin embargo, solamente conociendo la secuencia aminoácida de esta proteína pueden hacerse especulaciones confiables acerca de su estructura y sitios de unión para Ca^{2+} y para activadores e inhibidores.

Composición de carbohidratos de la fracción rCA

Algunas de las fracciones que han sido asociadas con el uniportador mitocondrial de Ca^{2+} contienen hexosaminas y lípidos (tabla 2). La composición de carbohidratos del péptido aislado (tabla 7), muestra un predominante contenido de manosa y n-acetilglucosamina, mientras que no se detectó N acetil-D- glucosamina.

Tabla 9. Composición de carbohidratos de la fracción rCA^a

Monosacárido	Fracción
galactosa	0.04
manosa	3.00
glucosa	0.20
N-acetilglucosamina	1.50
ácido siálico	0.03

^aLas muestras fueron sometidas a metanólisis en presencia de mesoinositol como estándar, los glicósidos después de reacetilarse fueron analizados por cromatografía gas-líquida en una columna capilar de silicón OV 101 de 25 mm X 0.32 mm. Se muestran los valores con respecto al contenido de manosa. No se detectó N-D-galactosamina.

La lectina concanavalina A es afín por estructuras del tipo que se muestra en la figura 14 donde un esqueleto de N-acetil-D-glucosamina se encuentra unido a la proteína a través de un residuo de asparagina, y está sustituido por dos esqueletos similares; por tanto, una estructura de este tipo pudiera encontrarse en la fracción glicoproteica (rCA) aislada en este trabajo. Además, una estructura glicosídica simple de este tipo no entra en conflicto con una localización membranal.

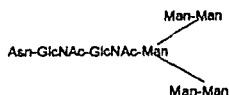
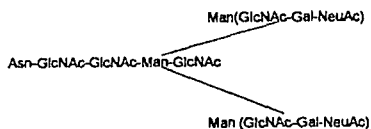


Figura 14. Estructuras glicosídicas reconocidas por la lectina concanavalina A. Se muestran dos estructura lactosaminicas ramificada con grupos trimanosídicos sustituidos por dos esqueletos de N-acetil-D-glucosamina, y unidos a la proteína a través de un residuo de asparagina. Este tipo de estructuras lactosaminicas contienen cantidades despreciables de ácido siálico. Asn: asparagina; GlcNAc: N-acetil-D-glucosamina; Man: manosa; NeuAc: ácido siálico; Gal: galactosa.

Contenido de carbohidratos de las diferentes fracciones

El contenido de carbohidratos de las diferentes fracciones obtenidas se muestra en la **tabla 8**. Es posible que existan otros componentes glicosilados en los compartimentos mitocondriales, como ha sido sugerido anteriormente (de Bernard y cols, 1971), sin embargo, hay que tomar en cuenta que los valores presentados en esta tabla estan sobreestimados en el caso de las fracciones F50 y F90, por la incompleta separación de la sacarosa utilizada en su preparación, y en el caso de la fracción rCA por restos del azucar utilizado para la elución de la columna de concanavalina A.

Tabla 8. Contenido de carbohidratos totales en las fracciones^a

Extracto	Porcentaje de carbohidrato
PSM	17.14
F50	3.62
F90	21.30
rCA	10.00

^aSe trataron las muestras con 0.1 ml de fenol 5% y 0.5 ml de ácido sulfúrico por cada 0.1 ml de extracto, después de hervir durante 5 min se determinó el contenido de carbohidratos comparando la absorbancia a 490 nm con la de una curva estándar de glucosa. Los valores representan el porcentaje de carbohidratos con respecto al total de la proteína. PSM: partículas submitocondriales, F50: fracción precipitada con 0.50% de sulfato de amonio, F90: fracción precipitada con 50.00% de sulfato de amonio, rCa: fracción retenida en la columna de concanavalina A. Los valores representan una medición representativa.

Ensayos de unión de Ca^{2+}

El transporte mitocondrial de Ca^{2+} se caracteriza por su alta afinidad (Reed y Bigrave, 1974), así que la proteína que sea identificada como el unportador mitocondrial de Ca^{2+} debe tener la capacidad de unir a este ión con una afinidad semejante. Se midió la unión de Ca^{2+} en las diferentes fracciones obtenidas en presencia de 5 μ M de Ca^{2+} . Las fracciones F90 y rCa presentaron los valores más altos de unión de Ca^{2+} (tabla 9).

Tabla 9. Unión de Ca^{2+} a las diferentes fracciones proteicas^a

Extracto	Ca^{2+} pegado (nmol/mg)
MTC	0.21
PSM	0.39
F50	0.39
F90	29.60
rCA	36.70

^aLa mezcla de reacción contenía Tris 10 mM pH 7.0, extracto protéico (1 mg/ml) y 5 μM de ^{45}Ca . El Ca^{2+} pegado fue evaluado después de una cromatografía en Sephadex G-50. Los valores representan un experimento representativo.

Se calculó una constante de disociación aparente de 8 μM para el complejo fracción glicoproteica rCA- Ca^{2+} (figura 15). La unión de Ca^{2+} es parcialmente prevenida por la desnaturalización protéica y por la presencia de Mg^{2+} en el medio, sin embargo, el rojo de rutenio no afectó las propiedades de unión de Ca^{2+} de las diferentes fracciones.

Estos avasgos contrastan con las propiedades de unión de Ca^{2+} encontradas para la glicoproteína aislada por Sottocasa (1971) y Lehninger (1971), y por otro lado apoyan la idea de que el sitio de unión de Ca^{2+} es independiente del sitio de unión de rojo de rutenio dentro del uniportador de Ca^{2+} como fue sugerido por Reed y Bygrave (1974).

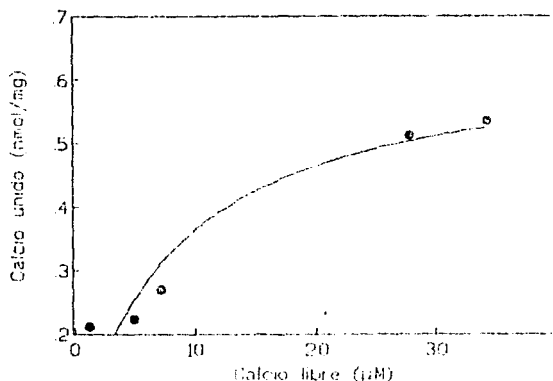


Figura 15. Unión de Ca^{2+} a la glicoproteína rCA con respecto a la concentración de Ca^{2+} . La mezcla de reacción contenía Tris 10 mM pH 7.6, extracto proteico rCA (1 mg/ml) y las concentraciones indicadas de ^{45}Ca . El Ca^{2+} pegado fue evaluado después de una cromatografía en Sephadex G-50. Los valores representan un experimento representativo.

La unión de Ca^{2+} puede deberse a la unión del ión a fosfolípidos. Tyson y cols. (1976) reportaron que ciertos fosfolípidos son capaces de unir y transportar cationes a través de una fase lipídica. La cardiolipina y el ácido fosfatídico (que pueden encontrarse en la membrana interna mitocondrial) tienen actividad ionofórica similar a ionóforos como el X537A. Dichos fosfolípidos transportan cationes divalentes en un proceso que es inhibido por rojo de ruteno. Así que hay que diferenciar este proceso del transporte a través de la proteína del uniportador, y esto puede realizarse ya que el transporte inducido por fosfolípidos no es dependiente del pH entre pH 5.4 a 8.3.

Discussion

Preparaciones mitocondriales con características marcadamente diferentes han sido asociadas al uniportador de Ca^{2+} (tabla 2). La dificultad de asociar una fracción proteica con el uniportador radica en parte, en que existe una amplia variación en los datos cinéticos obtenidos para dicho acarreador (tabla 10).

Tabla 10. Constantes cinéticas del proceso de transporte de Ca^{2+} en mitocondrias completas reportadas por diversos autores.

Parametro	Valor	Referencia
Capacidad Maxima	3 $\mu\text{mol Ca}^{2+}/\text{mg}$	Scarpa y Azzone, 1970
$K_{0.5}$	1-189 μM	Åkerman, 1977b; Crompton y cols, 1976; Hutson, 1977; Pfeiffer y cols., 1976; Vinogradov y Scarpa, 1973
V_{max}	400-1200 nmol $\text{Ca}^{2+}/\text{min mg}$	Bragadin y cols., 1979; Hutson y cols., 1976; Vinogradov y cols., 1972; McMillin-Wood y cols., 1980; Vercesi y cols., 1978
Coefficiente de Hill	1.7-2	Bragadin y cols, 1979; Bygrave y cols., 1971; Heaton y Nicholls, 1976; Hutson y cols., 1976; Reed y Bygrave, 1975; Scarpa y Graziotti, 1973; Vinogradov y Scarpa, 1973
Inhibición por rojo de rutenio	$K_i = 30 \text{ nM}$	Reed y Bygrave, 1974
Inhibición por espermina	$K_{0.5} = 180 \mu\text{M}$	Lenzen y cols., 1992
Activación por espermina	$K_{0.5} = 50 \mu\text{M}$	Lenzen y cols., 1992

Esta variación refleja la diferente actividad del sistema uniportador en respuesta a condiciones experimentales diversas, así como el control cinético ejercido por los sistemas de flujo de Ca^{2+} , i.e. el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ y el

intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$. Además de que los parámetros reportados son de difícil interpretación debido a la dependencia del transporte de Ca^{2+} en el potencial eléctrico transmembranal.

Por otro lado, no se ha descartado la posibilidad de que exista más de un sistema de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria, a través de varias proteínas con esta única función, o por medio de proteínas cuya principal función no es el transporte de cationes. Una evidencia que apoya esta idea fue obtenida por Fry Green (1979) para la subunidad I de la citocromo c oxidasa.

Ninguna de las fracciones aisladas hasta la fecha puede identificarse inequívocamente con el uniportador mitocondrial de Ca^{2+} ; y las razones para esto pueden sintetizarse en 4 principalmente:

1. Algunos ensayos empleados para evaluar el transporte de Ca^{2+} no miden directamente el movimiento del catión. Los ensayos de hinchamiento mitocondrial utilizados por Blondin (1974) son un ejemplo, ya que son más sensibles a cambios en la concentración de Mg^{2+} que a la de Ca^{2+} . Los ensayos de liberación de glicoproteína utilizados por Prestipino y cols. (1974) tampoco responden directamente a movimientos de Ca^{2+} sino probablemente a la unión de la glicoproteína a la superficie de la membrana.
2. Ciertas fracciones aisladas representan el 1% o más de la proteína mitocondrial (Gómez-Puyou y cols., 1972; Sottocasa y cols., 1972) lo cual contrasta con el número de acarreadores calculado por Reed y Bygrave (1974), 0.001 nmol/mg de proteína mitocondrial.
3. Se ha demostrado la identidad de ciertas preparaciones con contaminantes extracelulares (Mironova y cols., 1993).
4. La mayoría de las fracciones asociadas al uniportador no presentan las dos características principales de éste, es decir, sensibilidad al rojo de rutenio y dependencia en un potencial transmembranal (Sottocasa y cols., 1972; Sokolove y Brenza, 1983; Mironova y cols., 1982; 1993).

Entre los componentes que han sido asociados con el uniportador se encuentran tanto proteínas solubles como insolubles; además de proteínas que cambian sus propiedades hidrofóbicas o hidrofílicas bajo diferentes tratamientos (Gómez-Puyou y cols., 1972; Sottocasa y cols, 1972), como la fracción F90, aislada en este trabajo, que se torna insoluble después de separar la sal de sulfato de amonio por medio del proceso de diálisis.

Una disminución de la solubilidad de estas fracciones, en presencia de sales o Ca^{2+} , puede estar relacionada con la asociación de las proteínas a la membrana mitocondrial. Lo anterior fue sugerido por Prestipino y cols. (1974), quienes estudiaron las propiedades de la glicoproteína aislada por Carafoli y Sottocasa (1974). Una tercera parte de dicha glicoproteína pudo ser aislada por choque osmótico, mientras que las dos terceras partes restantes requerían de agentes caotrópicos como iodosalicilato para ser extraídas. La glicoproteína es extremadamente ácida, ya que se compone de ácido aspártico y ácido glutámico en una tercera parte.

Prestipino (1974) proponía que el Ca^{2+} sirve como un puente entre las cargas negativas de la glicoproteína y las cargas de los fosfolípidos. De esta manera, la glicoproteína puede asociarse a la membrana y liberar el catión del otro lado de ésta.

La fracción glicoprotéica rCA aislada en este trabajo no parece necesitar de la presencia de Ca^{2+} para asociarse a una membrana, ya que más de un 80% de la muestra utilizada en los ensayos de reconstitución se asoció a los liposomas de lecitina.

La captación de Ca^{2+} en mitocondrias completas es un proceso probablemente asociado con un ionóforo móvil, por su velocidad y especificidad. Los ionóforos en general se componen de un exterior hidrofóbico y un interior hidrofílico en donde el ión, en este caso el Ca^{2+} , puede acomplejarse con grupos cargados negativamente como carboxilos o hidroxilos.

Un ionóforo electroforético es capaz de responder a un potencial transmembranal, además, aniones lipofílicos pueden aislar al complejo ionóforo-catión de la membrana. En el caso de la proteína aislada por Jeng y

Shamoo (1980) la "calciporina", ésta no es afectada por iones lipofílicos, lo que indica que el complejo catión-ionóforo no es neutro, o que el transporte es debido a los lípidos contaminantes, esta última idea fue corroborada por Sokolove y Brenza (1983). Además, para ser identificado como el uniportador de Ca^{2+} un ionóforo debe responder a un potencial transmembranal, parámetro que no ha sido demostrado para la mayoría de las preparaciones asociadas con el uniportador (tabla 2).

Por otro lado los ensayos de transporte de Ca^{2+} utilizados por diversos autores difiere grandemente. Mironova y cols. (1982; 1993; 1994) utilizaron el sistema de bicapas lipídicas, sin embargo no se hicieron controles con otra proteína no relacionada, por lo que no puede concluirse que sólo esta preparación es capaz de inducir cambios en la conductividad al Ca^{2+} en este sistema. La cantidad de proteína, así como la concentración de Ca^{2+} que utilizaron estos autores fue extremadamente alta (en el intervalo milimolar), lo que puede llevar a obtener resultados artificiales.

El ensayo de transporte de Ca^{2+} utilizando ^{45}Ca tiene la ventaja de tener una selectividad absoluta por el isótopo. Con este método se mide la marca total en una fracción de la muestra, ya sea un precipitado o un sobrenadante, pero no se puede distinguir entre el transporte de Ca^{2+} y la unión del ión a la superficie de liposoma u otros componentes del medio.

Los experimentos son largos, y las preparaciones pueden deteriorarse. Además, las concentraciones de Ca^{2+} que se requiere utilizar son también altas (en el intervalo milimolar). Si se desea utilizar concentraciones de Ca^{2+} menores a $5 \mu\text{M}$ debe utilizarse un sistema combinado de amortiguadores Ca/EGTA y cuencheo con rojo de rutenio o EGTA.

A concentraciones mayores a $5\text{-}10 \mu\text{M}$ el transporte de Ca^{2+} es tan rápido -al menos en mitocondrias-, que no se puede implementar exitosamente el sistema de cuencheo, y se mide únicamente la concentración de Ca^{2+} en el equilibrio, cuando se ha equilibrado ésta de uno y otro lado de la membrana, es decir, no se pueden determinar velocidades iniciales de transporte

El ensayo de transporte de Ca^{2+} utilizado por Zazueta y cols. (1991; 1994), en vesículas lipídicas con citocromo c oxidasa incorporada, presenta las siguientes desventajas:

-Se tienen que reconstituir cientos de μg de muestra para evaluar el transporte.

-Se tienen que utilizar concentraciones de Ca^{2+} en el intervalo mM, con lo que tiene que producirse una diferencia de concentración de Ca^{2+} muy grande entre uno y otro lado de la membrana, para detectar el transporte.

-No se pueden detectar velocidades iniciales de transporte, lo que impide que se realicen estudios cinéticos.

Sin embargo, la preparación de Zazueta y cols. (1994), es la preparación que más probablemente contiene a los componentes del sistema uniportador de Ca^{2+} , ya que se demostró convincentemente que transporta Ca^{2+} de una manera dependiente en un potencial transmembranal y sensible a rojo de rutenio.

En este trabajo se utilizaron amortiguadores Ca/EGTA, para reducir la concentración de Ca^{2+} a la que son expuestos los liposomas. El uso de este tipo de amortiguadores se ha hecho cada vez más común en los estudios bioquímicos con mitocondrias, ya que la fracción del Ca^{2+} que interactúa con los sistemas enzimáticos es la fracción ionizada o libre. La concentración de Ca^{2+} libre en el citosol se encuentra en el intervalo submitocondrial (Hansford, 1985; McCormack y cols, 1990); y la manera de manipular esta fracción del Ca^{2+} incluye el empleo de quelantes de Ca^{2+} , que sirven como amortiguadores del catión entre 50-1000 nM de Ca^{2+} libre. Entre los quelantes más utilizados se encuentran el EGTA, el HEDTA y el NTA(ácido nitriloacético). Estos quelantes permiten la manipulación de concentraciones de Ca^{2+} en el intervalo submicromolar, en presencia de concentraciones milimolares de Mg^{2+} .

El uso combinado de amortiguadores Ca/quelante, con indicadores fluorescentes para Ca^{2+} permite la determinación cuantitativa de la concentración de Ca^{2+} libre. En este trabajo se evaluó el transporte de Ca^{2+} en

vesículas lipídicas con Fura 2 en el interior. Este sistema presenta las siguientes ventajas:

- Debido a la sensibilidad del indicador fluorescente pueden utilizarse concentraciones de Ca^{2+} en el intervalo nanomolar, lo que, aunado al uso de amortiguadores Ca/EGTA permite una adecuada manipulación de las concentraciones libres de Ca^{2+} .

- Se requiere de poca proteína para ser reconstituida en los liposomas.

- Pueden estimarse velocidades iniciales de transporte, así como la dependencia en un potencial transmembranal.

- Se obtuvieron vesículas de gran tamaño (en el orden de $1\mu\text{l}/\text{mg}$ de fosfolípido), lo que representa una ventaja para la incorporación de proteínas y para medir el transporte de Ca^{2+} .

Por otro lado, a pesar de que el volumen de la vesícula es grande, resulta difícil evaluar la inhibición por otros cationes ya que interfieren con la fluorescencia del indicador.

La glicoproteína aislada en este trabajo forma parte de la fracción aislada por Zazueta y cols. (1994), a pesar de no contener exactamente las mismas proteínas. Anticuerpos preparados contra dos de las proteínas en la fracción de Zazueta y cols. (1994) inhiben el transporte de Ca^{2+} en mitocondrias y mitoplastos (Zazueta y cols., 1994), pero estas dos proteínas no han sido reconstituidas todavía en liposomas.

La preparación glicoproteica obtenida en este trabajo si fue incorporada a vesículas lipídicas y se encontró que transporta Ca^{2+} de una manera dependiente del potencial transmembranal e inhibido por rojo de rutenio. La velocidad de transporte de Ca^{2+} se incrementa unas 10 veces con respecto a la fracción F90; y hay que hacer notar que esta preparación consta de una banda

de 40 kDa y 3 bandas menores, y que probablemente alguna de éstas corresponda al péptido de 20 kDa descrito por Zazueta y cols. (1994).

La glicoproteína rCA tiene un tamaño similar a las glicoproteínas purificadas por Sottocasa y cols. (1974) y Mironova y cols. (1982), sin embargo, su composición aminoácida y de carbohidratos difiere considerablemente de dichas preparaciones. Por tanto no puede ser identificada como alguna de éstas.

No se excluye, la posibilidad de que nuestra preparación contenga algún contaminante citoplásmico, para lo cual hubiera sido conveniente medir enzimas marcadoras mitocondriales en las preparaciones obtenidas. A este respecto, la preparación de Mironova y cols. (1993), fue considerada como un contaminante extramitocondrial ya que su extremo amino terminal coincide con la proteína orosomucoide citoplásmica. Sin embargo, la glicoproteína de Mironova (1993) no puede ser identificada inequívocamente con la proteína orosomucoide ya que, anticuerpos dirigidos contra la proteína citoplásmica no inhiben el transporte de Ca^{2+} en mitocondrias ni en mitoplastos, y, anticuerpos dirigidos contra la glicoproteína no reaccionan con la orosomucoide, lo que indica que son dos proteínas diferentes.

Mironova y cols. (1993), sugieren que el uniportador forma un complejo glicoproteína-péptido en el que pequeños péptidos se asocian para formar un canal acuoso a que atraviesa la membrana; y una fracción glicoprotéica que cumple funciones de reconocimiento para Ca^{2+} (Mironova, 1993), y de regulación del transporte de Ca^{2+} por cationes divalentes y poliaminas (Mironova, 1994). El péptido formador de canales aislado por Mironova y cols. (1993) funcionaría como un canal de transporte rápido para Ca^{2+} , en vez de ser una molécula similar a un ionoforo móvil, como fue sugerido por varios autores (Sottocasa, 1971; Blondin, 1974; Jeng y Shamo, 1980).

La glicoproteína aislada en este trabajo presenta características cinéticas similares a las asociadas al transporte de Ca^{2+} en la mitocondria entera. Sin embargo, la participación de los componentes de bajo peso molecular no puede ser excluida, a pesar de que sólo representan el 20% de la preparación. Es posible que, como ha sido sugerido por Prestipino (1974) y por Mironova (1993), la glicoproteína sirva como sitio de reconocimiento para el Ca^{2+} , y que los

componentes de bajo peso molecular forman el canal de paso de cationes a través de la membrana. Nuestra preparación en forma nativa puede constituir un complejo de varias subunidades con estas funciones. Esta última idea tendría que ser evaluada separando dichos componentes y reconstituyéndolos a liposomas independientemente.

Otros componentes mitocondriales glicosilados han sido aislados y se ha encontrado que unen Ca^{2+} . Tashmukhamedow y cols. (1972) reportó el aislamiento de una glicoproteína de mitocondria de hígado de rata capaz de captar Ca^{2+} con alta afinidad. Kitaura et al. (1973) describió el aislamiento de un glicoproteína de mitocondrias de corteza adrenal, ésta tiene menor afinidad por Ca^{2+} que la glicoproteína aislada por Tashmukhamedow y cols. (1972). Por otro lado Carafoli y Sotocasa (1974), purificaron una glicoproteína de 33 kDa localizada tanto en la membrana interna como en el espacio intermembranal, esta glicoproteína es altamente ácida y representa aproximadamente el 1% de la proteína mitocondrial. Se encontró además que su capacidad para unir Ca^{2+} depende de la presencia de ácido sulfónico en la molécula, pero este componente fue incapaz de mediar el transporte de Ca^{2+} . Se sugirió entonces que el Ca^{2+} es importante para la asociación de dicha proteína a la membrana.

Se evidenció en este trabajo que el rojo de ruténio no es un buen marcador de componentes glicosilados, sin embargo, recientemente se mostró que el inhibidor más efectivo del transporte de Ca^{2+} es un contaminante dianélico del rojo de ruténio (Ying et al., 1991), y se ha sugerido que se podría purificar el transportador utilizando este compuesto en una técnica cromatográfica.

El análisis de carbohidratos llevado a cabo para la glicoproteína aislada en este trabajo asegura que la fracción glicosídica se encuentra unida a la proteína de forma covalente, a diferencia de la glicoproteína aislada por Bonfili y cols. (1976; 1983).

La presencia de otras glicoproteínas en los compartimentos mitocondriales evidenciada en este trabajo ha sido reportada previamente (De Bernard y cols., 1971). La mitocondria es capaz de sintetizar glicoproteínas (Bossmann and Martin, 1969), así como N-glicoconjugados, por la vía del dilitopirofosfato (Levi et al.,

1989), además de ser capaz de transferir estructuras glicosídicas de nucleótidos, directamente a aceptores proteicos (Levrat et al., 1990).

Los resultados presentados aquí indican que la preparación glicoproteica rCA presenta las principales características del sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial, y que contiene al menos un componente glicosilado y algunos componentes minoritarios.

El contenido de carbohidratos de la fracción rCA es menor al 10%, y su participación en el proceso de transporte de Ca^{2+} debe ser evaluada removiendola con enzimas específicas como la endoglicosidasa H. La regulación de la actividad de la fracción glicoproteica rCA por espermina está también en el orden de lo reportado para mitocondrias completas. Por último, esta preparación no puede ser identificada con la glicoproteína preparada por Sottocasa y cols. (1972) o con la obtenida por Mironova y cols. (1982), ya que difiere en composición de aminoácidos, así como en polaridad.

Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se purificó una fracción glicoproteica (rCA) con un componente predominante de 36 kDa, a partir de un extracto de proteínas membranales mitocondriales. La fracción está probablemente asociada al sistema de captación de Ca^{2+} en la membrana interna de la mitocondria, ya que las constantes cinéticas obtenidas al reconstituir la fracción en liposomas con Fura-2 en el interior coinciden con lo reportado para mitocondrias completas. El sistema utilizado para evaluar el transporte de Ca^{2+} de este extracto permitió la detección de pequeños movimientos del ión devidos a la mínima cantidad obtenida de la fracción rCA.

No puede atribuirse con toda certeza que el componente de 36 kDa sea el único responsable del transporte de Ca^{2+} en las vesículas ya que existen componentes minoritarios en la preparación, los cuales pueden separarse si se aíslan cantidades mayores de la fracción rCa, y se somete a separación por intercambio iónico. Se ha caracterizado la fracción glicosídica de la preparación rCA, y puede estudiarse su participación en el proceso de transporte haciendo ensayos en los que se remuevan los grupos carbohidratos mediante enzimas específicas como la endoglicosidasa H.

Nuestra preparación no puede identificarse como alguna otra de las preparaciones obtenidas por otros autores, ya que tiene propiedades químicas y cinéticas diferentes. Sin embargo, no se hicieron controles muy estrictos para eliminar la posibilidad de que nuestra preparación sea un contaminante citoplásmico, y por tanto es importante que tras la secuenciación de la proteína de 36 kDa, ésta se compare con proteínas citoplásmicas conocidas. La secuenciación además permitirá estudios estructurales más extensos que lleven a una mejor explicación del proceso de transporte de Ca^{2+} mediado por esta fracción. Por último, otro componente del sistema uniportador de Ca^{2+} pudo quedarse en la fracción que no es retenida en la columna de concanavalina A, por lo que esta posibilidad debe ser explorada.

Bibliografía

- Abramson M. B., Katzman R., Gregor H. P. (1964) "Aqueous dispersions of phosphatidylserine" J. Biol. Chem. 239, 70
- Åkerman K. E. O. (1977) "Effect of cations on the temperature sensitivity of Ca^{2+} transport in rat-liver mitochondria" J. Bioenerg. Biomembr. 9, 141-149
- Åkerman K. E. O. (1977b) "Effect of Mg^{2+} and spermine on the kinetics of Ca^{2+} transport in rat-liver mitochondria" J. Bioenerg. Biomembr. 9, 65-72
- Åkerman K. E. O. (1978) "Charge transfer during valinomycin-induced Ca^{2+} uptake in rat liver mitochondria" FEBS Lett. 93, 293-296
- Åkerman K. E. O., Saris N. E. L. y Jarvisalo J. O. (1974) "Mitochondrial high affinity binding sites for Ca. Fact or Artefact?" Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 801
- Allshire A. y Saris N. E. L. (1986). En: "Manganese in Metabolism and Enzyme Function" (Schramm J. L. y Wedler F. C. eds.), Academic Press, New York, pp. 51-63
- Allshire A., Bernardi P. y Saris N.-E. L. (1985) "Manganese stimulates Ca^{2+} flux through the mitochondrial uniporter" Biochim. Biophys. Acta 807, 202-209
- Azzone G. F., Bragadin, M., Pozzan, T. y Dell'Antone P. (1976) "Proton electrochemical potential in steady state rat liver mitochondria" Biochim. Biophys. Acta 459, 96-109
- Blackshear P. J., Naim A. C. y Kuo J. F. (1988) "Protein kinases 1988: a current perspective" FASEB J. 2, 2957-2969
- Blondin G. (1974) "Isolation of a divalent cation ionophore from beef heart mitochondria" Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 97-105
- Bondareff W. (1970) J. Neurosurgery 32, 145
- Bosmann H. B. y Martin S. S. (1969) "Mitochondrial autonomy: Incorporation of monosaccharides into glycoprotein by isolated mitochondria" Science 164, 190-192
- Bragadin M., Pozzan T. y Azzone G. F. (1979) "Kinetics of Ca^{2+} Carrier in rat liver mitochondria" Biochem. 18, 5972-5978
- Brand M. D. y Murphy M. P. (1987) "Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells" Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 62, 141-193
- Brand M. D., Reynafarje B. y Lehninger A. L. (1976) "Reevaluation of the H⁺/site ratio of mitochondrial electron transport with the oxygen pulse technique" J. Biol. Chem. 251, 5670-5679
- Brierley G. P., Murer E. y Bachman E. (1964) "The accumulation of Ca and Pi by heart mitochondria" Arch. Biochem. Biophys. 105, 89
- Brierley G. P., Davis M. y Jung D. W. (1987) "Respiration-dependent uptake and extrusion of Mg^{2+} by isolated heart mitochondria" Arch. Biochem. Biophys. 253, 322-332
- Brunngraber E. G. y Brown B. D. (1963) "Preparation of sialomucopolysaccharides from brain mitochondrial fractions" Biochim. Biophys. Acta 69, 581
- Bygrave F. L. (1977) "Mitochondrial calcium transport" Curr. Top. Bioenerg. 6, 259-318
- Bygrave F. L., Reed K. C. y Spencer T. (1971) "Cooperative interactions in energy-dependent accumulation of Ca^{2+} by isolated rat liver mitochondria" Nature New Biol. 230, 89-91
- Bygrave F. L. y Ash G. R. (1977) "Development of mitochondrial calcium transport activity in rat liver" FEBS Lett. 80, 271-274

- Capaldi R. A. y Vanderkooi G. (1972) "The low polarity of many membrane proteins" Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 930-932
- Carafoli E. y Sottocasa G. (1974) En: "Dynamics of Energy-Transducing Membranes" Ernster L. Estabrook y Slater E. C. eds. Amsterdam: Elsevier, pp. 455-469
- Carafoli E., Gazzotti P., Saltini C., Rossi C. S., Sottocasa G. L., Sandri G., Panfilii E. y de Bernard B. (1993) En: "Mechanisms in Bioenergetics" Azzone G. F., Ernster L., Papa S., Quagliariello E. y Siliprandi N. eds. p. 293 Academic Press, New York.
- Carafoli E., Gazzotti P., Vasington F.D., Sottocasa G. L., Sandri G., Panfilii E. y de Bernard B. (1972) En: "Biochemistry and Biophysics of Mitochondrial Membranes" Azzone G. F., Carafoli E., Lehninger A. L., Quagliariello E. y Siliprandi N. eds. p. 623, Academic Press, New York.
- Chance B. (1965) "The energy-linked reaction of calcium with mitochondria" J. Biol. Chem. 240, 2729-2748
- Chappell J. B. Cohn M. y Greville G. D. (1963) En: "Energy Linked Functions of Mitochondria", editada por B. Chance. New York, Academic Press pp. 219-231
- Charuk J. H. M., Pirraglia C. A. y Reitlmeir R. A. F. (1990) "Interaction of ruthenium red with Ca²⁺-binding proteins" Anal. Biochem. 128-131
- Chávez E., Briones R., Michel B., Bravo C. y Jay D. (1985) "Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium transport. Studies with cadmium" Arch. Biochem. Biophys. 242, 493-497
- Cooper R. H., Randle P. J. y Denton R. M. (1974) "Regulation of heart muscle pyruvate dehydrogenase kinase" Biochem. J. 143, 625
- Crompton M. y Heid I. (1978) "The cycling of calcium, sodium and protons across the inner membrane of cardiac mitochondria" Eur. J. Biochem. 91, 599-608
- Crompton M., Sigel E., Sakmann M. y Carafoli E. (1976) "A kinetic study of the energy-linked influx of Ca²⁺ into heart mitochondria" Eur. J. Biochem. 69, 429-434
- Davidoff F. (1974) "Effects of guanidine derivatives on mitochondrial function: Ca²⁺ uptake and release" J. Biol. Chem. 249, 6406-6415
- de Bernard B., Pugliarello M.C., Sandri G., Sottocasa G.L. y Vittur F. (1971) "Glycoprotein components, sialic acid and hexosamines, bound to inner and outer mitochondrial membranes" FEBS Lett. 12, 125-128
- Denton R. M. y McCormack J. G. (1980) "On the role of calcium transport system in heart and other mammalian mitochondria" FEBS Lett. 119, 1-8
- Denton R. M. y McCormack J. G. (1985) "Calcium transport in mammalian mitochondria and its role in hormone action" Am. J. Physiol. 249, E543-E554
- Diwan J. J. (1987) "Mitochondrial transport of K⁺ and Mg²⁺" Biochim. Biophys. Acta 895, 155-165
- Dolgachova L.P. y Scarga Y.Y. (1984) En: "Proceedings of the Symposium on the Metabolic regulation of the Physiological State" Russian Academy of Sciences, Pushchino p. 55
- Drahota Z. Gazzotti P., Carafoli E. y Rossi C. S. (1969) "A comparison of the effects of different divalent cations on a number of mitochondrial reactions linked to ion translocation" Arch. Biochem. Biophys. 130, 267-273
- Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K. y Smith F. (1956) Anal. Chem. 28, 350-

- Dussiere J, Ligeti E., Brandolin B. y Vignais P.V. (1984) "Ca²⁺ transport in mitochondria" Biochim. Biophys. Acta 766, 492-500
- Ezawa I y Ogata E. (1979) "Ca-induced activation of succinate dehydrogenase and the regulation of mitochondrial oxidative reactions" J. Biochem. 85, 65
- Farber J. L. (1981) "The role of calcium in cell death" Life Sci. 29, 1289-1295
- Farber J. L. (1982) "Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis" Lab. Invest. 47, 114-123
- Farber J. L. (1990) "Ca²⁺ transport in mitochondria" Chem. Res. Toxicol. 3, 503-508
- Fiskum G., Reynafarje B. y Lehninger A. L. (1979) "The electric charge stoichiometry of respiration-dependent Ca²⁺ uptake by mitochondria" J. Biol. Chem. 254, 6288-6295
- Foldes M. y Barritt G. J. (1977) "Regulation by Ca ions of pyruvate carboxylation, pyruvate transport and adenine nucleotide transport in RLM" J. Biol. Chem. 252, 5372
- Fry M. y Green D. E. (1979) "Ion-channel component of cytochrome oxidase" Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 2664-2668
- Gamba M. (1974) "Effect of diuretics on ion transport of kidney cortex mitochondria. II Mode of action of ethacrynic acid on mitochondrial calcium pump" Jpn. J. Pharmacol. 24, 271-277
- Gitler C. y Motal M. (1972) "Formation of decane-soluble proteolipids: Influence of monovalent and divalent cations" FEBS Lett. 28, 329-332
- Gómez-Puyou A., Tuena de Gómez-Puyou M., Becker G. y Lehninger A. (1972) "An insoluble Ca²⁺-binding factor from rat liver mitochondria" Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 814-819
- Gornall A. G., Bardawill C. J. y David M. M. (1949) "Determination of serum proteins by means of the biuret reaction" J. Biol. Chem. 177, 751-766
- Grynkievich G., Poenie T. J. y Tsien R. Y. (1985) J. Biol. Chem. 260, 3440-3450
- Gunter T. E. y Pfeiffer D. R. (1990) "Mechanisms by which mitochondria transport calcium" Am. J. Physiol. 258, C755-C786
- Gunter T. E., Gunter K. K., Puskin J. S. y Russell, P. R. (1978) "Efflux of Ca²⁺ and Mn²⁺ from rat liver mitochondria" J. Biol. Chem. 253, 339-345
- Gustafson G. T. y Pihl E. (1969) Acta Path. Microb. Scand. 68, 389-393
- Hansford R. G. (1985) "Relation between mitochondrial calcium transport and control of energy metabolism" Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 102, 1-72
- Happel R. D y Krall A. R. (1979) "Partial reconstitution of calcium uptake with soluble calcium-binding glycoprotein in rat liver mitochondria" Biochem. Soc. Trans. 7, 1311-1312
- Heaton G. M y Nicholls D. G. (1976) "The calcium conductance of the inner membrane of rat liver mitochondria and the determination of the calcium electrochemical gradient" Biochem. J. 156, 635-646
- Hendrickson H. S. y Fullington J. G. (1965) "Stabilities of metal complexes of phospholipids. Ca(II), Mg(II), and Ni(II) complexes of phosphatidylserine and triphosphoinositide" Biochem. 4, 1509
- Hertzler H. y Racker E. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1320-1321
- Hoek J. B. (1992) "Hormonal regulation of cellular energy metabolism" en Molecular mechanisms in Bioenergetics. L. Ernster, Ed. Elsevier, Cap 10

- Hanson S. M. (1977) "Steady state kinetics of the energy-dependent Ca^{2+} uptake in rat liver mitochondria" *J. Biol. Chem.* 252, 4537-4545
- Hanson S. M., Pfeiffer D. R. y Lacin H. A. (1976) "Effect of cations and anions on the steady state kinetics of energy-dependent Ca^{2+} transport in rat liver mitochondria" *J. Biol. Chem.* 251, 5251-5258
- Igbavboa U. y Pfeiffer D. R. (1988) "EGTA inhibits reverse uniporter-dependent Ca^{2+} release from uncoupled mitochondria. Possible regulation of the Ca^{2+} uniporter by Ca^{2+} binding site on the cytoplasmic side of the inner membrane" *J. Biol. Chem.* 263, 1405-1412
- Jacobus W. E., Moreadith R. W. y VanLigier K. M. (1982) "..." *J. Biol. Chem.* 257, 2397-2402
- Jeng A. Y. y Shamoo A. E. (1989) "Isolation of a Ca^{2+} carrier from calf heart inner mitochondrial membrane" *J. Biol. Chem.* 264, 6897-6903
- Jeng A. Y. y Shamoo A. E. (1989b) "Electrophoretic properties of Ca^{2+} carrier isolated from calf heart inner mitochondrial membrane" *J. Biol. Chem.* 264, 6897-6902
- Jeng A. Y., Ryan T. E. y Shamoo A. E. (1978) "Isolation of a low molecular weight Ca^{2+} carrier from calf heart inner mitochondrial membrane" *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 2125-2129
- Kao J. P. Y., Harootyan A. T. y Eisen R. Y. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 9179-9183
- Kaplan R. S. y Pedersen P. L. (1985) "Determination of microgram quantities of protein in the presence of milligram levels of lipid with amido Black 10B" *Anal. Biochem.* 150, 97-104
- Kapoor S. C., van Rossum G. D. V., O'Neill K. J. y Mercolella J. (1985) "Uptake of inorganic lead in vivo by isolated mitochondria and tissue slices of rat renal cortex" *Biochem. Pharmacol.* 34, 1439-1448
- Konishi M.A., Olson A., Hollingsworth S. y Baylor S. M. (1998) *Biophys. J.* 54, 1089-1104
- Kotlyar A. B., Sled U. D. y Vinogradov A. D. (1992) "..." *Biochim. Biophys. Acta* 1098, 144-150
- Kröner H. (1986) " Ca^{2+} ions: an allosteric activator of Ca^{2+} uptake in rat liver mitochondria" *Arch. Biochem. Biophys.* 251, 525-535
- Kröner H. (1988) "Spermine, another specific allosteric activator of calcium uptake in rat liver mitochondria" *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 205-210
- Kun E. (1976) "Kinetics of ATP-dependent Mg^{2+} flux in mitochondria" *Biochem.* 15, 2328-2336
- LaNoue K. F. y Schoolwerth A. C. (1979) "Metabolite transport in mitochondria" *Annu. Rev. Biochem.* 48, 871-922
- Lee C. P. y Ernster L. (1967) "Energy-coupling in nonphosphorylating submitochondrial particles" *Methods in Enzymology* 10, 543-548
- Lehninger A. (1971) "A soluble, heat-labile, high affinity Ca^{2+} -binding protein extracted from rat liver mitochondria" *Biochem. Res. Commun.* 42, 312-317
- Lehninger A. L., Carafoli F. y Rossi C. S. (1967) "Energy-linked ion movements in mitochondrial systems" *Adv. Enzymol.* 29, 259-329
- Leikin Y. N. y Consalves M. M. P. (1986) "Extramitochondrial control of the activity of the Ca^{2+} -transporting system of the mitochondria" *Dok. Akad. Nauk SSSR* 299, 1011-1014

- Lenzen S., Münster W. y Rustenbeck I. (1992) "Dual effect of spermine on mitochondrial Ca^{2+} transport" *Biochem. J.* 286, 597-602
- Levrat C., Ardail D. y Louisot P. (1990) *Biochem. Int.* 20, 1-11
- Levrat C., Ardail D., Morelis R. y Louisot P. (1989) "Study of n-glycoprotein biosynthesis through the diacolic intermediates in the mitochondrial membrane" *Int. J. Biochem.* 21, 265-278
- Low H. y Vainin J. (1963) "Akinetic study of energy-linked influx of Ca^{2+} into heart mitochondria" *Biochim. Biophys. Acta* 69, 361-364
- Luft J.H. (1965) *J. Cell. Biol.* 27, 61A-
- Luft J.H. (1971) "Ruthenium red and violet. J. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action" *Anat.Rec.* 171, 347-368
- Marban E, Rink T. J. (1980) "..." *Nature* 286, 845-850
- Marchesi V. T. y Andrews F. P. (1971) "Glycoproteins: isolation from cell membrane with nitium diiodosulfate" *Science* 174, 1247
- McCormack J. G., Halstrap A. P., Denton R. M. (1990) "..." *Physiol. Rev.* 70, 391-425
- McMillin-Wood J., Wolkowicz P. E., Chu A., Tate C. A., Goldstone M. A. y Entman M. L. (1980) "Calcium uptake by two preparations of mitochondria from heart" *Biochim. Biophys. Acta* 591, 251-265
- Meijer A. J., Van Woerkom G. M., Steinman R. y Williamson J. R. (1981) "Inhibition by Ca of carbamylphosphate synthetase" *J. Biol. Chem.* 256, 3443
- Mela L. (1969) "Inhibition and activation of calcium transport in mitochondria. Effect of lanthanides and local anesthetic drugs" *Biochem* 8, 2481-2486
- Mironova G. D., Baumann M., Kolomytkin O., Krasichkova Z., Berdimuratov A., Sirota T., Virtanen I. y Saris N. E. (1994) "Purification of the channel component of the mitochondrial calcium uniporter and its reconstitution into planar lipid bilayers" *J. Bioener. Biomembr.* 26, 231-238
- Mironova G. D., Sirota T. V., Pronevich I. A., Trofimenki N. V., Mironov G. P., Grigorejev P. A. y Kondashova M. N. (1982) "Isolation and properties of Ca^{2+} -transporting glycoprotein and peptide from beef heart mitochondria" *J. Bioener. Biomembr.* 14, 213-225
- Montreuil J., Bouquelet S., Delbray H., Fournet B., Spik G. y Strecker G. (1986) En: "Carbohydrate Analysis, A practical Approach" (Chaplin M.F., Kennedy J.F., eds) pp. 143-204 Oxford: IRI Press
- Moore C. L. (1971) "Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by ruthenium red" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 298-305
- Moreno-Sánchez R. y Hansford R. G. (1988) "
- Moreno-Sánchez R., Torres-Márquez M.F. y López-Gómez F.J. (1993) "La determinación de la concentración de calcio libre en célula, y mitocondrias con indicadores fluorescentes" *Ciencia* 44, 383-396
- Moyle J. y Mitchell P. (1977) "Electric charge stoichiometry of calcium translocation in rat liver mitochondria" *FEBS Lett.* 75, 131-136
- Murphy A. N., Kelleher J. K. y Eskum G. (1990) "..." *J. Biol. Chem.* 265, 10527-10534
- Nicheitta C. V. y Williamson J. R. (1984) "Spermine, a regulator of mitochondrial calcium cycling" *J. Biol. Chem.* 249, 12978-12983
- Nicholls D. G. y Crompton M. (1980) *FEBS Lett.* 111, 261-268

- Nicholls D. G. y Scott I. D. (1980) *Biochem. J.* 188, 833-839F
- Nicotera P., Bellomo G. y Orrenius S. (1990) *Chem. Res. Toxicol.* 3, 484-494
- Noack E. y Greeff K. (1971) "Inhibition of calcium transport in mitochondria by β -receptor blocking substances and its reactivity by phospholipids" *Experientia Basel* 27, 810-811
- Panfili F., Sandri G., Liot G., Stancher B. and Sottocasa G. L. (1983) *En: "Calcium-Binding Proteins"* (de Bernard B. y cols., eds.) Elsevier, Amsterdam pp. 347-354
- Panfili F., Sandri G., Sottocasa G. L., Lunazzi G., Liot G. y Graziosi G. (1976) *Nature (London)* 264, 185-186
- Paucek P., Mironova G., Mahdi F., Breavis A. D., Woldegiorgis G. y Garlid K. D. (1992) "Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K^+ channel from rat liver and beef heart mitochondria" *J. Biol. Chem.* 268, 26092-26099
- Penefsky H. S. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2891-2899
- Pfeiffer D. P., Hutson S. M., Kauffman R. F. y Lardy H. A. (1976) "Some effects of ionophore A23187 on energy utilization and the distribution of cations and anions in mitochondria" *Biochem.* 15, 2690-2697
- Prestipino G., Ceccarelli D., Conti F. y Carafoli E. (1974) "Interactions of a mitochondrial Ca^{2+} -binding glycoprotein with lipid bilayer membranes" *FEBS Lett.* 45, 96-101
- Puskin J. S., Gunter T. F., Gunter K. K. y Russell P. R. (1976) "Evidence for more than one Ca^{2+} transport mechanism in mitochondria" *Biochem.* 15, 3834-3842
- Puskin J. S. y Gunter T. F. (1976) "Ion and pH gradients across the transport membrane of mitochondria following Mn^{2+} uptake in the presence of acetate" *Biochem.* 15, 3834-3842
- Reed D. J. (1990) *Chem. Res. Toxicol.* 3, 495-502
- Reed K. C. y Bygrave F. L. (1974) "Lanthanides and ruthenium red" *Biochem. J.* 140, 143-155
- Reed K. C. y Bygrave F. L. (1974b) "The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red" *Biochem. J.* 138, 239-252
- Reed K. C. y Bygrave F. L. (1975) *Eur. J. Biochem.* 55, 497-504
- Reynafarje J. y Lemaire A. J. (1969) "High affinity and low affinity binding of Ca^{2+} by rat liver mitochondria" *J. Biol. Chem.* 244, 584-593
- Riley W. W. Jr. y Pfeiffer D. R. (1986) "Rapid and extensive release of Ca^{2+} from energized mitochondria induced by F-GTA" *J. Biol. Chem.* 261, 28-31
- Roe M. W., Teusasters J. J. y Herman J. (1990) *Cell Calcium* 11, 63-73
- Rosier R. N. y Gunter T. F. (1980) "Calcium uptake by cytochrome oxidase vesicles" *FEBS Lett.* 109, 99-103
- Rosier R. N., Trucker D. A., Meendick S., Jain I. y Gunter T. F. (1981) "Resistance against its electrochemical gradient in cytochrome oxidase vesicles reconstituted with mitochondrial hydrophobic proteins" *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 549-554
- Rossi, C. S. y Lehninger A. Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of calcium and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria" *Clin. Exp. Biochem. Chem.* 239, 3971-3980
- Rossi, C. S., Vasington E. D. y Carafoli E. (1975) "The effect of ruthenium red on the uptake and release of Ca^{2+} by mitochondria" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59, 84-882
- Rotenberg H. and Scarpa A. (1974) "Calcium uptake and membrane potential in mitochondria" *Biochem.* 13, 4811-486

- Rugolo M. y Zoccarato F. (1984) "Magnesium transport by brain mitochondria: energy requirement and dependence on calcium fluxes" J. Neurochem. 42, 1127-1136
- Sandri G., Panfilì E. y Sottocasa G. L. (1974) Acta Vitamin. Enzymol. 28 317-322
- Sandri G., Panfilì E. y Sottocasa G. L. (1976) "The calcium-binding glycoprotein and mitochondrial calcium movements" Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 1272-1279
- Saris N. E. L., Sirota T. V., Virtanen L., Niva K., Penttilä T., Dolgachova L. P. y Mironova G. D. (1993) "Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by antibodies against a 40 kDa glycoprotein" J. Bioenerg. Biomembr. 25, 307-312
- Scarpa A. y Azzone G. F. (1970) "The mechanism of ion translocation in mitochondria. I. Coupling of K⁺ efflux with Ca²⁺ uptake" Eur. J. Biochem. 12, 328-335
- Scarpa A. y Graziotti P. (1973) "Mechanism for intracellular Ca²⁺ regulation in heart. I. stopped flow measurement of calcium ion uptake by cardiac mitochondria" J. Gen. Physiol. 62, 75-77
- Selwyn M. J., Dawson A. P. y Dunnett S. J. (1970) "Calcium transport in mitochondria" FEBS Lett. 10, 1-5
- Shägger H., Link T. A., Engel W. D. y von Jagow G. (1986) "Isolation of the eleven protein subunit of the bc₁ complex from beef heart" Methods Enzymol. 126, 224-237
- Shoenmakers T. J. M., Visser G. J., Flink G. y Thiouvenet A. P. R. (1992) E., 870-879
- Slater E. C. y Cleland K. W. (1953) "The effect of Ca²⁺ on the respiratory and phosphorylative activities of heart-muscle sarcosomes" Biochem. J. 55, 566
- Sokolove P. M. y Brenza J. M. (1983) "Isolation of a fraction with Ca²⁺ ionophore properties from rat liver mitochondria" Arch. Biochem. Biophys. 221, 404-416
- Sottocasa G., Sandri G., Panfilì E., y de Bernard B. (1972) "Isolation of a soluble Ca²⁺ binding glycoprotein from ox liver mitochondria" Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 808-813
- Sottocasa G. L., Sandri G., Panfilì E. y De Bernard B. (1971) "A glycoprotein located in the intermembrane space of rat liver mitochondria" FEBS Lett. 17, 100-105
- Tashmukhamedov B. A., Gagelgans A. I., Manatkulov K. y Makhmudova L. M. (1972) FEBS Lett. 28, 239-242
- Tyson C. A., Zauds H. V. y Green D. E. (1976) "Phospholipids as ionophores" J. Biol. Chem. 251, 1326-1332
- Tsien R. Y., Pozzan T., Rink T. J. (1982) J. Cell Biol. 94, 325-334
- Utesheva, Zh. A., Sirota, T. V. y Mironova G. D. (1989) " UK Biochem. J. 61, 54-58
- Vainio H., Mela I. y Chance B. (1970) "Energy-dependent bivalent cation translocation in rat liver mitochondria" Eur. J. Biochem. 12, 387-391
- Vasington F. D. y Murphy J. V. (1962) "Ca²⁺ uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation" J. Biol. Chem. 237, 2676-2677
- Vasington F. D., Gazzotti P., Tiozzo R. y Carafoli E. (1972) "The effect of ruthenium red on Ca²⁺ transport and respiration in rat liver mitochondria" Biochim Biophys Acta 25, 43-54
- Vázquez-Acevedo M., Antaramian A., Corona N. y González-Halphen D. (1993) "Subunit structures of purified beef mitochondrial cytochrome bc₁ complex from liver and heart" J. Bioenerg. Biomembr. 25, 401-410

- Vercesi A., Reynafarge B. y Lehninger A. L. (1978) "stoichiometry of H⁺ ejection and Ca²⁺ uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria" J. Biol. Chem. 253, 6379-6385
- Vinogradov A. y Scarpa A. (1973) "The initial velocities of calcium uptake by rat liver mitochondria" J. Biol. Chem. 248,5527-5531
- Wardi A. M. (1972) "Alcian blue staining of glycoproteins in acrylamide disc electrophoresis" Anal. Biochem. 49, 607-609
- Weihua Li, Shariat-Madar A., Powers M., Sun X., Lane R.D. y Garlid, K.D. (1992) "Reconstitution, identification, purification and immunological characterization of the 110 kDa Na⁺/Ca²⁺ antiporter from beef heart mitochondria" J. Biol. Chem. 267, 17983-17989
- Wermette M. E., Ochs R.S. y Lardy H. A. (1981) "Ca stimulation of RLM glycerophosphate dehydrogenase" J. Biol. Chem. 256, 12767
- Wingrove D. E. y Gunter T. E. (1986) "Kinetics of mitochondrial calcium transport I. Characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism of liver mitochondria" J. Biol. Chem. 261, 15166-15171
- Ying W.-L. y Sanadi R. (1991) "Partial purification of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter." Comunicación personal
- Zazueta C., Holguín J. A. y Ramírez J. (1991) "Calcium transport sensitive to ruthenium red in cytochrome oxidase vesicles reconstituted with mitochondrial proteins" J. Bioenerg. Biomembr. 23, 889-902
- Zazueta C., Masso F., Paez A., Bravo C., Vega A., Montañón L., Vázquez, M., Ramírez J. y Chávez, E. (1994) "Identification of a 20-kDa protein with calcium uptake transport activity. Reconstitution in a membrane model" J. Bioenerg. Biomembr. 26, 555-561
- Zhou G., Mironova G. y Garlid K. (1993) Trabajo no publicado Biophys J. 64,A80