



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**"PURIFICACION Y FUNCIONALIDAD DE ALGUNOS SEGMENTOS DE LA ATPASA  
DE MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RES Y DE LEVADURA"**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A  
**SILVIA DEVARA RAMOS**

**MEXICO, D. F.**

**1982**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# INDICE

Página

## I. GENERALIDADES

Estructura mitocondrial - - - - -	1
Funciones mitocondriales - - - - -	4
a) Síntesis de proteínas - - - - -	5
b) Transporte de metabolitos - - - - -	6
c) $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos - - - - -	7
d) Ciclo de los ácidos tricarboxílicos - - - - -	9
e) Cadena de transporte de electrones - - - - -	12
f) Fosforilación oxidativa - - - - -	16
Control Respiratorio - - - - -	17
Agentes inhibidores y desacoplantes - - - - -	19
Reacciones parciales de la fosforilación oxidativa -	20
Mecanismo de la fosforilación oxidativa	
a) Hipótesis del acoplamiento químico - - - - -	20
b) Hipótesis del acoplamiento conformacional - - - -	21
c) Hipótesis del acoplamiento quimiosmótico - - - -	22

## INTRODUCCION

Estructura de la ATPasa - - - - -	26
Sistemas submitocondriales - - - - -	30

## II. OBJETIVOS - - - - - 35

## III. MATERIALES Y METODOS

Obtención y purificación del material biológico	
a) Obtención de mitocondrias de corazón de res - - -	37
b) Purificación del factor $F_1$ - - - - -	37
c) Purificación del factor OSCP - - - - -	39

	Página
d) Purificación de Inhibidor y $F_1$ de mitocondrias de corazón de res - - - - -	41
e) Preparación de partículas A - - - - -	44
f) Preparación de partículas STA - - - - -	45
g) Obtención de anticuerpos - - - - -	46

**Técnicas Utilizadas**

a) Electroforesis en geles de acrilamida - - - - -	47
b) Detección de anticuerpos por doble inmunodifusión	48
c) Análisis de aminoácidos - - - - -	49

**Método espectrofotométrico**

d) Actividad de ATPasa en $F_1$ soluble - - - - -	49
e) Actividad de la Proteína Inhibidora en $F_1$ soluble	51

**Método colorimétrico**

f) Actividad de ATPasa en $F_1$ soluble - - - - -	51
g) Actividad de ATPasa en partículas submitocondriales - - - - -	52
h) Reducción de NAD dependiente de ATP en partículas reconstituidas - - - - -	52
i) Reconstitución de partículas A de corazón de res	53
j) Reconstitución de partículas STA de corazón de res	54
k) Filtración de $F_1$ - - - - -	54
l) Fijación de $F_1$ en partículas STA de corazón de res	55
m) Fijación de $F_1$ sensible a oligomicina en partículas STA de corazón de res - - - - -	55
n) Determinación de proteína - - - - -	56

	Página
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	
a) Purificación de Inhibidor y $\Gamma_6$ de mitocondrias de levadura - - - - -	58
b) Determinación del peso molecular - - - - -	64
c) Composición de aminoácidos - - - - -	66
d) Pruebas Inmunológicas - - - - -	69
e) Pruebas de Funcionalidad - - - - -	71
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES - - - - -	89
VI. BIBLIOGRAFIA - - - - -	92

## ABREVIATURAS

- EDTA.- Acido etilen diamino tetraacético  
ATP.- Trifosfato de adenosina  
ADP.- Difosfato de adenosina  
Tris.- Hidroximetil amino metano  
DEAE.- Dietil amino etil  
DTE.- Ditioeritritol  
DTT.- Ditiotritol  
PEP.- Fosfoenol piruvato  
PK.- Piruvato kinasa  
DL.- Deshidrogenasa láctica  
nm.- nanometro  
TCA.- Acido tricloro acético  
MES.- Acido 2-(N-Morfolino)etano sulfónico  
TES.- Acido N-Tris(hidroximetil)metil-2-amino etano sulfónico  
BSA.- Seroalbúmina de bovino  
SDS.- Dodecil sulfato de sodio  
TEMED.- N'N'N' Tetrametilen diamina  
FCCP.- paraTrifluorometoxicarbonil-cianuro-fenilhidrazona  
DS.- Deshidrogenasa succínica  
Factores de acoplamiento:  
F<sub>1</sub>.- Factor de acoplamiento 1 ó ATPasa  
OSCP.- Proteína que confiere sensibilidad a oligomicina  
F<sub>6</sub>.- Factor de acoplamiento 6  
F<sub>0</sub>.- segmento hidrofóbico de la ATPsintetasa  
SMP.- partículas submitocondriales  
SMP-A.- SMP preparadas a pH 9.2  
SMP-STA.- partículas A extraídas con ácido silicotúngstico  
 $\mu$ .- micra  
 $\Omega$ .- ohm  
DNA.- ácido desoxirribonucléico  
aa.- aminoácido (s)  
rpm.- revoluciones por minuto  
NAD.- nicotín adenín dinucleótido  
NADH.- nicotín adenín dinucleótido reducido  
Sat.- solución saturada

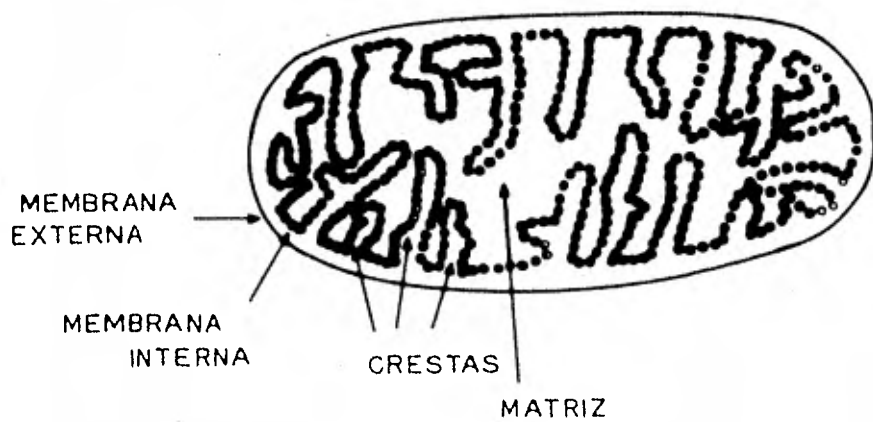
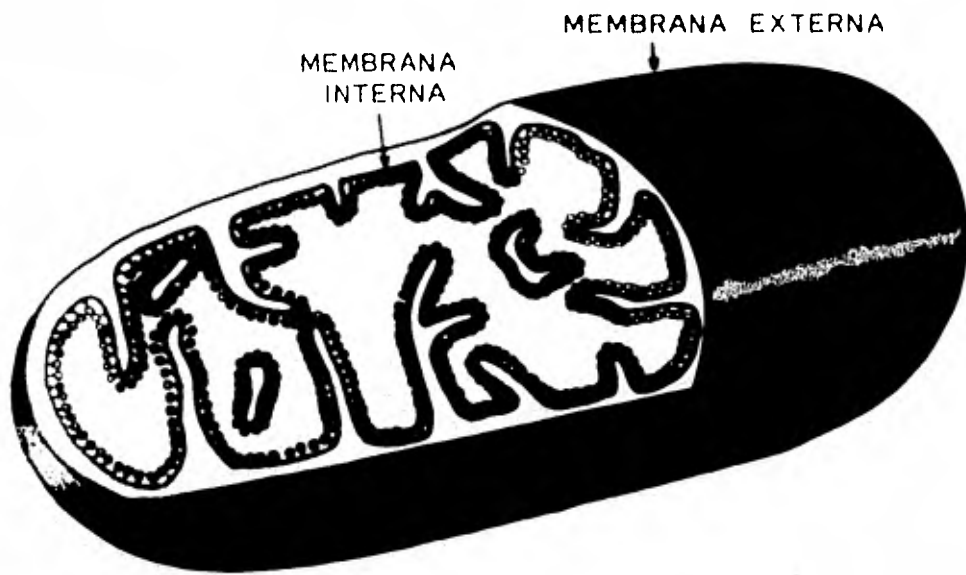
## I. GENERALIDADES

### Estructura mitocondrial.

En las células eucarióticas, el lugar donde son oxidados a  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  los carbohidratos, lípidos y aminoácidos, conservándose parte de la energía liberada en forma de ATP, es la mitocondria.

Las mitocondrias son organelos subcelulares cuya forma y número varía de un tipo celular a otro, por ejemplo, en las células de levadura son esféricas, en las células hepáticas elipsoidales y en las renales presentan una forma cilíndrica. Miden alrededor de una a dos micras de diámetro. Son más abundantes en los tipos celulares que requieren altas concentraciones de ATP, que es el producto principal de su actividad bioquímica, como las células musculares que realizan principalmente trabajo mecánico, las células epiteliales que realizan trabajo osmótico, transportando activamente solutos de un lado a otro de la membrana en contra de un gradiente de concentración ó en las células hepáticas que realizan numerosos procesos biosintéticos. Tal es su abundancia, que en las células del músculo cardíaco constituyen el 33% del volumen total de las mismas y en células hepáticas el 22%. (1,2).

Las mitocondrias poseen dos membranas (Fig. 1): la membrana externa es lisa; mientras que la interna se en-



ESQUEMA DEL CORTE TRANSVERSAL DE UNA MITOCONDRIA

FIG. 1 ESQUEMA DE UNA MITOCONDRIA



cuentra plegada en "crestas" o invaginaciones, lo que le -- confiere una superficie mucho mayor. Además, está recubierta en su cara interna por partículas esféricas de aproximadamente 85 nm de diámetro espaciadas regularmente, que fueron descritas por Fernández-Morán con la técnica de tñido por contraste negativo (3).

La membrana interna delimita el compartimiento interno del organelo, o matriz mitocondrial, fase gelatinosa que contiene un 50% de proteínas solubles, DNA mitocondrial y ribosomas. En la matriz mitocondrial están localizadas las enzimas de la oxidación de los ácidos grasos y la mayor parte de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (1,2). - La membrana interna contiene las enzimas que intervienen en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, así como ciertos sistemas de transporte. En ella se localizan la succinato deshidrogenasa, los citocromos b, c, c<sub>1</sub>, a y a<sub>3</sub> asociados al transporte de electrones y la OS-ATPasa asociada a los mecanismos de la síntesis del ATP. La membrana mitocondrial interna contiene un 75% de proteínas y un 25% de lípidos, de los cuales el más característico es la cardiolipina (3). Es el sistema membranar que tiene la relación proteína/lípido más alta. Tiene un abundante contenido de proteínas estructurales y una permeabilidad a solutos altamente selectiva.

La membrana mitocondrial externa contiene enzimas que

realizan diferentes funciones entre las que se encuentran: la Acil-Co A sintetasa, la monoamino oxidasa, la NADH citocromo  $b_5$  reductasa, la glicero fosfato aciltransferasa, la quinurenina 3 monoxigenasa, la fosfolipasa  $A_2$  y una ferrosulfoproteína entre otras. Es rica en colesterol y fosfatidilinositol (4).

La permeabilidad de ambas membranas es también diferente: en tanto que la membrana mitocondrial externa es libremente permeable a moléculas de peso molecular de muchos miles, la interna es impermeable a moléculas incluso relativamente pequeñas, de peso molecular entre los 100 y 150 daltones, así como a iones tales como  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Cl^-$ , (4) para el transporte de los cuales requiere de varias permeasas, -- que son transportadores de metabolitos específicos a través de la membrana.

#### Funciones mitocondriales.

Las mitocondrias participan en diversos e importantes procesos bioquímicos:

- a) Síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, que se lleva a cabo en la matriz mitocondrial.
- b) Transporte activo de metabolitos a través de la membrana interna, que es un proceso dependiente de la fosforilación oxidativa.

c)  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, que se desarrolla en el interior de la matriz mitocondrial.

d) Ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que se lleva a cabo en su mayor parte en la matriz mitocondrial, produciendo los equivalentes reducidos que intervienen en el proceso de la fosforilación oxidativa.

e) Transporte de electrones, que tiene lugar en la membrana interna mitocondrial. La energía que se genera durante el mismo, puede acoplarse al transporte de metabolitos o - - bién a la fosforilación oxidativa.

f) Fosforilación oxidativa, se verifica en la membrana mitocondrial interna y resulta en la producción del ATP.

Los últimos tres eventos d, e, y f, pueden medirse experimentalmente por el proceso metabólico conocido como respiración.

La mitocondria puede participar en otros procesos metabólicos que son característicos del tejido al que pertenecen, tal es el caso de las mitocondrias del tejido hepático, que llevan a cabo la lipogénesis, la gluconeogénesis y el ciclo de la urea, el cual también se observa en las mitocondrias del tejido renal.

a) Síntesis de proteínas.

De las mitocondrias aisladas, se han podido extraer todos los componentes requeridos para la síntesis protéica, --

incluyendo ribosomas y RNA ribosomal, enzimas activadores de aminoácidos y RNA de transferencia, todos los cuales son distintos de los que intervienen en la síntesis protéica extramitocondrial de las células eucarióticas, pero similares a los de las células procariontes. Este hecho apoya la hipótesis de que las mitocondrias surgieron a partir de endosimbiontes, parecidos a bacterias durante la evolución de las células eucarióticas (5).

La mayoría de las enzimas mitocondriales son codificadas por cromosomas nucleares y sintetizadas en ribosomas citoplasmicos. Sin embargo, se ha comprobado que tres componentes de la citocromo oxidasa, las cuatro proteínas hidrofóbicas del complejo ATPasa, uno o dos del complejo citocromo b, y una proteína necesaria para el ensamble del citocromo C, son codificados por el DNA mitocondrial (6).

Por otro lado, en 1963, Luck demostró que en N. crassa durante el crecimiento exponencial, la formación de nuevas mitocondrias se lleva a cabo por división de las ya existentes (3).

#### b) Transporte de metabolitos en membrana interna.

En ciertas condiciones, las mitocondrias pueden emplear una fracción significativa del total de la energía respiratoria disponible para fines distintos de la fosforilación del ADP. Una de éstas actividades es el transporte de ciertos

metabolitos y de iones a través de la membrana mitocondrial contra gradientes de concentración.

Existen en la membrana mitocondrial sistemas de transporte específicos para el ADP y ATP, el fosfato inorgánico, el piruvato, citrato, succinato,  $\alpha$ -oxoglutarato y malato, así como para los aminoácidos aspartato y glutamato. Recientemente se ha sugerido una translocasa para el ión amonio (7). Dichos sistemas reciben el nombre de transportadores, translocasas o portadores. Son sistemas activos, debido a que solo en presencia de energía de la fosforilación oxidativa transportan metabolitos en contra de los gradientes de concentración.

Acumulación de  $\text{Ca}^{++}$ .- Las mitocondrias de los tejidos animales pueden acumular también algunos cationes, particularmente  $\text{Ca}^{++}$  en contra de gradiente en un proceso energéticamente acoplado con el transporte electrónico (8). Por cada par de electrones que pasa desde el NADH hasta el oxígeno, se acumulan 6 iones  $\text{Ca}^{++}$  procedentes del medio, dos por cada centro de conservación de la energía.

Los iones  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Fe}^{++}$  y  $\text{Sr}^{++}$  se acumulan de un modo semejante en las mitocondrias; pero no así el  $\text{Mg}^{++}$ . El mecanismo de entrada de  $\text{Ca}^{++}$  y el de su liberación parecen ser diferentes (8).

c)  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos.

Los ácidos grasos libres proceden o bien de la corriente sanguínea, en la que son transportados unidos a la seroalbumina o de la hidrólisis de los lípidos intracelulares. Son activados por esterificación con Co A para formar ésteres acílicos de la Co A en la membrana mitocondrial externa y se convierten después en ésteres O-acil grasos de carnitina que pueden atravesar la membrana interna mitocondrial hasta la matriz, en donde vuelven a formarse los ésteres de acil-graso de Co A. Todas las etapas subsiguientes en la oxidación de ácidos grasos se realizan en forma de sus ésteres de Co A.

Las eliminaciones oxidativas sucesivas de unidades de acetil Co A de los acil-Co A grasos saturados de cadena larga, reciben el nombre de  $\beta$ -oxidación, rindiendo en cada ciclo del sistema un acetil Co A y un éster del Co A de un ácido graso con 2 átomos de carbono menos.

Los hidrógenos producidos en dos etapas de deshidrogenación, fluyen hacia el oxígeno a través de la cadena respiratoria y se acompaña de la fosforilación oxidativa del ADP. A su vez, el acetil Co A formado durante la oxidación del ácido graso, se oxida hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  al incorporarse en la síntesis de citrato al ciclo del ácido tricarbóxico.

Respiración.

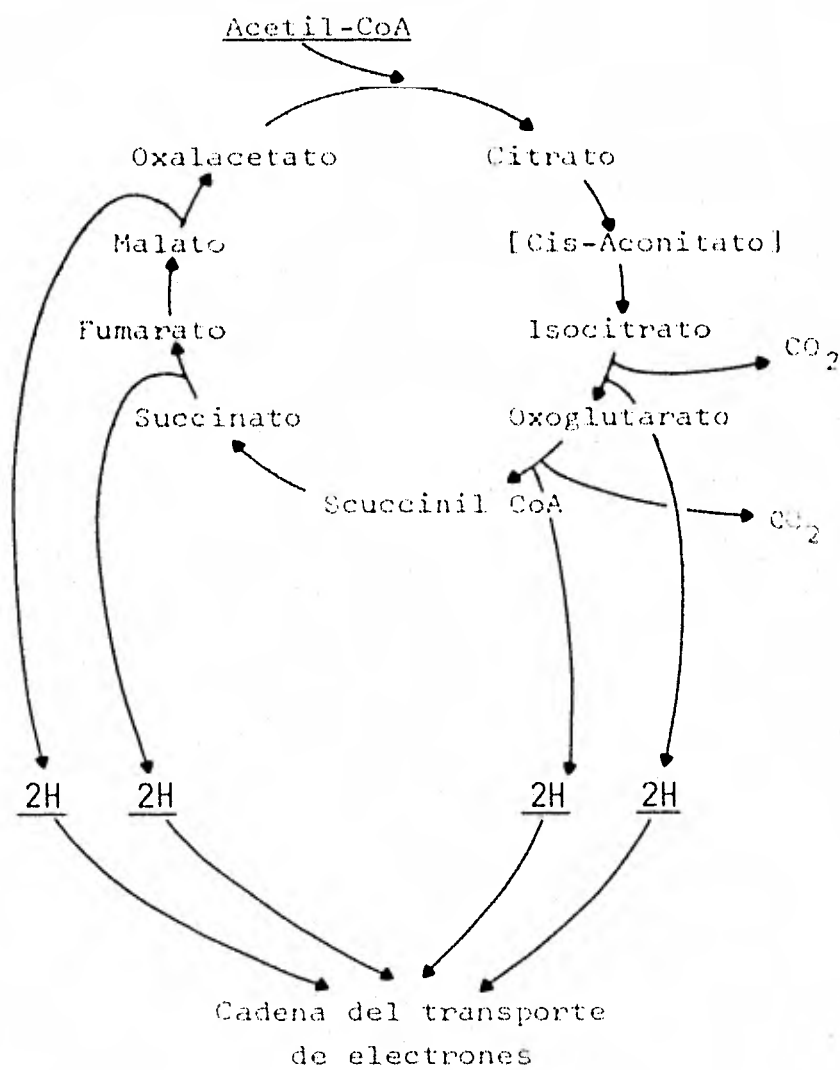
En el proceso de la respiración, las células aeróbicas

obtienen energía a partir de la oxidación de moléculas combustibles por el oxígeno molecular. Dicho proceso se verifica en tres fases: la primera comprende la formación por descarboxilación oxidativa del piruvato procedente de la glucólisis, de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y de la oxidación de los aminoácidos. La segunda fase se conoce como ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que en las células aeróbicas constituye la ruta común final de la oxidación de todas las moléculas combustibles. En éste ciclo, los grupos acetilo de la acetyl-CoA son enzimáticamente degradados para formar dos moléculas de  $\text{CO}_2$  y 4 pares de átomos de hidrógeno cuyos electrones se incorporan a la tercera fase, la cadena respiratoria, constituida por una serie de acarreadores de electrones que los transportan hasta el oxígeno molecular con un descenso considerable de energía libre, de la cual, se conserva gran parte gracias a la fosforilación del ADP para dar ATP en el proceso llamado fosforilación oxidativa.

Las dos últimas fases de la respiración: el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y el transporte electrónico acoplado a la fosforilación oxidativa, se llevan a cabo en la matriz y en la membrana interna de las mitocondrias respectivamente.

d) Ciclo de los ácidos tricarboxílicos. (Fig. 2)

Figura # 7. CICLO DE LOS ACIDOS TRICARBOXILICOS.





El ciclo de los ácidos tricarboxílicos fué postulado por primera vez en 1937 por Krebs y Johnson (1), con el nombre de ciclo del ácido cítrico. Desde entonces ha sido ampliamente estudiado y descrito con mayor detalle.

La función primaria del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, consiste en la deshidrogenación del ácido acético para formar en último término, 2 moléculas de  $\text{CO}_2$  y 4 pares de átomos de hidrógeno, proceso que es catalizado por una serie cíclica de reacciones consecutivas, como se muestra en la Fig. 2.

En cada vuelta del ciclo se incorpora una molécula de ácido acético equivalente a 2 átomos de Carbono, en forma de acetil-CoA, que por condensación con el ácido oxalacético, forma el ácido cítrico. Posteriormente éste pasa a cis-aconítico por pérdida de una molécula de agua, que se adiciona al mismo en la siguiente reacción del ciclo produciendo el ácido isocítrico, el cual es oxidado a ácido  $\alpha$ -cetoglutarico y  $\text{CO}_2$  por la isocitrato deshidrogenasa NAD-dependiente, enzima alostérica activable por ADP; ésta es la reacción limitante del ciclo.

En esta reacción el par de átomos de hidrógeno que se produce por la oxidación del isocítrico, reduce al NAD. El ácido  $\alpha$ -cetoglutarico, es oxidado a succinil CoA y  $\text{CO}_2$ , nuevamente el par de átomos de hidrógeno producido por la oxidación, reduce a una molécula de NAD. La desaci

lación de la succinil CoA, conduce a la formación de succinato libre y GTP, que transfiere su grupo fosfato terminal al ADP en una fosforilación a nivel de sustrato.

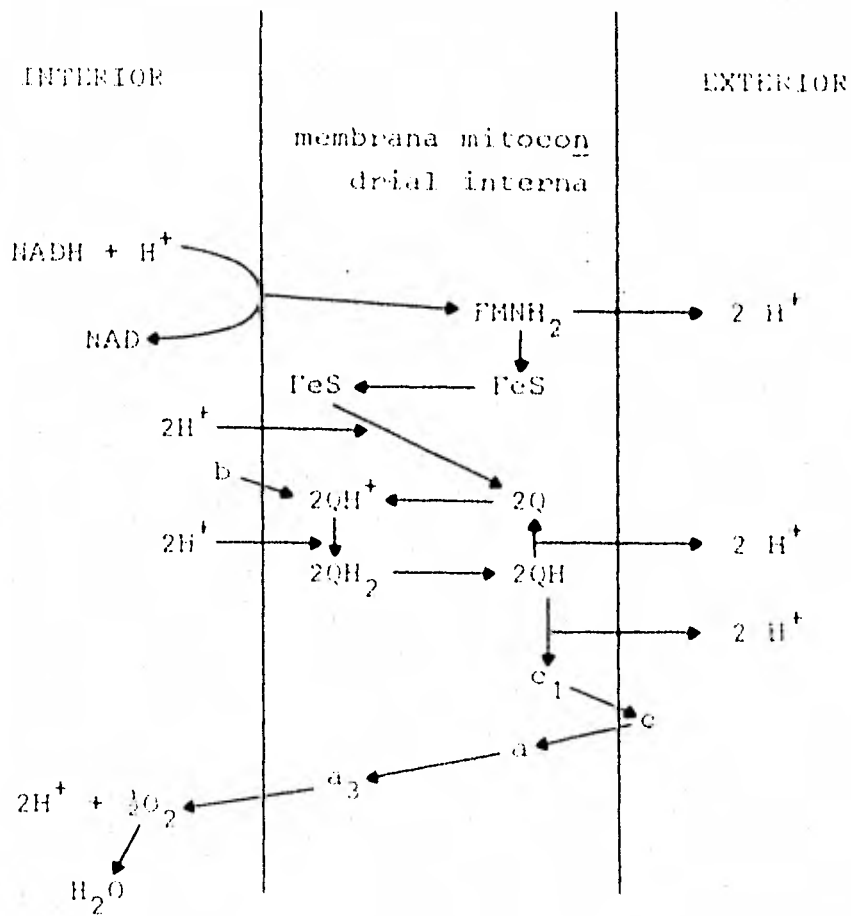
El ácido succínico, es oxidado a fumárico por la succinato deshidrogenasa, que contiene FAD como grupo prostético, el cual se reduce al aceptar el par de átomos de hidrógeno producidos en ésta reacción. La fumarasa cataliza la hidratación del ácido fumárico a L-málico, que es oxidado por la L-malato deshidrogenasa NAD-dependiente y se regenera una molécula de ácido oxalacético, cerrándose así el ciclo. Esta reacción es la productora del último par de átomos de hidrógeno del ciclo.

e) Cadena de transporte de electrones (9) (Fig. 3).

Los pares de electrones procedentes de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de otros -- sustratos, son transportados a lo largo de la cadena respiratoria hasta el oxígeno molecular, aceptor último de electrones en la respiración. Dicho proceso es llamado transporte electrónico y es la fuente energética principal de -- las actividades celulares, debido a que libera una gran -- cantidad de energía libre, la mayor parte de la cual se -- conserva en forma de la energía del enlace fosfato del ATP, producto del proceso denominado fosforilación oxidativa.

El NADH procedente del ciclo de los ácidos tricarboxí

Figura # 3. CADENA DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES EN LA MITOCONDRIA



licos, cede sus dos electrones y un protón al grupo transfe  
ridor FMN, regresando a su forma oxidada  $\text{NAD}^+$ , mientras que  
el FMN capta un protón adicional del medio interno quedando  
así reducido a  $\text{FMNH}_2$ . La molécula de FMN está unida a una -  
proteína integral de la membrana interna mitocondrial, a la  
que probablemente atraviesa por completo.

No se conoce bién el mecanismo por medio del cual el -  
 $\text{FMNH}_2$  transfiere los 2 átomos de hidrógeno desde la super--  
ficie interna de la membrana hasta la externa, en donde los  
átomos son ionizados y los protones liberados al medio ex--  
tramitocondrial, en tanto que los 2 electrones son transfe--  
ridos a las ferrosulfoproteínas, que actúan como transferi--  
dores de electrones de la fase externa a la interna de la -  
membrana.

Las ferrosulfoproteínas ceden el par de electrones a -  
la ubiquinona o coenzima Q, molécula cíclica que contiene 2  
átomos de oxígeno y presenta tres estados de oxidación posi--  
bles. En el estado de máxima oxidación, o forma quinona, --  
ambos oxígenos están unidos al anillo por dobles enlaces. -  
La forma semiquinona o  $\text{QH}^{\cdot}$  se origina por la unión de un á--  
tomo de hidrógeno a uno de los oxígenos. En la forma más re--  
ducida o de hidroquinona ( $\text{QH}_2$ ), ambos oxígenos están unidos  
a átomos de hidrógeno.

En el ciclo de la  $\text{coQ}$  propuesto por Mitchell (10), dos  
moléculas de ubiquinona captan respectivamente un electrón

procedente de las ferrosulfoproteínas y toman protones del medio para formar dos moléculas de semiquinona ( $QH^{\bullet}$ ), que a su vez reciben dos electrones del citocromo b y toman dos protones más del medio intramitocondrial formando así dos moléculas de hidroquinona ( $QH_2$ ). Debido a que la ubiquinona es soluble en la matriz lipídica de la membrana, es posible que sea móvil y migre a uno y otro lado de la membrana. En el ciclo de la  $coQ$  propuesto, las dos moléculas de hidroquinona atraviesan la membrana desde la superficie interior, desde donde toman un total de 4 átomos de hidrógeno, hasta el exterior, donde cada molécula de  $QH_2$  cede un electrón a la siguiente molécula de la cadena respiratoria, el citocromo  $c_1$  y libera un  $H^+$  fuera de la mitocondria. De este modo, serían transportados un total de 4 protones a través de la membrana.

Las moléculas de ubiquinona que se encuentran en estado de semiquinonas, completan el ciclo regresando a su estado de máxima oxidación: cada una cede su protón restante al medio externo y transfiere el electrón asociado al citocromo b, con lo que han sido transportados y expulsados, un total de 6 protones.

Los dos electrones transferidos al citocromo  $c_1$  prosiguen por toda la cadena respiratoria hasta el final. Sucesivamente son transferidos del citocromo  $c_1$ , incluido en la superficie exterior de la membrana, hasta el citocromo  $c_{co}$

locado también sobre la superficie externa; a continuación los electrones pasan a los componentes de la citocromo oxidasa: al citocromo a, para atravesar por última vez la membrana hasta el citocromo  $a_3$  el cual es finalmente oxidado por el oxígeno molecular. El átomo de oxígeno acepta los 2 electrones y capta dos protones del medio intramitocondrial para formar agua.

f) Fosforilación oxidativa.

El primero en postular que la fosforilación se acopla con la respiración en tejidos animales fué Engelhardt (1), en la Unión Soviética, al comienzo de los años 30; pero la evidencia clara no se tuvo hasta después de la formulación del ciclo de los ácidos tricarboxílicos en 1937. En 1948, Kennedy y Lehninger (1), aportaron las pruebas experimentales que permitieron sugerir que la energía de oxidorreducción desde el NADH hasta el oxígeno, se transforma en la energía del enlace fosfato en 3 puntos de la cadena de transporte de electrones.

Se han podido identificar los lugares aproximados de la cadena respiratoria en los que se libera energía a partir de los cálculos de la variación de energía libre que se produce durante la transferencia de un par de equivalentes electrónicos en cada una de las etapas sucesivas de transferencia electrónica de la cadena respiratoria.

Por métodos experimentales directos, ensayando porciones específicas de la cadena respiratoria para determinar su capacidad de formación de ATP, se ha demostrado que estas zonas son realmente los centros de acoplamiento de energía en la cadena respiratoria.

Se designan como:

Sitio I: el tramo comprendido entre el NADH y la coenzima Q

Sitio II: el tramo entre el citocromo b y el citocromo c

Sitio III: entre el citocromo c y el oxígeno.

La oxidación mitocondrial de los sustratos NAD-dependientes como: citrato, glutamato,  $\alpha$ -cetoglutarato y malato, conduce a la formación de 3 moléculas de ATP por átomo de oxígeno reducido. Los metabolitos que son deshidrogenados por las flavoproteínas, como el succinato, evitan al sitio I aportando sus electrones directamente a la ubiquinona y rinden por lo tanto sólo 2 moléculas de ATP por átomo de oxígeno reducido.

Control respiratorio.

El transporte electrónico se efectúa a una velocidad máxima en las mitocondrias intactas, solamente en presencia de ADP y fosfato. Cuando falta ADP, la velocidad de la respiración es muy baja y no se produce fosforilación debido a la inexistencia del aceptor de fosfato. Este estado de repo

so de la respiración se conoce como estado 4. Al añadir -- determinada cantidad de ADP al sistema, el consumo de oxígeno se incrementa bruscamente hasta un valor máximo, al mismo tiempo que el ADP añadido es fosforilado a ATP. Este estado, se conoce como respiración activa o estado 3. Cuando se ha fosforilado el ADP añadido, la velocidad de consumo del oxígeno desciende bruscamente volviendo al estado 4. Este fenómeno en el que la velocidad de transporte es controlada por la concentración de ADP se llama control por el aceptor o control respiratorio.

Como resultado de las transiciones entre los estados respiratorios 4 (sin ADP) y 3 (exceso de ADP), las mitocondrias experimentan cambios ultraestructurales, efecto que fué descrito por primera vez por Hackenbrock (1). En ausencia de ADP, la matriz llena completamente el interior mitocondrial, se le ha denominado conformación ortodoxa. Al añadir ADP y pasar al estado 3 de la respiración, la matriz se condensa hasta un 50% del volumen en el estado ortodoxo y las crestas se pliegan más estrechamente, dando lugar a la conformación condensada.

Tales cambios conformacionales parecen tener importancia en cuanto al acercamiento de las crestas y por lo tanto de las enzimas membranales entre sí, así como en las -- concentraciones relativas intramitocondriales de los metabolitos (11).



Agentes inhibidores y desacoplantes.

La función acoplada de la oxidación y la fosforilación es alterada por agentes desacoplantes, que al mismo tiempo que estimulan el consumo de oxígeno en mitocondrias intactas en ausencia de ADP, inhiben la fosforilación en presencia de ADP y provocan un gran aumento en la actividad hidrolítica sobre el ATP. Entre los desacoplantes se encuentran el 2, 4, dinitro fenol y el FCCP. El mecanismo de acción de los desacoplantes es debido a que promueven el paso de  $H^+$  a través de la membrana interna de la mitocondria.

Una segunda clase de agentes, los inhibidores de la fosforilación oxidativa, impiden tanto la estimulación del consumo de oxígeno por ADP, como la fosforilación de éste a ATP. Un inhibidor prototipo es el antibiótico oligomicina (12). La acción de este inhibidor sobre el consumo de oxígeno inducido por ADP es anulada por los desacoplantes.

Una tercera clase de agentes modificadores del proceso de fosforilación oxidativa, son los ionóforos, que requieren la presencia de ciertos cationes monovalentes para ejercer su actividad, formando complejos liposolubles con ellos, que atraviesan la membrana y acumulan los cationes, lo que impide que la energía de la respiración pueda ser utilizada en la síntesis del ATP. Un ejemplo es el antibiótico valinomicina (9).

Reacciones parciales de la fosforilación oxidativa.

Cuatro de las reacciones catalizadas en la mitocondria intacta, se consideran etapas individuales del mecanismo mediante el cual se forma el ATP durante la fosforilación oxidativa. Tales reacciones parciales parecen llevarse a cabo sin un flujo neto de electrones a lo largo de la cadena respiratoria. La primera es la actividad ATPásica, que es normalmente muy baja en las mitocondrias, es estimulada por desacoplantes y característicamente inhibida por la oligomicina. La segunda reacción es el rápido intercambio de fosfato inorgánico marcado con  $^{32}\text{P}$  con el fosfato terminal del ATP en ausencia de transporte electrónico. Este intercambio ATP-Pi es inhibido por el 2,4, dinitrofenol o la oligomicina. La tercera reacción parcial es el intercambio fosfato-agua en la que se intercambian átomos de oxígeno del agua del medio con los del fosfato inorgánico, sin desaparición neta de fosfato. Es también inhibida por el 2,4, dinitrofenol y la oligomicina. La cuarta reacción parcial es la rápida transferencia del grupo fosfato terminal del ATP al ADP, llamada reacción de intercambio ATP-ADP que resulta también inhibida por el 2,4, dinitrofenol y la oligomicina.

Mecanismo de la fosforilación oxidativa.

a) Hipótesis del Acoplamiento Químico

Propuesta originalmente por Slater en 1953(1), como un

mecanismo para interpretar la fosforilación oxidativa. Según el cual la reacción de transferencia electrónica productora de energía, se acopla a la formación de ATP a partir de ADP y  $P_i$ , consumidora de energía, a través de un compuesto intermediario de elevada energía producido durante el transporte electrónico y utilizado como reactivo en la fosforilación del ADP a ATP. Dicha hipótesis tiene dos serias limitaciones. Una de ellas es que ninguno de los propuestos intermediarios de alta energía ha sido aislado después de 28 años de búsqueda. La segunda es que la hipótesis del acoplamiento químico no explica satisfactoriamente el hecho de que la membrana mitocondrial interna deba permanecer intacta y continua como una vesícula cerrada para que tenga lugar la fosforilación oxidativa. Es por éstas y otras razones que no ha prevalecido.

b) Hipótesis del acoplamiento por cambio de conformación.

Postulada por Boyer y colaboradores (1). Sostiene -- que la energía producida en el transporte de electrones, se conserva en forma de cambios conformacionales provocados en una proteína transportadora de electrones o en la molécula del factor acoplante (ATPasa  $F_1$ ). Dicho estado conformacional de elevada energía sería el resultado de modificaciones en el número y la localización de los enlaces débiles que mantienen la conformación tridimensional de la proteína, que al volver al estado de baja energía -

proveería la energía necesaria para la formación de ATP a partir de ADP y fosfato. Los cambios fisicoquímicos rápidos que experimenta la membrana mitocondrial interna conforme los electrones circulan a través de la cadena respiratoria, sugieren la posibilidad de un acoplamiento conformacional, así como los cambios espectaculares producidos en la mitocondria al pasar del estado 3 al 4 de la respiración y viceversa.

c) Hipótesis del acoplamiento quimiosmótico.

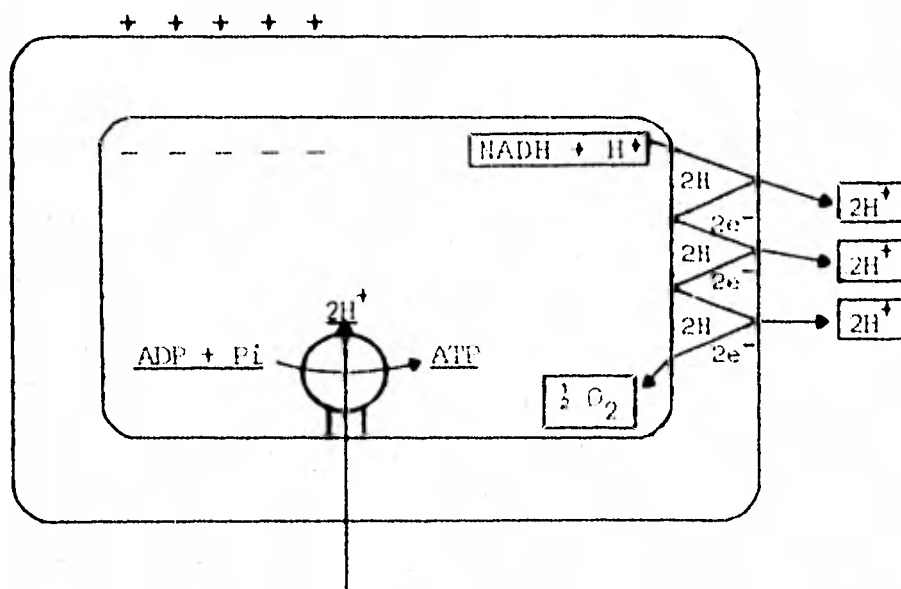
Propuesta en 1961 por Mitchell (1), sostiene que el acoplamiento del flujo de la energía del transporte electrónico para la formación de ATP, se debe a un estado intermedio de energía elevada y no a un compuesto químico. Dicho estado intermedio de alta energía es producto del gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial interna, generado durante el transporte de electrones. Ya que la membrana constituye una parte integral del mecanismo de acoplamiento, debe estar intacta en forma de una vesícula continua y cerrada para que se verifique la fosforilación oxidativa.

Mitchell postula que el papel de los transportadores de electrones en la cadena respiratoria, es el de bombear protones transportándolos desde la matriz mitocondrial a través de la membrana interna, hacia la fase externa generando un gradiente de protones.

Se considera que el gradiente de protones es producido durante el transporte electrónico, gracias a una ordenación vectorial específica de las proteínas transportadoras de electrones en la membrana mitocondrial interna, de modo que las reacciones en las que se absorben protones se produzcan sobre su cara interna y las reacciones que producen protones tengan lugar sobre su cara externa. La energía libre almacenada en el gradiente de  $H^+$  está en función de la concentración relativa de  $H^+$  a través de la membrana y se ha llamado fuerza protón-motriz. Se calcula que 2 o más -- protones son bombeados fuera de la mitocondria por cada -- par de electrones que pasan a través de cada centro conservador de energía. El gradiente de protones rico en energía, es utilizado entonces para provocar la formación de ATP a partir de ADP y  $P_i$  en una reacción vectorial en la que interviene el complejo ATPasa de la membrana interna. (Ver figura 4).

La mayoría de los resultados obtenidos hasta ahora, -- son compatibles con la teoría quimiosmótica. Se necesita -- una membrana mitocondrial continua para la fosforilación -- oxidativa, se ha comprobado que aquella es impermeable a -- los protones y que los componentes del transporte electróni -- nico se distribuyen asimétricamente a ambos lados de la -- membrana, por lo que la cadena de transporte electrónico -- puede bombear protones hacia el exterior. Además de ha vis

Figura # 4. ESQUEMA DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA  
DE ACUERDO CON LA HIPOTESIS DE MITCHELL.



to que la formación de ATP va acompañada de la entrada de protones. Por otra parte y en concordancia con los postulados de Mitchell, se ha demostrado que los agentes desacoplantes como el 2,4,dinitrofenol, permiten a los protones atravesar la membrana mitocondrial disipando el gradiente de protones generado por el transporte electrónico.

Mitchell ha indicado que no todo el gradiente electroquímico necesario ha de manifestarse en forma de un gran  $\Delta\text{pH}$  a través de la membrana, sino una parte de él es aportado por una diferencia de potencial eléctrico ( $\Delta\psi$ ), de acuerdo con la fórmula general:

$$\Delta\mu\text{H} + \Delta\psi - Z \Delta\text{pH}$$

en donde:  $\Delta\mu\text{H}$  = potencial electroquímico o fuerza protonotriz

$\Delta\psi$  = diferencia en el potencial eléctrico a través de la membrana

$$Z = \frac{2.3 \times RT}{F} = 60 \text{ mV a } 25 \text{ }^\circ\text{C}$$

$\Delta\text{pH}$  = diferencia de concentración de protones a través de la membrana

F = constante de Faraday

R = constante universal de los gases

T = temperatura absoluta

2.3 = factor de conversión de log natural a log de base 10.

## INTRODUCCION

### Estructura de la ATPasa.

El complejo de la ATPsintetasa (13), situado en la membrana interna mitocondrial, lleva a cabo la síntesis de ATP acoplada al transporte de electrones; en dicho proceso la fuerza protomotriz generada en la cadena respiratoria es -- convertida reversiblemente en energía química contenida en la molécula del Adenosín trifosfato. Estructuralmente, el complejo de la ATPsintetasa está formado por 3 segmentos:

1) El segmento hidrofílico o Factor  $F_1$ , que cataliza la síntesis o hidrólisis del ATP. Identificado por Racker y sus colaboradores (14) como las partículas antes observadas por Fernández-Morán en la cara interior de la membrana mitocondrial interna.

2) El segmento hidrofóbico o Factor  $F_0$ , localizado en el interior de la bicapa lipídica de la membrana y cuya función principal es la de permitir el paso de protones a través de la membrana.

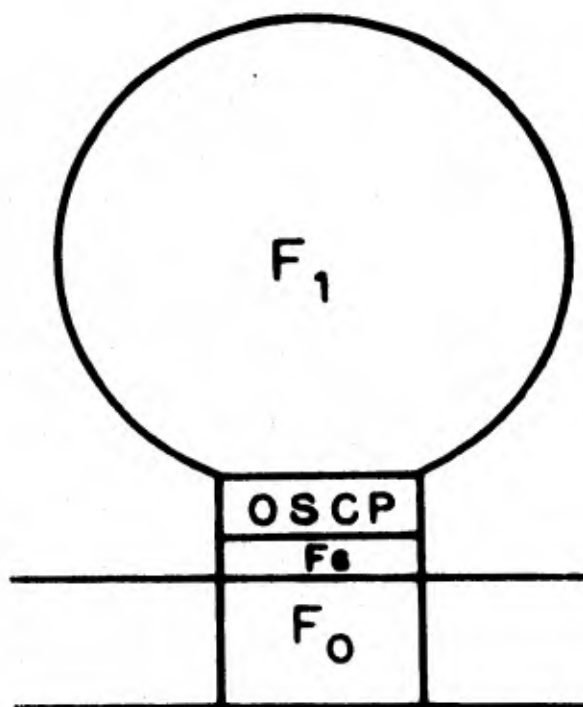
3) El segmento de unión entre los dos anteriores, constituido por dos proteínas diferentes: la OSCP o proteína -- que confiere sensibilidad a oligomicina y el factor de acoplamiento 6 o  $F_6$ . (Ver figura 5).

1) Segmento catalítico  $F_1$ .

Es una enzima esférica de gran tamaño, su peso molecu-



FIGURA # 5. ESQUEMA DE LA ATPSINTETASA



lar estimado por filtración en gel es de 360 000 daltones y 347 000 por ultracentrifugación. Está constituida por 5 subunidades diferentes denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , con pesos moleculares de 55 000, 50 000, 33 000, 17 000 y 7 500 daltones respectivamente.

Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  contienen el centro activo, su estequiometría probablemente es 3:3. El oligómero formado de 6 a 4 subunidades lleva a cabo la reacción de síntesis de ATP a partir de los substratos ADP, Fosfato y una fuerza protomotriz de un valor cercano a los 200 mVolts. Aparentemente la subunidad  $\beta$  posee el sitio catalítico y la  $\alpha$  actúa como regulador de la actividad enzimática, debido a que posee un sitio de fijación para los adenín-nucleótidos.

Las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$ , parecen estar involucradas en la apertura del canal para permitir el paso del protón. Su estequiometría parece ser 1:1:1.

Asociado a la  $F_1$  se encuentra además el inhibidor natural de la ATPasa, un péptido pequeño de peso molecular - 10 000 daltones en las mitocondrias de corazón de res, en donde fué aislado y descrito por primera vez por Pullman y Monroy (15). Regula la síntesis e hidrólisis del ATP y todas las reacciones dependientes de ATP. Se ha dicho que es capaz de registrar variaciones finas del gradiente de protones (16) y dependiendo del estado metabólico, decidir si el gradiente debe ser utilizado para la síntesis de ATP, -

en cuyo caso activará la ATPsintetasa, o bien, para favorecer los procesos de transporte de iones por inhibición de la actividad de la ATPasa, ya que ambas funciones compiten por la utilización del gradiente de protones.

### 2) Segmento hidrofóbico $F_0$ .

Formado en mitocondrias aparentemente por 4 péptidos integrales (4) de pesos moleculares: 29 000, 22 000, 12 000 y 7 800 daltones. Siendo su componente principal un proteolípido de aproximadamente 8 000 daltones de peso molecular que se encuentra como hexámero. La funcionalidad de éste proteolípido como protonóforo se ha demostrado en liposomas (17). El canal de protones estará formado por proteínas hidrofóbicas que se extienden a lo largo de la bicapa lipídica, manteniendo en su arreglo oligomérico los residuos hidrofóbicos hacia la parte apolar de la bicapa y las cargas en el interior del canal. Esta estructura molecular, permitirá el paso del protón ya sea por asociaciones sucesivas de éste con los residuos cargados del canal o simplemente por difusión en un "poro de agua".

### 3) Segmento Estructural.

Formado por dos proteínas, la OSCP (18) o proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina al factor  $F_1$ , de peso molecular de 21 000 daltones y el factor de acoplamiento  $F_6$  (19, 20), de peso molecular de 8 000 daltones. Ambos funcionan como adaptadores estructurales entre el segmento hidro--

fílico ( $F_1$ ) y el hidrofóbico ( $F_0$ ); se ha demostrado que la presencia de ambas proteínas es necesaria para "sellar" el complejo OS-ATPasa impidiendo que se disipe el gradiente electroquímico producido en la cadena de electrones por el paso de protones a través de sitios inespecíficos de la -- membrana, que aparentemente no llegan al sitio activo de -- la  $F_1$ .

Debido a que tanto en bacterias como en cloroplastos no se ha detectado la presencia de OSCP ni de  $F_6$ , se piensa que en estos sistemas las proteínas están integradas al factor  $F_0$  y el ensamble de la  $F_1$  a la membrana depende únicamente de él.

En estos sistemas, la  $F_1$  se fija menos fuertemente a la membrana que en el caso de la mitocondria, ya que es -- más fácil dissociarla; el hecho de que existan  $F_6$  y OSCP en la mitocondria probablemente indica que estas dos protef-- nas funcionan como sistemas de seguridad, "sellando" el pa-- so de protones a través de la membrana mitocondrial (21).

#### Sistemas Submitocondriales.

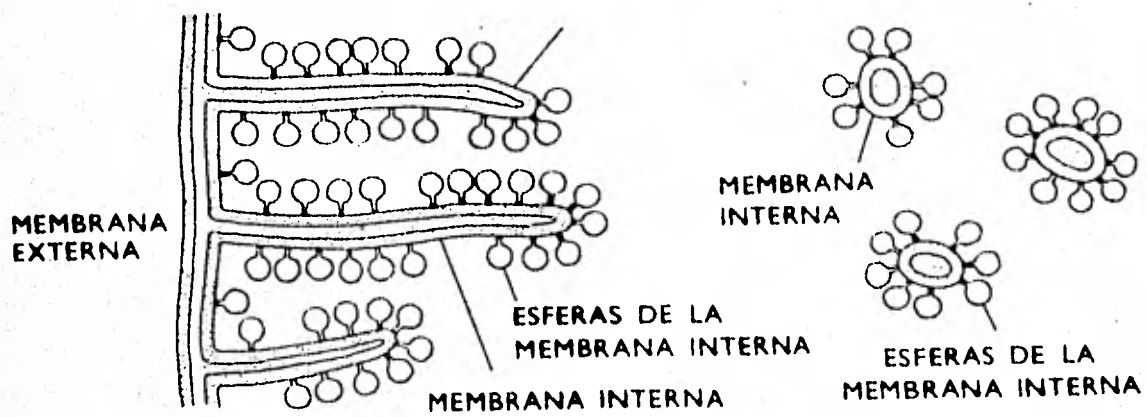
El estudio de la membrana interna mitocondrial, donde se lleva a cabo el principal metabolismo energético de las células, se ha realizando dissociándola en sus partes e intentando reconstituirla. Desde 1956, los experimentos independientes realizados casi simultáneamente en los laborato

rios de Lehninger, Lardy, Green y Kielley, demostraron que por medio de detergentes como la digitonina o por métodos físicos como la sonicación, se rompían las mitocondrias en partículas submitocondriales capaces de catalizar la fosforilación oxidativa (14).

Las partículas están constituidas por vesículas membranosas, resultantes de los fragmentos de membrana interna que se han "sellado" formando una esfera y que son capaces de catalizar la fosforilación oxidativa sólo en caso de que la membrana se halle completamente cerrada. Tales vesículas contienen las esferas de la membrana interna sobre su superficie exterior, lo cual sugiere que las vesículas se forman por expresión de las crestas quedando con la polaridad invertida en comparación con la membrana mitocondrial intacta (Fig. 6).

Racker y sus colaboradores han demostrado (14) que -- cuando las partículas submitocondriales fosforilantes, de mitocondrias de corazón de res, se someten a agitación mecánica o a un tratamiento con tripsina y urea, se obtienen 2 fracciones: 1) vesículas membranosas que catalizan el -- transporte de electrones pero no la fosforilación del ADP y 2) una fracción protéica denominada factor de acoplamiento 1 ó  $F_1$ , soluble, que cataliza la hidrólisis del ATP pero no el transporte de electrones. La microscopía electrónica permitió observar que las vesículas membranosas así --

Figura # 6. OBTENCION DE PARTICULAS SUBMITOCONDRIALES



obtenidas, no contienen esferas o  $F_1$  en su superficie. Cuando ambas fracciones se mezclan, se reestablece la actividad de la fosforilación oxidativa y se observa  $F_1$  nuevamente en la superficie de las vesículas.

Las proteínas solubles que se necesitan para restaurar la actividad acoplante de la membrana mitocondrial, se llaman factores acoplantes. El factor acoplante de Racker se llamó  $F_1$  y debido a que cataliza la hidrólisis del ATP se conoce como ATPasa.

La  $F_1$  soluble presenta diferencias en su comportamiento con respecto a cuando está fija a la membrana; es inestable a  $0^\circ\text{C}$  y su actividad es hidrolítica del ATP en lugar de ser sintética. Cataliza la hidrólisis de ATP a  $\text{ADP} + \text{Pi}$  en presencia de  $\text{Mg}^{++}$ , y no es inhibida por oligomicina.

Según el tratamiento a que se sometan las partículas submitocondriales, pueden despojarse diferencialmente de algunos de los factores de acoplamiento que constituyen el complejo ATPsintetasa. Dichas partículas reciben diferentes nombres, que se refieren al tratamiento recibido durante su preparación:

SMP MgATP. Partículas de  $\text{Mg}^{++}$ -ATP.- Descritas por Lee y Ernster (22), son partículas sonicadas en presencia de  $\text{Mg}^{++}$  y ATP a pH 7.4, que contienen todos los factores de acoplamiento.

Partículas Sephadex.- Son partículas MgATP sometidas a

pH 9.2 y pasadas por una columna de Sephadex G 50, que presentan una actividad hidrolítica estimulada, se piensa que esto se debe a la remoción del inhibidor natural de la ATPasa.

Partículas A. Partículas alcalinas.- Son partículas submitocondriales obtenidas sonicando en presencia de pH alcalino 9.4, son parcialmente carentes de los factores de acoplamiento  $F_1$  y OSCP.

Partículas STA. Partículas de silicotúngstico.- Son partículas A posteriormente expuestas a la acción de ácido silicotúngstico. Estas partículas resultan despojadas casi totalmente de los factores de acoplamiento  $F_1$ , OSCP y  $F_6$ .

La técnica de reconstitución consiste en intentar reconstruir las reacciones parciales de la fosforilación oxidativa, a partir de partículas submitocondriales y los factores de acoplamiento de que son carentes.



## II. OBJETIVOS

El estudio de los diferentes factores de acoplamiento que integran el complejo OS-ATPasa mitocondrial, nos permitirá entender el papel que cada uno de ellos juega en la compleja transformación de la energía del gradiente de protones, generado durante el transporte de electrones, en la energía del enlace fosfato terminal del ATP. El presente trabajo está dirigido principalmente al estudio del factor  $F_6$ . Se trata de una proteína básica y lipofílica que pesa 8 000 daltones en corazón de res, de donde fué aislada por primera vez por Fessenden-Raden (20) y por Knowles y col. (19) y donde ha sido caracterizada. También se ha purificado de mitocondrias de hígado de rata (23) pero no se había descrito su presencia en mitocondrias de levadura.

En nuestro laboratorio la hemos obtenido a partir de mitocondrias de levadura mediante un método que copurifica el inhibidor natural de la ATPasa mitocondrial.

La purificación de la proteína inhibidora en levaduras se describió a partir de mitocondrias (24) y más tarde a partir de levaduras enteras (25). En el presente trabajo la purificación se hizo a partir de levaduras enteras por un rápido procedimiento que permite la obtención de ambos factores, la proteína inhibidora y el factor  $F_6$ .

La caracterización estructural y funcional del factor  $F_6$  de levadura, se realizó comparativamente con las carac-

terísticas de la  $F_6$  purificada de corazón de res. Para identificar la  $F_6$  de levadura se utilizaron 4 criterios comparativos con la  $F_6$  de mitocondrias de corazón de res:

- 1) Peso molecular en geles de SDS,
- 2) Composición de aminoácidos,
- 3) Propiedades inmunológicas y
- 4) Funcionalidad.

Nuestros resultados sugieren que el factor  $F_6$  purificado a partir de levadura, es estructural y funcionalmente similar al descrito en mitocondrias de corazón de res.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### Obtención y purificación del material biológico.

##### a) Obtención de mitocondrias de corazón de res.

Se llevó a cabo siguiendo el método de Smith (26) modificado. Se partió de 4 corazones de res frescos, mantenidos en baño de hielo, que se disecaron cuidadosamente para desechar la porción de tejidos adiposo y fibroso y obtener solamente el tejido muscular, que cortado en pedazos regulares, se introdujo en un molino de carne. Cada kilogramo de molido se resuspendió en 4 litros de sacarosa 250 mM, Tris-Cl 5 mM, EDTA 1mM pH 7.4. Se reajustó el pH a 7.4 con Tris-Cl concentrado. Posteriormente el molido se homogeneizó en lotes de 1 litro en el traccionador de células Ultraturmax 182-EN a velocidad máxima durante 4 a 5 minutos, con burbujeo continuo de nitrógeno. El pH se ajustó a 7.4 con Tris concentrado y el homogeneizado se centrifugó a 12 000 g en una centrifuga refrigerada de alta velocidad durante 10 min. Se pasó el sobrenadante por gasa doble y se centrifugó 10 min a 12 000 g eliminándose el precipitado, constituido por células no rotas, núcleos y glóbulos rojos. El sobrenadante se sometió a centrifugación a 26 000 g durante 10 min. El paquete mitocondrial se resuspendió en el mismo medio desprovisto de EDTA y se centrifugó a la misma velocidad durante 10 min. El paquete mitocondrial final se resuspendió en un volumen pequeño de medio sin EDTA, a una concentración aproximada de 50 mg de proteína / ml de suspensión y se congeló a -70 °C en un congelador REVCO durante cuando menos una semana antes de ser utilizadas para las purificaciones posteriores.

##### b) Purificación del factor $F_1$ .

#### Preparación de partículas submitocondriales EDTA.

La purificación de  $F_1$  de mitocondrias de corazón de res, se efectuó según el método de Tuena y Gómez-Puyou (27). Las mitocondrias se suspendieron a una concentración de 20 mg/ml en sacarosa 0.5 M, EDTA 2 mM pH 8.0 y se reajustó el pH a 8.4 con Tris sólido. Se sonicaron en lotes de 50 ml en un sonicador SME mantenidas en baño de hielo, 3 veces durante un minuto con intervalos de un minuto de descanso. Se centrifugaron durante 10 min a 10 000 g y el sobrenadante se centrifugó 60 min a 100 000 g. El precipitado, que contiene las partículas submitocondriales, se resuspendió a una concentración de 30 mg/ml en sacarosa 250 mM, EDTA 2 mM, ATP 2 mM pH 7.5. Las partículas EDTA se almacenaron a -40 °C durante cuando menos 24 horas.

#### Solubilización y Purificación del factor $F_1$ .

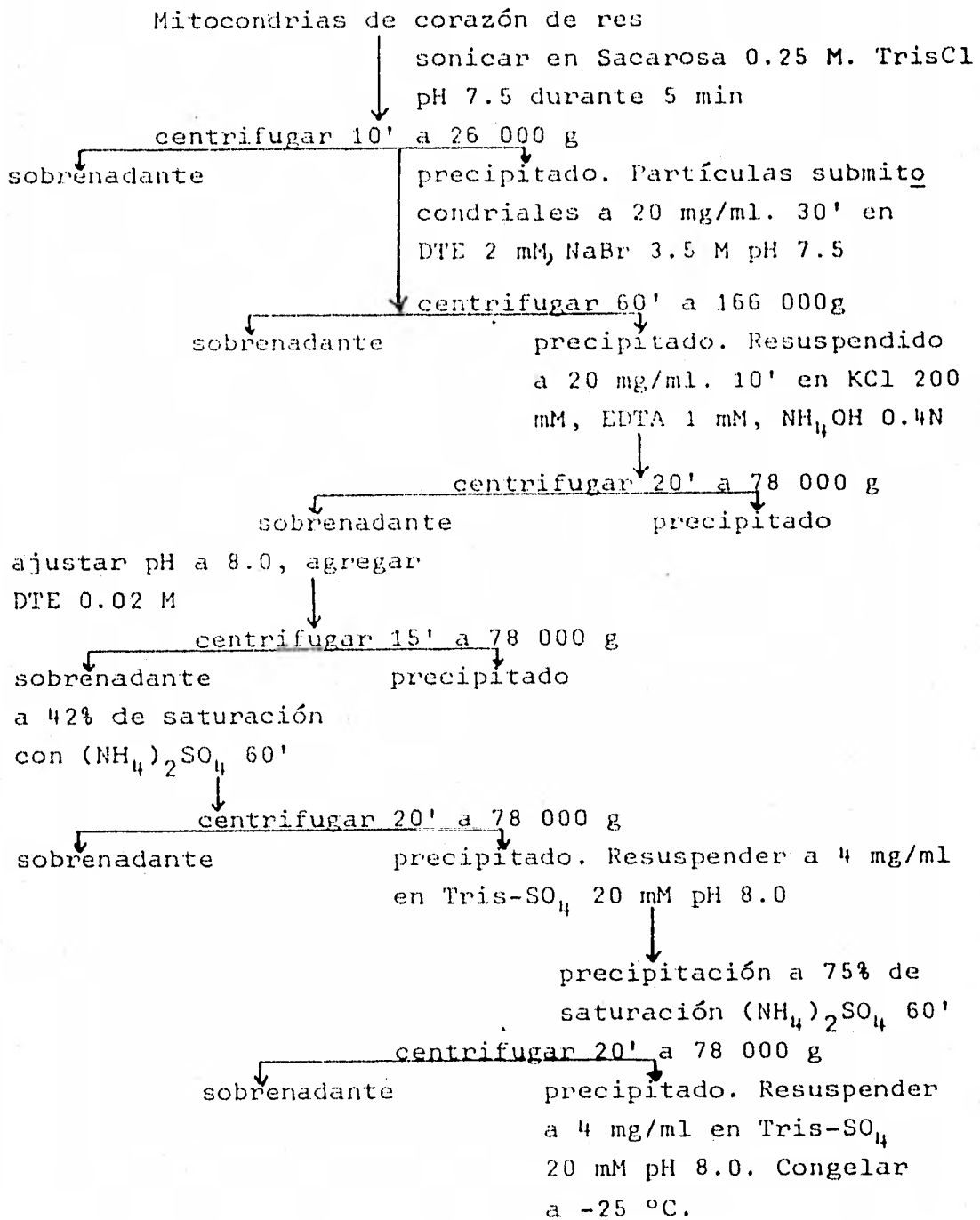
Las partículas se descongelaron y se resuspendieron a 10 mg/ml en medio de sacarosa 150 mM, EDTA 2 mM, ATP 2 mM pH 7.5 y se sonicaron durante 30 min en baño de hielo, en estas condiciones la temperatura asciende a 40 o 45 °C. El sonificado se centrifugó a 105 000 g. El sobrenadante, que contiene el factor  $F_1$  y es de aproximadamente 10 ml, se aplicó a una columna de hexilamina sefarosa 4B, de 1.5 por 20 cm, previamente equilibrada con medio de ATP (sacarosa 150 mM, EDTA 2 mM, ATP 2 mM -- pH 7.4). La columna se lavó con 75 ml del mismo medio y la enzima se eluyó con el mismo medio, adicionado de KCl 1 M. Las fracciones activas se precipitaron con sulfato de amonio y se mantuvieron a 4 °C durante la noche. Al día siguiente la suspensión se centrifugó 15 min a 12 000 g y el precipitado se resuspendió en medio volumen de medio de ATP y se reprecip

pitó con sulfato de amonio a 50% de saturación. La suspensión de la enzima es estable de 3 a 4 meses a 4 °C.

c) Purificación del factor OSCP (Ver diagrama anexo).

Se siguió el método de Senior (28), a partir de mitocondrias de corazón de res. Se resuspendieron 10 g de mitocondrias de corazón de res en 500 ml de sacarosa 0.25 M, Tris-Cl 10 mM pH 7.5 y se sonicaron en lotes de 50 ml en baño de hielo durante 2 min 2 veces con intervalos de un minuto de enfriamiento, en un sonicador SME. El pH se reajustó a 7.5 con NaOH diluida y se centrifugó 10 min a 26 000 g. El precipitado se resuspendió a 20 mg de proteína / ml en el mismo medio. A cada 500 ml de suspensión se agregaron 2 ml de DTT 500 mM en agua y se añadieron 180 g de bromuro de sodio a 3.5 M de concentración final. Se ajustó a pH 7.5 agitando durante 30 min en baño de hielo. La suspensión se centrifugó una hora a 166 000 g y el precipitado obtenido se resuspendió en KCl 200 mM, EDTA 1 mM. A esta solución se le añadió hidróxido de amonio a una concentración final de 0.4 N y se agitó en baño de hielo 10 min. La suspensión se centrifugó a 78 000 g 20 min. Se desechó el precipitado. El sobrenadante se llevó a 42% de saturación con sulfato de amonio sólido, agitando durante 60 min en baño de hielo. Se centrifugó 20 min a 78 000 g y el precipitado se resuspendió en Tris-SO<sub>4</sub> 20 mM pH 8.0 a 4 mg/ml y se llevó a 75% de saturación con sulfato de amonio sólido, volviendo a centrifugar, el precipitado se resuspendió a una concentración de 4 mg/ml en Tris-SO<sub>4</sub> 20 mM pH 8.0 y se guardó en pequeños lotes a -40 °C en un congelador REVCO.

PURIFICACION DE OSCP. Diagrama.

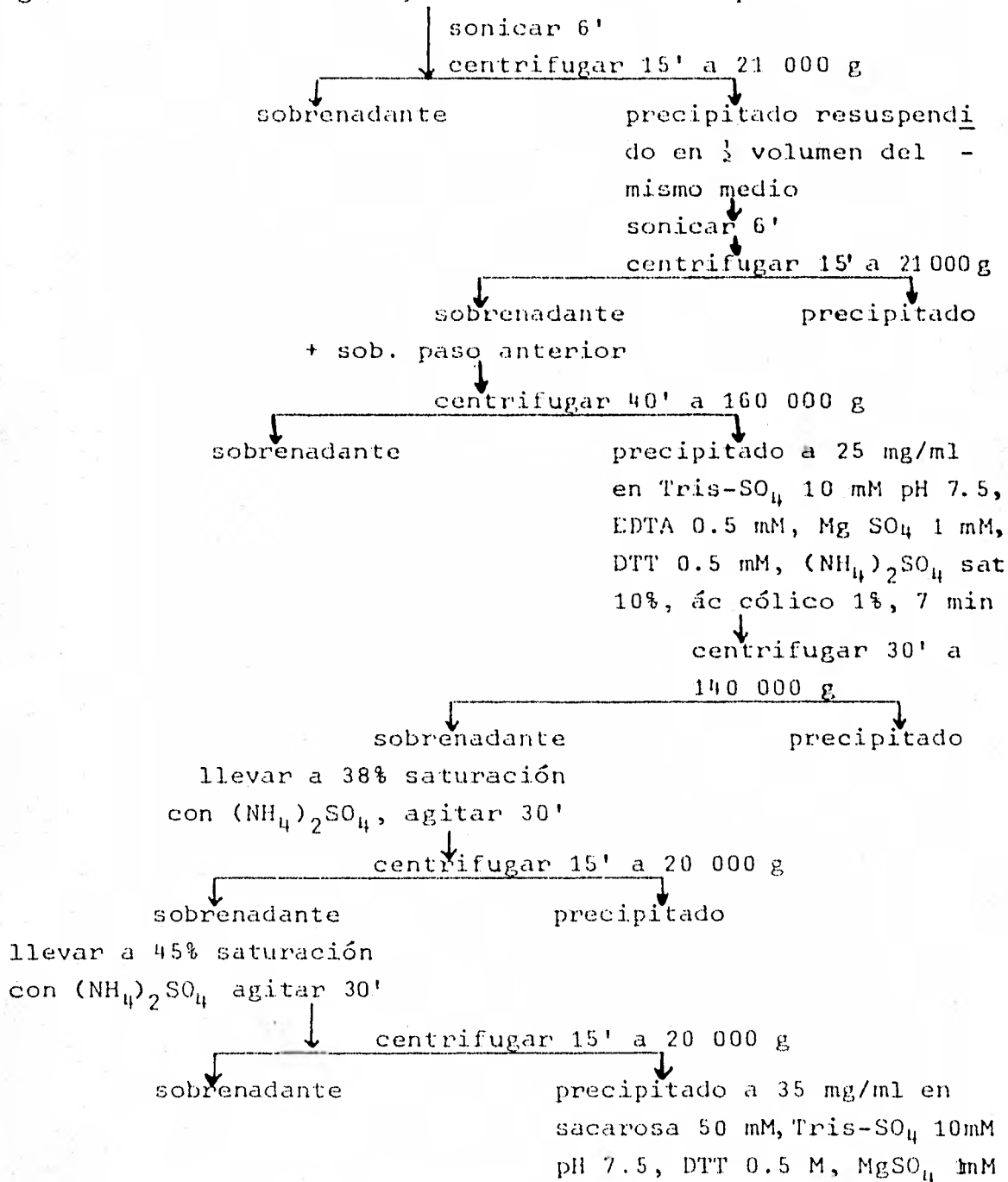


d) Purificación de Inhibidor y  $F_6$  de mitocondrias de corazón de res (Ver diagrama anexo).

Se siguió el método de Kanner y colaboradores (29). A partir de 10 g de mitocondrias de corazón de res resuspendidas a una concentración de 25 mg/ml en sacarosa 250 mM, Tris acetato 10 mM pH 8.0, que se sonicaron en lotes de 40 ml 2 - min 3 veces con intervalos de un minuto de descanso. Se centrifugaron a 21 000 g 15 min. El precipitado obtenido se resuspendió en la mitad del volumen y se resonicó del mismo modo que en el paso anterior. Los sobrenadantes de ambos pasos de sonicación se centrifugaron a 160 000 g 40 min. El precipitado se resuspendió a una concentración de 25 mg/ml en -- Tris-SO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.5, EDTA 0.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, DTT 0.5 mM, sulfato de amonio saturado 10 % y ácido cólico 1%, durante 7 min con agitación en baño de hielo. La suspensión se centrifugó a 140 000 g 30 min. El sobrenadante se precipitó con solución saturada de sulfato de amonio a una concentración final de 38 %. Después de agitar durante dos horas se centrifugó 15 min a 20 000 g. El sobrenadante se llevó a 45% de saturación con sulfato de amonio y se agitó durante 30 min. Se centrifugó nuevamente 15 min a 20 000 g y el precipitado se resuspendió en sacarosa 50 mM, Tris-SO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.5, DTT -- 0.5 M, MgSO<sub>4</sub> 1 mM, a una concentración de 35 mg/ml. La suspensión anterior se calentó a 75 °C en baño María durante 4 min con agitación; se centrifugó a 13 000 g 10 min y el so-

PURIFICACION DE INHIBIDOR Y F<sub>6</sub> DE MITOCONDRIAS DE CORAZON DE RES. Diagrama.

10 g mitocondrias de corazón de res resuspendidas a 35 mg/ml en: sacarosa 250 mM, Tris-acetato 10 mM pH 8.0







brenadante se precipitó con etanol frío al 75% de concentración final agitando vigorosamente durante 30 min. La suspensión se centrifugó 10 min a 13 000 g. El precipitado, que -- contiene la proteína inhibidora, se resuspendió a una concentración de 15 o 20 mg/ml en agua-sosa pH 8.0. El sobrenadante contiene el factor  $F_6$ , que se purificó según el método de Racker (30) evaporando el solvente en un rotavapor Büchl y -- liofilizando. El residuo se resuspendió en sacarosa 0.25 M, EDTA 0.25 M, Tris- $SO_4$  10 mM pH 8.0 y se dializó contra 1 000 volúmenes de Tris- $SO_4$  10 mM pH 8.0 durante 3 a 4 días. Se -- liofilizó a sequedad y se resuspendió a una concentración de 2 mg/ml en sacarosa 0.25 M, EDTA 0.25 mM, Tris- $SO_4$  10 mM pH 8.0, conservándose en lotes pequeños a -40 °C en un congelador REVCO.

e) Preparación de Partículas A (partículas submitocondriales alcalinas).

Se prepararon siguiendo el método de Fessenden y Racker (31), a partir de 540 mg de mitocondrias pesadas resuspendidas a una concentración de 20 mg/ml en un medio que contenía 17 mM EDTA pH 7.4 y sacarosa 46 mM. El pH de la suspensión -- se ajustó a 9.2 con solución fresca de hidróxido de amonio -- 1 M y se sonicó en lotes de 30 ml, mantenidos en baño de hielo, durante un minuto 3 veces con intervalos de 1 min. El -- sonificado se centrifugó 10 min a 26 000 g y se desechó el preci

pitado; el sobrenadante se centrifugó a 104 000 g durante 60 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió mediante homogeneización en 17 ml de sacarosa 200 mM, EDTA 1 mM pH 7.5 y se centrifugó nuevamente a 104 000 g durante 30 min. El precipitado se resuspendió ahora en sacarosa 250 mM y se volvió a centrifugar a 104 000 g. El precipitado, que contiene las partículas A, se resuspendió en sacarosa 250 mM a una concentración de 25 mg/ml. Las partículas A así obtenidas, se mantuvieron a -40 °C en un congelador REVCO durante varias semanas.

f) Preparación de partículas STA (ácido silicotúngstico).

Las partículas STA se prepararon siguiendo el método de Racker (30) a partir de 155 mg de partículas A en 6.2 ml de sacarosa 250 mM, que se fueron agregando gota a gota con agitación a 7.74 ml de una solución fría que contenía sacarosa 150 mM, ácido silicotúngstico al 1% pH 5.5 y Tris-Tes 30 mM pH 7.5 ajustado a 22 °C. La mezcla se mantuvo agitando en baño de hielo durante 6 min y se diluyó con 10 volúmenes de sacarosa 250 mM fría. Se centrifugó 20 min a 120 000 g y el precipitado se resuspendió en medio volumen de sacarosa 250 mM, DTE 5 mM. Se centrifugó por última vez a 12 000 g 20 min y el precipitado, que contiene las partículas STA, se resuspendió en el mismo medio a una concentración de 20 mg/ml y -

se congeló en Nitrógeno líquido en lotes de 0.5 ml, que se almacenaron a  $-40^{\circ}\text{C}$  en un congelador REVCO durante varias semanas.

g) Obtención de anticuerpos.

En colaboración con el M.en C. Georges Dreyfus, que forma parte de nuestro grupo de trabajo, se obtuvieron antisueños en conejo contra las proteínas inhibidora y el factor  $F_6$  de mitocondrias de corazón de res y de levadura.

Protocolo de inmunizaciones:

Se inyectó un conejo en el dorso con una suspensión de 1 mg de antígeno en 1 ml de adyuvante completo de Freund, - seguido de 3 inyecciones intravenosas del antígeno que contenían  $100\ \mu\text{g/ml}$  de solución 0.9% de NaCl estéril con intervalos de 15 días. Una semana después de la cuarta inyección se obtuvo sangre de los conejos mediante punción cardiaca.

Purificación de gamma globulinas:

La sangre de los conejos se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min para permitir la coagulación. Se despegó el coágulo con un separador de madera y el suero se obtuvo mediante centrifugación de la sangre coagulada durante 10 min a 800 g en frío. Las gamma globulinas se obtuvieron mediante la precipitación en frío, con sulfato de amonio saturado y ajustado a pH 7.4 con Tris, a una concentración final de 33% de 2 a 3 veces. El precipitado, que contiene las gamma

globulinas, se separó por centrifugación durante 10 min a -- 800 g. El precipitado se resuspendió en solución de NaCl al 0.9%. Los anticuerpos se guardaron en alícuotas de 1 ml congeladas a -40 °C en un congelador REVCO.

#### Técnicas Utilizadas.

##### a) Electroforesis en geles de acrilamida.

Todos los factores de acoplamiento purificados fueron sometidos a electroforesis en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes para evaluar su estado de pureza y estimar sus pesos moleculares.

Se utilizó la técnica descrita por Laemmli (32) en placas, a concentraciones de 5% de acrilamida y 0.13% de NN'bis metilen-acrilamida, en 0.375 M de Tris-HCl pH 8.8 y 1% de -- SDS en el gel concentrador y 20% de acrilamida y 0.53% de -- NN'-bis-metilen-acrilamida en Tris-HCl 0.375 M pH 8.8 y SDS al 1 % en el gel separador. La polimerización se llevó a cabo por la adición de 0.025% de TEMED y 0.088% de persulfato de amonio fresco. El buffer de los reservorios contenía Tris 0.025 M-glicina 0.192 M pH 8.3 y 1% de SDS. Las proteínas se desnaturalizaron hirviéndolas 3 min en una mezcla de digestión que contenía Tris-HCl 0.0625 M pH 6.8, SDS al 2%, glicero al 10%, 2-mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0.001 % como colorante, el volumen de las muestras fué de -- 0.02 ml. Las placas se corrieron durante 15 hrs aproximada--

mente a 70 mV. Las proteínas se fijaron al gel con ácido tri-  
cloroacético (TCA) al 10% y metanol al 30% durante 30 min y  
fueron teñidas con azul de Coomassie al 0.25% en metanol al  
30%, ácido acético al 7.5% durante 4 hrs a temperatura am-  
biente con agitación suave y desteñidas en la misma solución  
sin colorante, durante 2 hrs.

b) Detección de anticuerpos por doble inmunodifusión.

Se utilizó la técnica de doble inmunodifusión de Ouch-  
terlony (33) en agar-agar al 1% en NaCl al 0.9%. Se usaron -  
diferentes diluciones de los antígenos en los pozos latera-  
les contra una concentración de anticuerpos en el pozo cen-  
tral ó diferentes concentraciones de anticuerpos en los po-  
zos laterales contra una sola concentración del antígeno en  
el pozo central.

Las placas que contenía los antígenos y los anticuerpos  
se dejaron difundir 24 hrs, en cámara húmeda a 5 °C, al cabo  
de las cuales se observaron las bandas de precipitación. Las  
placas fueron lavadas en solución salina 0.9% con 3 cambios  
diarios, secadas con papel filtro Whatman # 4 embebido en la  
misma solución y teñidas con azul de Coomassie al 0.25% en -  
metanol al 30% y ácido acético al 7.5% a temperatura ambien-  
te 10 min y desteñidas con la misma solución sin colorante,  
durante 3 hrs a temperatura ambiente.

c) Análisis de aminoácidos.

Se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Marcos Rodj-kind del CINVESTAV, I.P.N. siguiendo la técnica reportada -- por Miller (34) en un sistema de 4 buffers, modificada por -- Rodjkind y Arellano (comunicación personal).

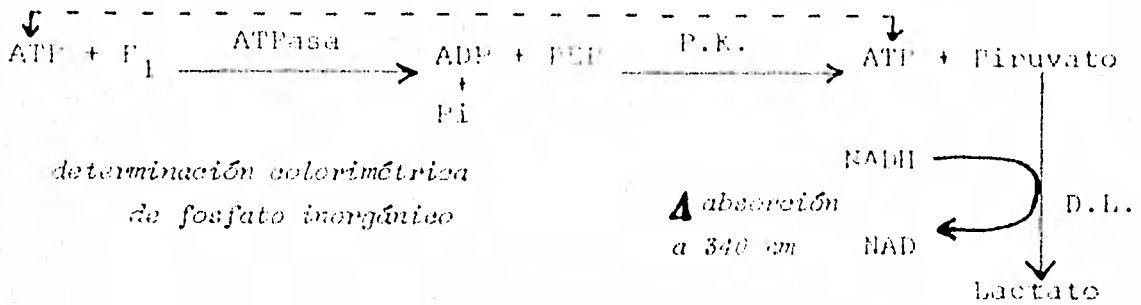
Método espectrofotométrico.

d) Actividad de ATPasa en  $F_1$  soluble.

Se llevó a cabo siguiendo el método de Pullman y colabo\_radores (35), en un sistema enzimático regenerador de ATP a-- coplado a la oxidación de NADH (ver figura # 7), medido es-- pectrofotométricamente a 340 nm. El medio contenía en un vo-- lumen final de 3 ml: 25 mM de Tris-acetato pH 7.4, acetato -- de potasio 30 mM, acetato de Mg 3 mM, fosfoenol piruvato 0.3 mM, ATP-KOH pH 7.4 3 mM, NADH 133 mM, piruvato kinasa 20  $\mu$ g y deshidrogenasa láctica 20  $\mu$ g ambas en solución de sulfato de amonio al 50%. A esta mezcla se le añadieron cantidades -- variables de 1 a 10  $\mu$ g de enzima  $F_1$  y se siguió la actividad a 340 nm en un registrador Sargeant Welch Modelo DSRLG aco-- plado a un espectrofotómetro Zeiss PQ II.

Para medir la actividad de ATPasa en partículas submito\_ condriales (SMP) se utilizó el mismo medio, adicionado de 10  $\mu$ g de rotenona en etanol al 96% para evitar la reoxidación -- del NADH por la cadena de transporte de electrones. La acti-- vidad se calculó utilizando la siguiente fórmula:

Figura # 7. ESQUEMA DE LAS REACCIONES ACOPLADAS PARA EL SISTEMA REGENERADOR DE ATP EN LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa.





$$\text{Actividad específica} = \frac{\Delta \text{ D.O.} \times 3 \text{ ml} \times \text{min}}{6.22 \times \text{mg de proteína}}$$

en donde  $\Delta$  D.O. es el cambio en densidad óptica registrado a 340 nm y 6.22 es el coeficiente de extinción molar del -- NADH.

e) Actividad de la proteína inhibidora en  $F_1$  soluble.

Se preincubaron durante 10 min a 30 °C, entre 5 y 25  $\mu\text{g}$  de  $F_1$  en presencia de diferentes concentraciones de proteína inhibidora, en un volumen final de 100  $\mu\text{l}$  de un medio que contenía 2 mM de Tris-Mes pH 6.8, 0.5 mM de Mg-acetato-ATP pH 6.8. La actividad de ATPasa residual se midió espectrofotométricamente con alícuotas de 25  $\mu\text{l}$  de la mezcla de preincubación. La actividad del inhibidor se expresó como  $\mu\text{g}$  de inhibidor que producen 50% de inhibición a 0.2 unidades de actividad ATPasa medidas por cambio de densidad óptica por minuto.

Método colorimétrico.

f) Actividad ATPasa en  $F_1$  soluble.

La reacción se llevó a cabo en 1 ml del medio utilizado para la medición espectrofotométrica, sin adicionar deshidrogenasa láctica ni NADH. La incubación se realizó a - -

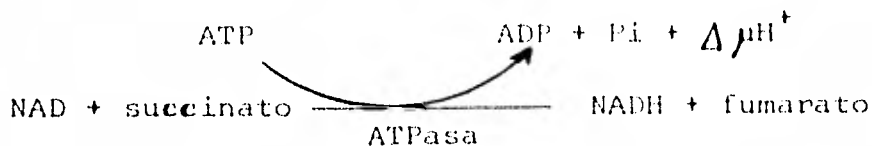
30 °C durante 10 min y la reacción se detuvo adicionando ácido tricloroacético a una concentración final de 6%; se detectó el fósforo inorgánico producido por la hidrólisis del ATP siguiendo el método colorimétrico de Summer (36). En un volumen de 5 ml se adicionaron a concentraciones finales, Molibdato de amonio al 0.6%, ácido sulfúrico 0.75 N y sulfato ferroso al 4%. El desarrollo de color después de 10 min a temperatura ambiente, se cuantificó en un colorímetro Klett-Sumerson utilizando filtro rojo.

g) Actividad de ATPasa en partículas submitocondriales.

Se utilizaron aproximadamente 200  $\mu$ g de partículas submitocondriales y se siguió la técnica descrita para  $F_1$  soluble hasta el paso de precipitación con TCA. La suspensión se centrifugó 10 min a 3 000 rpm en una centrífuga clínica y la determinación de fosfato inorgánico liberado se llevó a cabo con una alícuota del sobrenadante de TCA.

h) Reducción de NAD dependiente de ATP en partículas reconstituídas.

Se siguió el método descrito por Epstein y col (37) midiendo espectrofotométricamente la reducción de NAD por succinato debida a una "reversa del transporte de electrones" - dependiente de la hidrólisis del ATP por la ATPasa.



Se reconstituyeron 500  $\mu\text{g}$  de partículas A o STA con diferentes concentraciones de los factores de acoplamiento  $F_1$ , OSCP y  $F_0$  agregados en ése orden, en 100  $\mu\text{l}$  del siguiente medio: Albúmina bovina libre de ácidos grasos 10 mg/ml, acetato de Mg 1.5 mM, ATP 1.5 mM pH 7.4, Tris-acetato 5 mM pH 7.4, sacarosa 125 mM en concentraciones finales. Se incubaron 20 min a 30 °C y se agregó 1 ml del siguiente medio  $\text{MgSO}_4$  10 mM, succinato-Tris pH 7.5 20 mM, Tris-acetato pH 7.4 150 mM y albúmina bovina libre de ácidos grasos 1 mg. Se adicionaron secuencialmente a la cubeta: 1.4 ml del mismo medio, NAD 1.5 mM disuelto en Tris-acetato 25 mM pH 7.4 y 1.6 mM de una solución fresca de KCN en Tris-acetato 25 mM pH 7.4 y se midió la producción de NADH a 340 nm durante 2 min hasta que la lectura se estabilizó. La reacción se arrancó con 5 mM de ATP pH 7.4 y se calculó la actividad mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\Delta\text{DO} \times \text{min} \times 3 \text{ ml}}{6.22 \times \text{mg de proteína}} = \frac{\mu\text{moles de NADH producidos}}{\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}}$$

i) Reconstitución de partículas A de corazón de res.

Se preincubaron 20 min a 30 °C, 500  $\mu\text{g}$  de partículas A,

en 1 ml de un medio que contenía: 40 mg de albúmina bovina - libre de ácidos grasos, 6 mM de acetato de Mg, 6 mM de ATP - pH 7.4 y sacarosa 250 mM, adicionadas de 100  $\mu$ g de  $F_1$  en --- Tris-acetato 25 mM pH 7.4, diferentes cantidades de factor - OSCP entre 5 y 100  $\mu$ g en el mismo medio y factor  $F_6$  de corazón o de levadura entre 20 y 50  $\mu$ g. Esta suspensión se adicionó a la cubeta del espectrofotómetro para medir la reducción del NAD.

j) Reconstitución de partículas STA de corazón de res.

Se preincubaron durante 20 min a 30 °C en un volumen de 200  $\mu$ l: 500  $\mu$ g de partículas STA, 100  $\mu$ g de  $F_1$ , 50  $\mu$ g de OSCP y cantidades variables entre 25 y 50  $\mu$ g de factor  $F_6$  de mitocondrias de corazón de res o de levadura y esta mezcla se adicionó a la cubeta del espectrofotómetro para medir la reducción del NAD.

k) Filtración de  $F_1$ .

La  $F_1$  empleada en las reconstituciones se procesó para eliminar el sulfato de amonio, siguiendo el método descrito por Penefsky (38). Se centrifugaron 15 min a 6 000 rpm en - una centrífuga clínica a temperatura ambiente, alícuotas de la suspensión de la enzima en 50% de sulfato de amonio. El precipitado se resuspendió en un volumen pequeño, aproximadamente 100  $\mu$ l, de Tris-acetato 25 mM pH 7.4 y se pasó por

Sefadex G-50 fino, equilibrado en el mismo medio y montado en jeringas de plástico de 1 ml de capacidad, previamente empacadas por centrifugación durante 1'55" a 500 rpm en una centrífuga clínica. La suspensión de  $F_1$  se agregó a las columnas y se recentrifugó dentro de un tubo de ensaye a la misma velocidad anterior. La enzima ya equilibrada en Tris-acetato 25 mM pH 7.4 sale en el volumen de exclusión de la columna y el sulfato de amonio se retiene.

l) Fijación de  $F_1$  en partículas STA de corazón de res.

Se utilizaron 200  $\mu$ g de partículas STA en un volumen de 500  $\mu$ l que contenía: sacarosa 250 mM, EDTA 0.25 mM, Tris  $SO_4$  10 mM pH 8.0, 40  $\mu$ g de albúmina bovina libre de ácidos grasos, diferentes concentraciones de  $F_1$  entre 10 y 120  $\mu$ g sola y adicionada de distintas cantidades de OSCP y  $F_6$  durante 30 min a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó 15 min a 25 000 g a temperatura ambiente y se midió la actividad de ATPasa en alícuotas del sobrenadante. El porcentaje de  $F_1$  fijada a la partícula se calculó restando de la actividad total, la encontrada en el sobrenadante:

$$\% \text{ de fijación} = \left( \frac{\text{actividad total} - \text{actividad en el sobrenadante}}{\text{actividad total}} \right) \times 100$$

m) Fijación de  $F_1$  sensible a oligomicina en partículas STA de corazón de res reconstituídas.

Las partículas STA se reconstituyeron en diferentes medios con concentraciones variables de  $F_1$  sola y adicionada de distintas concentraciones de OSCP y  $F_6$ . Se preincubaron 10 min a temperatura ambiente; posteriormente se les adicionó oligomicina en proporción de 25  $\mu\text{g}$  por mg de partículas o su equivalente en volumen de etanol y se incubaron 5 min a 30 °C con agitación, al cabo de los cuales se agregó 1 ml del medio para medir ATPasa colorimétricamente, se incubó 10 min y se detuvo la reacción con TCA al 6% final. Se determinó fosfato inorgánico en la suspensión total o en el sobrenadante de la misma, después de haber sido centrifugada 10 min a 6 000 rpm en una centrífuga clínica.

Los resultados se calcularon midiendo la absorción de 0.5  $\mu\text{moles}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como referencia, utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Unidades Klett} - T_0) \times 0.5 \mu\text{moles}}{\text{lectura standard} \times \text{mg de proteína}} = \mu\text{moles ATP hidrolizados en } 10' / \text{mg}$$

Los resultados de las tablas se expresan como:

$$\begin{array}{l} \text{nmoles ATP hidrolizados} \\ \text{sensibles a oligomicina} \end{array} = \begin{array}{l} (\text{nmoles ATP hidrolizados} \\ \text{con etanol}) - (\text{nmoles ATP} \\ \text{hidrolizados con oligomi-} \\ \text{cina}) \end{array}$$

n) Determinación de proteína.

Se siguió el método descrito por Gornall y col (39) - con el reactivo de Biuret en partículas submitocondriales

y mitocondrias y el método de Lowry (40) para factores de a coplamiento, usando en ambos casos albúmina de bovino fracción V como standard.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

a) Purificación de Inhibidor y  $F_6$  de mitocondrias de levadura (Ver diagrama anexo).

En las tablas I A y B, se muestran los diferentes pasos de purificación de la proteína inhibidora y la obtención del factor  $F_6$  siguiendo el método motivo de este trabajo.

1) Obtención de extracto crudo.

Inducción de la síntesis de la proteína inhibidora.

Una muestra de 1 800 g de levadura *Saccharomyces* sp. comercial para panadería (Levitan y Flor S.A.), se homogeneizó en licuadora con 800 ml de medio de cultivo estéril consistente en: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, 3% de etanol, 4% de glicerol. Se aerearon durante 20 hrs a temperatura ambiente mediante un pulverizador de aire. La inducción de la síntesis de la proteína inhibidora en presencia de los sustratos oxidables etanol y glicerol, ha sido demostrada en -- nuestro laboratorio en el trabajo desarrollado por el Médico Cirujano Angel Nava, quien forma parte de nuestro grupo de -- trabajo.

Posteriormente las células se lavaron 2 veces con 800 ml de agua destilada centrifugando a 5 000 g 8 min. Se resuspendieron en 800 ml de agua y se calentaron a 85 °C durante 20 min con agitación, enfriando después en baño de hielo. Se continuó agitando durante la noche a 4 °C en el cuarto frío.



PURIFICACION DE INHIBIDOR Y  $\Gamma_6$  DE MITOCONDRIAS DE LEVADURA.  
Diagrama.

Homogeneizar 900 g de levadura de panadería en licuadora, en 800 ml de medio de cultivo estéril (1% extracto de levadura, 2% peptona, 3% etanol, 4% glicerol) aerar 20 hrs a temperatura ambiente

↓  
lavar las células 2 veces con 800 ml de agua destilada  
resuspender en 800 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada, calentar a - 85 °C durante 20' con agitación

↓  
enfriar en baño de hielo y agitar a 4 °C durante 14 hrs

↓  
centrifugar a 5 000 g 10'

↓  
sobrenadante

↓  
precipitado

↓  
centrifugar a 12 000 g 10'

↓  
sobrenadante

↓  
precipitado

↓  
filtrar por gasa  
(extracto crudo)

↓  
precipitar con TCA 10% final  
2' con agitación energética

↓  
centrifugar 10' a 12 000 g

↓  
sobrenadante

↓  
precipitado, resuspender en H<sub>2</sub>O a 20 o 30 mg/ml. Ajustar pH a 7.5 con KOH

↓  
centrifugar 10' a 20 000 g

↓  
sobrenadante

↓  
precipitado

↓  
filtrar por gasa, ajustar  
proteína a 20 o 30 mg/ml

↓  
precipitar a 75% de etanol frío, agitar 2' en baño de hielo

↓  
centrifugar 10' a 20 000 g

↓  
sobrenadante

↓  
precipitado

(factor  $\Gamma_6$ )

(Proteína Inhibidora)

sobrenadante (F<sub>6</sub>)  
↓  
concentrar en rotavapor  
en baño María a 40 °C  
↓  
liofilizar  
↓  
resuspender en sacarosa 0.25 M,  
EDTA 0.25 mM, Tris-SO<sub>4</sub> 10 mM  
pH 8.0  
↓  
dializar contra 1000 vol  
de Tris-SO<sub>4</sub> 10 mM pH 8.0  
de 3 a 4 días  
↓  
liofilizar  
↓  
resuspender en sacarosa 0.25M,  
EDTA 0.25 mM, Tris-SO<sub>4</sub> 10 mM  
pH 8.0 a 2 mg/ml  
↓  
conservar en lotes pequeños  
a -40 °C en congelador REVCO.

precipitado (Inhibidor)  
↓  
resuspender en H<sub>2</sub>O a  
20 o 30 mg/ml  
↓  
centrifugar 20' a 20 000 g  
↓  
sobrenadante      precipitado  
↓                      ↓  
filtrar por gasa      filtrar por gasa  
↓                      ↓  
extraer con 1 vol de  
cloroformo-metanol 2:1  
↓  
agitar 5'  
↓  
centrifugar a 26 000 g 10'  
↓                      ↓  
fase solventes      fase acuosa  
↓                      ↓  
ajustar pH  
a 8.5 (KOH)  
↓  
adsorción a 25 g de  
DEAE-celulosa (Whatman 52)  
equilibrada con 50 mM Tris  
acetato pH 8.5, 30' a tem-  
peratura ambiente  
↓  
filtrar en embudo Büchner  
↓  
concentrar en filtro Amicón  
YM-5, ajustar pH a 7.0 con -  
ácido acético  
↓  
adsorber en columna de CM-ce-  
lulosa, eluir con gradiente  
de KCl  
↓  
concentrar fracciones activas  
con Amicón YM-5.

Tabla I-A. Purificación de Proteína Inhibidora de mitocondrias de levadura.

Fracción	Proteína total (mg)	Actividad específica (unidades/mg proteína)
1. Extracto crudo	7472	1.00
2. Precipitación TCA	1083	5.05
3. Precipitación etanol	657	5.67
4. Cloroformo/metanol	514	6.57
5. Mezcla DEAE-celulosa	127	16.59
6. Cromatografía CM-celulosa	1.48	285.20

La purificación se hizo a partir de 1 800 g de levadura comercial para panadería. Las fracciones del inhibidor se midieron con  $F_1$  pura de levadura, con actividad específica de  $90 \mu\text{moles Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$  utilizando como unidad de  $F_1$  el cambio de 0.2 de densidad óptica en 1 min. La unidad de inhibidor se definió como mg de inhibidor que produjeron un 50% de inhibición a una unidad de  $F_1$ , tomando como 1.00 el extracto crudo.

Tabla I-B. Purificación del factor  $F_6$  de mitocondrias de levadura.

Fracción	Proteína total (mg)
1. Extracto crudo	7472
2. Extracto etanólico	217
3. Liofilizado	63

La purificación se hizo a partir del extracto crudo mencionado en la Tabla I-A.

La suspensión se centrifugó a 5 000 g durante 10 min. El sobrenadante se centrifugó 10 min a 12 000 g y se filtró por gasa, obteniéndose así el extracto crudo. Este extracto contiene péptidos de bajo peso molecular resistentes al calor como el factor  $F_6$ , la proteína inhibidora de la ATPasa y algunos inhibidores de proteasas (41). En este paso se desnaturaliza el 85% de las proteínas celulares, lo que permite obtener un extracto crudo enriquecido en la proteína inhibidora y el factor  $F_6$ .

## 2) Precipitación con ácido tricloroacético (TCA).

El extracto crudo, en hielo, se agitó fuertemente mientras se mezclaba con TCA 100% para dar una concentración final de 10%, se continuó la agitación energética durante 2 min. La suspensión se centrifugó a 12 000 g 10 min y el precipitado se resuspendió en agua ajustando el pH a 7.5 con KOH y se centrifugó por segunda vez 10 min a 20 000 g. El sobrenadante se ajustó a una concentración de proteína entre 20 y 30 mg/ml. En este paso de purificación se utilizó la propiedad de resistencia a la precipitación por ácido que presentan la proteína inhibidora y el factor  $F_6$ , lo cual permite eliminar al 90% de la proteína restante del paso anterior.

El valor de 217 mg de proteína en la extracción con etanol reportado en la Tabla I-B, debe ser tomado en cuenta como un valor posiblemente erróneo ya que en este extracto eta

nólico existen lípidos en gran cantidad, que alteran la deter  
minación de proteína (42). El rendimiento final de  $F_6$  fué a--  
proximadamente de 63 mg.

4) Extracción con cloroformo-metanol.

El precipitado del paso anterior, que contiene la proteí  
na inhibidora, se resuspendió en agua a una concentración de  
proteína de 20 o 30 mg/ml. La suspensión se centrifugó 20 min  
a 20 000 g y el sobrenadante se filtró por gasa. La solución  
anterior se mezcló con un volumen de cloroformo-metanol 2:1 -  
agitando fuertemente durante 2 min. Se centrifugó a 26 000 g  
20 min y la fase acuosa, que contiene al inhibidor, se ajustó  
a pH 8.5 con KOH a 20 o 30 mg/ml.

5) Adsorción a DEAE-celulosa.

Aproximadamente 25 g de DEAE-celulosa (52 Wathman), se -  
hidrataron en Tris-acetato 50 mM pH 8.5, DTE 1 mM y se mezcla  
ron con la fase acuosa agitando 30 min a temperatura ambiente  
y se filtraron después por un embudo Büchner. El filtrado, --  
que contiene al inhibidor, se concentró en filtros de Amicón  
YM-5 y el pH de la solución se reajustó a 7.0 con HCl.

6) Separación en columna de Carboximetil-celulosa (CM-ce  
lulosa).

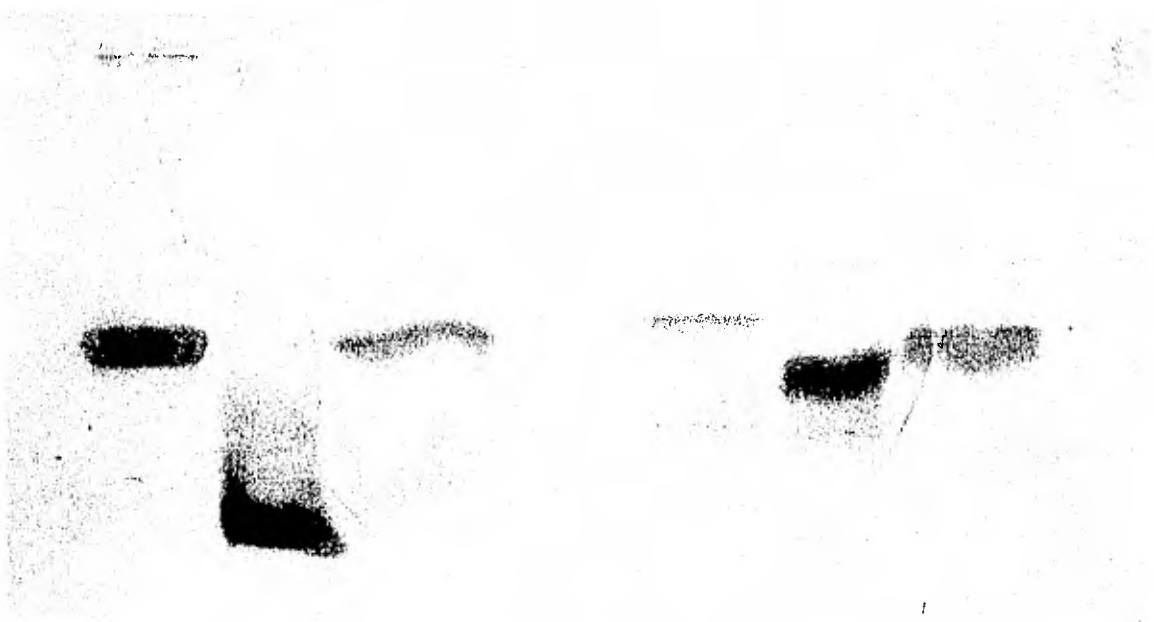
Se usó una columna de 10 x 2.5 cm de CM-celulosa (Wathman), equilibrada con buffer de acetato de potasio 40 mM, -- EDTA 1 mM, DTE 1 mM pH 7.2, con una conductividad de 4 m $\Omega$ . - Después de aplicar la muestra, la columna se lavó con el medio de equilibrio hasta que no hubiera proteína en el lavado. La proteína adsorbida se eluyó con un gradiente de KCl de 0 a 80 mM con conductividad de 20 m $\Omega$ . Se colectaron fracciones de 3 ml y el inhibidor se rastreó midiendo su actividad inhibitoria en F<sub>1</sub> de mitocondrias de levadura. Las fracciones activas se juntaron y se concentraron en Amicón YM-5.

La metodología descrita presenta grandes ventajas, ya que utilizando pasos sencillos y reproducibles y a partir de células enteras inducidas, es posible obtener una preparación con alta actividad específica y alto rendimiento de dos importantes proteínas mitocondriales: el inhibidor de la ATPasa y el factor F<sub>6</sub>.

b) Determinación de peso molecular.

El grado de pureza y el peso molecular del inhibidor de la ATPasa y del factor F<sub>6</sub>, se determinó en geles de poliacrilamida en SDS. La figura 8 muestra que con el método de purificación empleado, se obtienen ambas proteínas en estado homogéneo; sin embargo el peso molecular de la F<sub>6</sub> de levadura es - con mucha frecuencia el doble del esperado, ya que la F<sub>6</sub> de - mitocondrias de corazón de res pesa 6 800 daltones y la de le

A



B



Figura # 8. ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA CON SDS.

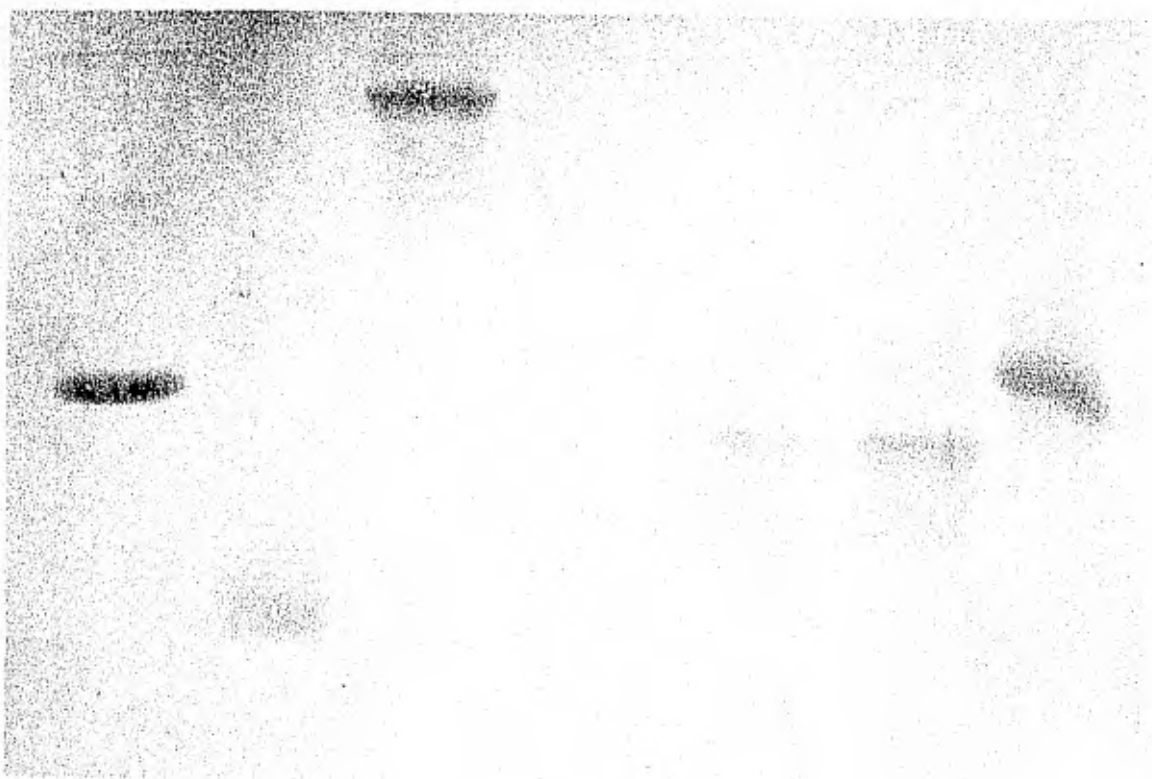
Todos los carriles contienen 20  $\mu$ g de las siguientes proteínas:  
A. 1) Citocromo c, 2) Insulina, 3) y 4)  $F_6$  de mitocondrias de co  
razón de res, 5)  $F_6$  de mitocondrias de levadura, 6) Inhibidor de  
la ATPasa de mitocondrias de levadura, 7) Inhibidor de la ATPasa  
de mitocondrias de corazón de res.  
B. 1) Citocromo c, 2) Insulina, 3) Ovoalbúmina, 4)  $F_6$  de mitocon  
drias de levadura, 5) Inhibidor de mitocondrias de levadura, 6)  
Inhibidor de mitocondrias de levadura, 7) Ribonucleasa.



A



B



vadura 12 500, por lo que es posible suponer que aún en condiciones completamente desnaturalizantes, como son la presencia de SDS y de 2-mercaptoetanol, la proteína pueda estar en forma dimérica. Esto es frecuentemente observado en proteínas con cierto grado de hidrofobicidad, como es el caso de la  $F_6$ . Existe sin embargo el antecedente de que ha sido posible observar en geles de 20% de acrilamida la forma monomérica de peso molecular 6 300.

c) Composición de aminoácidos.

Otro criterio de pureza y semejanza estructural entre la  $F_6$  de mitocondrias de levadura y la de corazón de res, -- puede verse en la Tabla # 2, que muestra similitudes significativas en la composición de aminoácidos, ya que ambas contienen un 59 % de aminoácidos no polares, lo cual las coloca entre las proteínas con alto grado de hidrofobicidad. La proporción de restos aminoácidos cargados negativamente es de 29.8% en la de levadura y un 26.5% en la de corazón de res; la proporción de restos con carga positiva es de 10.5% y --- 14.3% respectivamente. El peso molecular mínimo calculado es ligeramente más alto en la de levadura, 7 110 con 57 residuos, que en la de corazón de res, que tiene un peso molecular de 6 375 y un menor número de residuos.

La Tabla # III resume las diferencias y semejanzas entre los factores  $F_6$  provenientes de ambos orígenes.

Tabla II. Composición comparativa de aminoácidos de  $F_6$  de mitocondrias de levadura y de corazón de res.

Aminoácido	# de residuos	
	$F_6$ de levadura	$F_6$ de corazón de res
Lisina	4	5
Histidina	1	-
Arginina	1	2
Acido aspártico	8	5
Acido glutámico	9	8
Treonina	3	4
Serina	3	4
Prolina	3	3
Glicina	7	4
Alanina	5	2
Cistina (1)	1	-
Valina	3	3
Isoleucina	2	1
Leucina	3	3
Tirosina	2	2
Fenilalanina	2	3
número total de aminoácidos	57	49
Peso molecular mínimo calculado	7110	6375
Peso molecular en gel de SDS	12500	6800

Tabla III. Diferencias y semejanzas entre los factores F<sub>6</sub>  
de mitocondrias de corazón de res y de levadura.

Factor F <sub>6</sub>	Peso molecular en SDS por aa		# de residuos	% de aminoácidos		
				no po lares	-	+
corazón	6 800	6 375	49	59	29.8	10.5
levadura	6 300	7 110	57	59	26.5	14.3
	12 500					

d. Pruebas Inmunológicas.

Para evaluar las similitudes estructurales de los factores  $F_6$  estudiados, se utilizó el criterio de cruza inmunológica, para lo cual se produjeron anticuerpos en conejo contra ambas proteínas. La figura 9-A muestra que los anticuerpos producidos, cruzan inmunológicamente contra sus antígenos homólogos; pero no con los heterólogos. La imposibilidad para demostrar cruza inmunológica a pesar de las semejanzas estructurales y aún funcionales, fué también observada en el caso de la proteína inhibidora purificada de mitocondrias de levadura, comparada con la proveniente de mitocondrias de corazón de res (figura 9-B). Por lo que es posible suponer diferencias sutiles entre los determinantes antigénicos de ambas estructuras, que sólo el criterio inmunológico, con alto grado de especificidad, puede detectar.

Es importante además, considerar que la comparación se está realizando entre organismos muy alejados en la escala filogenética en los que, a pesar de que la evolución ha mantenido esencialmente las mismas estructuras para realizar la misma función, como es el caso del complejo OS-ATPasa que presenta un patrón de estructura similar tanto en bacterias, como en cloroplastos y mitocondrias (13), existen entre sus componentes, pequeñas diferencias en la secuencia de aminoácidos y por ende en la estructura terciaria de las proteínas

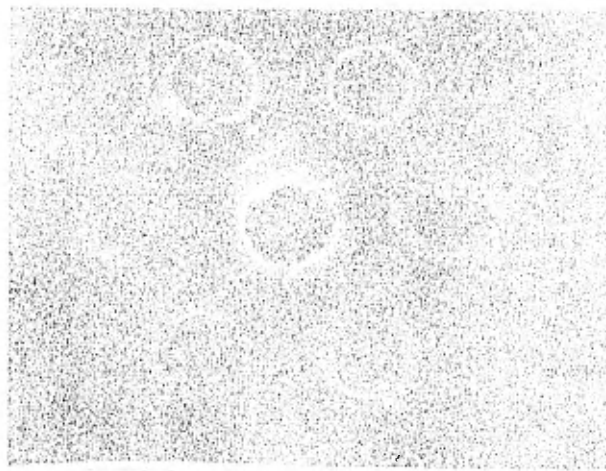


Figure 1. Two circular structures, possibly cells or nuclei, in a field of view.

### B. [Illegible Title]

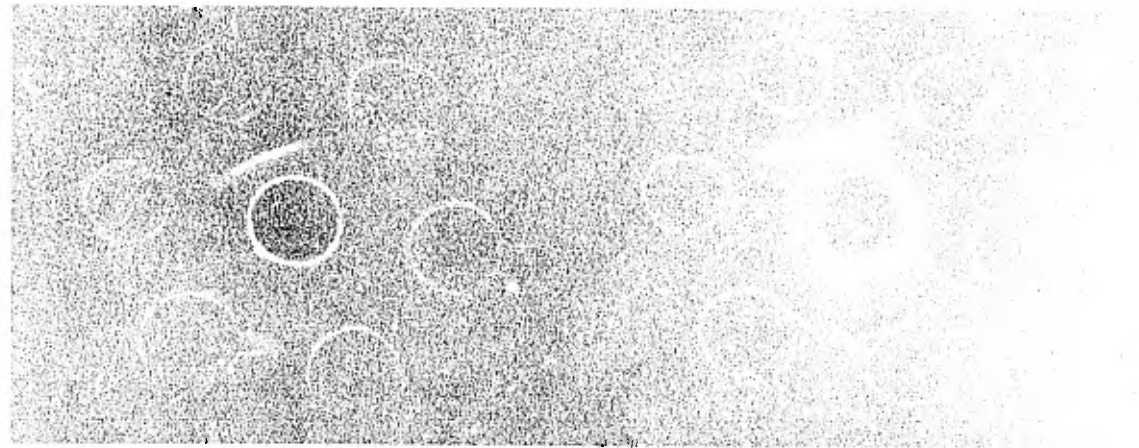


Figure 2. Several circular structures, some appearing to be in a cluster or chain.

de distintos orígenes, que solamente los anticuerpos han podido demostrar.

e) Pruebas de funcionalidad.

La función hasta ahora atribuida al factor  $F_6$  no está bien definida, por lo que el estudio comparativo del factor purificado de mitocondrias de levadura con el de mitocondrias de corazón, es importante para demostrar su identidad y posteriormente conocer el posible papel que desempeña en la complejidad de la fosforilación oxidativa.

Se ha observado que el factor  $F_6$  es necesario junto -- con los factores de acoplamiento  $F_1$  y OSCP o proteína que confiere sensibilidad a oligomicina, para la reconstitución de la fosforilación oxidativa (19), la reacción de recambio  $^{32}\text{P}$ -ATP, la reducción de NAD por succinato dependiente de - ATP (20) y la reconstitución de la actividad ATPasa sensible a oligomicina (19). Debido a que todas estas reacciones han demostrado ser dependientes de  $F_6$  y a que la proteína no presenta ninguna actividad enzimática, se le ha atribuido una función estructural definida como el "factor de unión" junto con la OSCP y el factor B (43) entre el segmento catalítico o  $F_1$  y el segmento hidrofóbico o  $F_0$ .

Se ha observado que en las pruebas de reconstitución a partir de diferentes factores solubles, el orden de adición es importante para obtener la máxima actividad de la ATPasa

sensible a oligomicina (44). En nuestro trabajo estudiamos este parámetro encontrando que el orden de adición que produce mayor eficiencia en la reconstitución es el de SMP,  $F_1$ , OSCP y  $F_6$ .

1) Reducción de NAD por succinato dependiente de ATP.

La tabla IV muestra la reconstitución en partículas A, carentes de OSCP y  $F_1$ , de la reducción de NAD por succinato dependiente de ATP. La reacción es claramente dependiente de OSCP; el factor  $F_6$  de ambos orígenes no tiene efecto, posiblemente porque las partículas utilizadas no fueron despojadas de él durante su preparación.

La tabla V muestra el efecto del factor  $F_6$  en la misma reacción en partículas STA de corazón de res, despojadas de OSCP,  $F_1$  y  $F_6$ . El efecto en la reconstitución de la reacción estudiada es bastante significativo, a pesar de que las partículas presentan una notable baja en la actividad, debido a que con el tratamiento drástico para remover  $F_6$ , se remueve también la deshidrogenasa succínica (45), que interviene directamente en la reacción (Ver figura 10).

La efectividad de ambas proteínas para reconstituir es bastante similar y ligeramente mayor con el factor  $F_6$  homólogo. Las concentraciones altas de los factores generalmente tienen efectos inhibitorios de la función, como puede verse en la tabla V. La interpretación de estos datos no es



Tabla IV. Reducción de NAD por succinato dependiente de ATP en partículas A reconstituídas.

Factor adicionado ( $\mu\text{g}$ )			nmoles NADH $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$
$F_1$	OSCP	$F_6$	
---	---	---	2.4
100	---	---	0.48
100	10	---	2.4
100	25	---	18.8
100	50	---	65.1
100	100	---	50.6
100	100	20 corazón	46.8
100	100	20 levadura	42.9

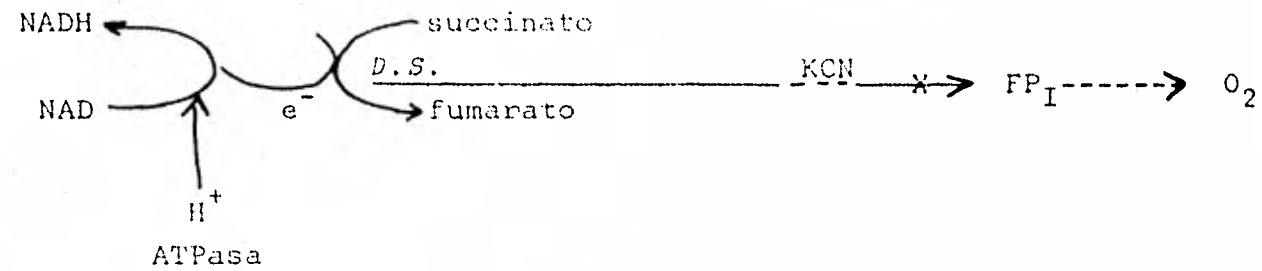
Las reconstituciones se llevaron a cabo con 500  $\mu\text{g}$  de partículas submi<sub>to</sub>condriales A, 100  $\mu\text{g}$  de  $F_1$ , diferentes concentraciones de OSCP, 20  $\mu\text{g}$  de  $F_6$ , siguiendo ese orden de adición. Se incubó 20 min a 30 °C en un volumen final de 1.1 ml.

Tabla V. Reducción de NAD por succinato dependiente de ATP en partículas reconstituidas.

Factor adicionado ( $\mu\text{g}$ )			nmoles NADH $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$
$F_1$	OSCP	$F_6$	
100	50	---	5.3
100	100	---	6.3
100	50	25 corazón	13.9
100	50	50 corazón	10.1
100	50	25 levadura	11.1
100	50	50 levadura	3.8

La reconstitución se llevó a cabo con 500  $\mu\text{g}$  de partículas STA en presencia de 100  $\mu\text{g}$  de  $F_1$  y cantidades variables de OSCP y  $F_6$  en ese orden de adición. Se incubó 20 min a temperatura ambiente en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ .

Figura # 10. Reducción de NAD por succinato, dependiente de ATP.



sencilla; pero muestra que se requiere cierta estequiometría, aún no conocida, para que la reconstitución se lleve a cabo y que cuando los factores de acoplamiento se encuentran en exceso, probablemente fijos en sitios inespecíficos, pueden alterar la correcta estructuración de los segmentos que sí toman parte en la función.

2) Fijación de  $F_1$  a partículas STA.

La fijación de  $F_1$  a partículas STA se estudió en función de los diferentes factores de acoplamiento  $F_1$ , OSCP y  $F_6$  de ambos orígenes.

En la tabla VI se ilustra el efecto de diferentes concentraciones de  $F_1$  en la fijación de este factor a partículas STA; las concentraciones de 20  $\mu\text{g}$  de  $F_1$  añadidas a 200  $\mu\text{g}$  de partículas resultan saturantes y las concentraciones mayores bajan notablemente la fijación. La saturación con 20  $\mu\text{g}$  está de acuerdo con la cantidad calculada de sitios de fijación de  $F_1$ , que es aproximadamente el 10% de la proteína membranal (46).

En la tabla VII se muestran los requerimientos del factor OSCP en la fijación de  $F_1$  a partículas STA. Nuevamente se observa que las partículas fijan más  $F_1$  en concentraciones bajas de OSCP y que a concentraciones altas de alguno de los factores, la fijación disminuye. La tabla confirma que las partículas carecen de OSCP y que la función de este

Tabla VI. Fijación de  $F_1$  a partículas STA.

$F_1$ añadida ( $\mu\text{g}$ )	% de $F_1$ fijada
10	40
20	55
40	43
120	38

La reconstitución se llevó a cabo con 200  $\mu\text{g}$  de partículas STA, en presencia de distintas concentraciones de  $F_1$  en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  de medio que contenía: sacarosa -- 250 mM, EDTA 0.25 mM y Tris- $\text{SO}_4$  10 mM pH 8.0. Se incubó 30 min a temperatura ambiente.

Tabla VII. Fijación de  $F_1$  en partículas STA reconstituídas en presencia de OSCP.

OSCP ( $\mu\text{g}$ )	% $F_1$ fijada
5	33.4
10	64.0
15	75.0
20	63.0
25	66.6

La reconstitución se llevó a cabo con 200  $\mu\text{g}$  de partículas STA, 40  $\mu\text{g}$  de  $F_1$  y distintas concentraciones de OSCP en las condiciones descritas en la tabla VI.

factor es la de promover la fijación de la  $F_1$  a sitios específicos y saturables en la membrana.

La tabla VIII ilustra el efecto de diferentes concentraciones del factor  $F_6$  homólogo en partículas STA. El lote de partículas utilizado en este experimento, mostró un porcentaje alto de fijación de  $F_1$  a la concentración más baja de  $F_6$  utilizada, por lo que, a mayores concentraciones, se produjo muy poco aumento en la fijación o disminución de la misma; este fenómeno se observó también en la curva de  $F_1$  (tabla VI) y de OSCP (tabla VII).

El hecho de tener una fijación máxima a concentraciones bajas de  $F_6$  y sin requerimiento de OSCP, parecería indicar que el lote de partículas empleado, poseía OSCP en cantidad suficiente para inducir la fijación y que la carencia de  $F_6$  también es relativa; este fenómeno de variabilidad en el contenido residual de los factores, en diferentes lotes de partículas tratadas con ácido silicotúngstico, es frecuente y no permite hacer comparaciones cuantitativas entre lotes diferentes.

Por otro lado, la medida de la fijación de  $F_1$  a la partícula, no puede ser tomada como un índice estricto de la reconstitución, ya que es la suma de los sitios específicos e inespecíficos de la membrana que fijaron  $F_1$ . Por esta razón, los experimentos ilustrados en las tablas siguientes, fueron hechos midiendo la fijación de  $F_1$  sensible a oligomi

Tabla VIII. Fijación de  $F_1$  a partículas STA reconstituídas en presencia de  $F_6$  de corazón.

$F_6$ de corazón ( $\mu\text{g}$ )	% de $F_1$ fijada
5	80
10	83
15	85
20	79
25	78

La reconstitución se llevó a cabo con 200  $\mu\text{g}$  de partículas STA, 40  $\mu\text{g}$  de  $F_1$  y distintas concentraciones de  $F_6$  en las condiciones de la tabla VI.



micina a las partículas STA reconstituídas, en presencia de los diferentes factores de acoplamiento, que es un índice -- más seguro de fijación específica.

3) Fijación de  $F_1$  sensible a oligomicina a partículas STA.

La tabla IX ilustra el efecto de diferentes concentraciones de  $F_1$  en la fijación específica de este factor, a las partículas carentes de él; se observa que a concentraciones muy bajas de  $F_1$  en ausencia de los otros factores de acoplamiento, la enzima es capaz de fijarse específicamente a las partículas carentes. La actividad máxima de ATPasa sensible a oligomicina se obtiene con 7  $\mu\text{g}$  de  $F_1$ , en contraste con la fijación máxima de 20  $\mu\text{g}$  de  $F_1$  encontrados en la tabla VI, - en la que se midió solamente fijación, sin tomar en cuenta - si era o no sensible a oligomicina, lo cual indica el grado de reconstitución específica.

La tabla X contiene los datos referentes a la fijación específica de  $F_1$  a partículas STA dependiente de OSCP. La dependencia de la fijación de  $F_1$  sensible a oligomicina a concentraciones bajas de OSCP, muestra la alta sensibilidad del sistema al factor de acoplamiento estudiado; si se comparan estos valores con los obtenidos en la tabla VII, en los que se midió solamente la fijación de  $F_1$ , se verá que en presencia de cantidades grandes de OSCP (15  $\mu\text{g}$ ), aumenta la fija--

Tabla IX. ATPasa sensible a oligomicina en partículas STA reconstituídas con distintas concentraciones de  $F_1$ .

Factor $F_1$ ( $\mu\text{g}$ )	Actividad Específica (nmoles Pi $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ )		
	---	oligomicina	sensibles a oligomicina
7	590	181	409
14	818	498	320
21	890	721	169

La reconstitución se llevó a cabo con 200  $\mu\text{g}$  de partículas STA y diferentes concentraciones de  $F_1$  en un volumen final de 500  $\mu\text{l}$  de un medio que contenía sacarosa 200 mM, EDTA 0.2 mM, Tris- $\text{SO}_4$  60 mM pH 7.7,  $\text{MgSO}_4$  6 mM, BSA 0.5 mg, PEP 5 mM, PK 3  $\mu\text{g}$ . Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente.

Tabla X. Reconstitución de ATPasa sensible a oligomicina en partículas STA por distintas concentraciones de OSCP.

Factor adicionado ( $\mu\text{g}$ )		Actividad específica $\text{nmoles Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$		nmoles Pi sensibles a
$F_1$	OSCP	---	oligomicina	oligomicina
20	---	725	211	514
20	1.0	622	138	484
20	2.5	1212	138	1074
20	5.0	1258	110	1148
20	10.0	1212	266	946

La reconstitución se llevó a cabo con 200 $\mu\text{g}$  de partículas STA con 20  $\mu\text{g}$  de  $F_1$  y distintas concentraciones de OSCP en 500  $\mu\text{l}$  del medio especificado en la Tabla VI, durante 30 min a temperatura ambiente. La actividad se midió en medio que contenía tris-acetato 25mM, acetato de k 30 mM, acetato de Mg 3mM, PEP 3 mM, ATP 30mM, PK 20  $\mu\text{g}$ , durante 10 min parando la reacción con TCA 6% final.

ción inespecífica de  $F_1$ ; pero que concentraciones de 5  $\mu\text{g}$ , - son saturantes para la fijación específica.

La tabla XI, muestra la fijación específica de  $F_1$  a partículas STA de mitocondrias de corazón de res, dependiente - de  $F_6$  homólogo a concentraciones saturantes de OSCP. Si comparamos estos resultados con los obtenidos de la tabla VIII, en la que se midió la fijación de  $F_1$  a partículas STA, con - probablemente altas concentraciones de OSCP endógeno, el efecto de la  $F_6$  es mínimo en concentraciones altas de OSCP - exógeno; sin embargo el efecto máximo se obtiene en presencia de  $F_6$ . Estos resultados parecen indicar que las partículas STA carecen más de OSCP que de  $F_6$  y que es difícil observar un efecto claro del factor  $F_6$  en presencia de OSCP endógeno o exógeno.

La tabla XII ilustra dos experimentos en diferentes condiciones, para probar el efecto de la  $F_6$  homóloga en la fijación específica de  $F_1$  a partículas STA en ausencia de OSCP - exógeno. En el experimento A, se utilizaron concentraciones bajas de  $F_6$  y su efecto de reconstitución ya es óptimo a concentraciones de 1  $\mu\text{g}$ . El experimento B demuestra que las concentraciones altas de  $F_6$  inhiben ligeramente la fijación específica de  $F_1$ .

La tabla XIII muestra en dos experimentos con distintas concentraciones de  $F_1$ , el grado de acoplamiento de la  $F_1$  sensible a oligomicina, en partículas STA con distintas concen-

traciones de  $F_6$  de mitocondrias de levadura. En ambos experimentos el efecto de la  $F_6$  de levadura es aumentar la fijación específica de la  $F_1$  a las partículas STA heterólogas. - La eficiencia de la  $F_6$  de levadura es bastante buena, ya que el efecto máximo se observa con  $5 \mu\text{g}$  en ambos experimentos y el efecto máximo de la  $F_6$  homóloga se observó en presencia de  $1 \mu\text{g}$ .

Tabla XI. Reconstitución de ATPasa sensible a oligomicina en partículas STA con distintas concentraciones de  $F_6$  de corazón de res.

Factor adicionado ( $\mu\text{g}$ )			Actividad específica		nmoles Pi
$F_1$	OSCP	$F_6$	nmoles Pi	$\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$	sensibles a
			---	oligomicina	oligomicina
25	---	---	1363	442	921
25	10	---	1397	269	1128
25	10	5	1536	269	1267
25	10	10	1606	356	1250
25	10	15	1623	338	1285

Se reconstituyeron 200  $\mu\text{g}$  de partículas de STA en el mismo medio descrito en la Tabla X, agregando a diferentes tiempos los factores acoplantes en el siguiente orden: 25  $\mu\text{g}$  de  $F_1$  + 10 min, 10  $\mu\text{g}$  de OSCP + 15 min, 5, 10 y 15  $\mu\text{g}$  de  $F_6$ . Todos los factores son de mitocondrias de corazón de res. Las condiciones fueron las mismas descritas en la Tabla X.

Tabla XII. Reconstitución de ATPasa sensible a oligomicina en partículas STA con distintas concentraciones de  $F_6$  de corazón.

Factor añadido ( $\mu\text{g}$ )		Actividad específica		nmoles Pi sensibles a oligomicina
$F_1$	$F_6$	nmoles Pi $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$	oligomicina	
A)				
14	----	245	143	102
14	1.0	321	117	204
14	2.5	283	143	140
14	5.0	308	105	203
14	10.0	283	117	166
B)				
---	---	347	87	260
40	---	1198	312	886
40	5.0	1250	486	764
40	15.0	1076	260	816

Se reconstituyeron 200  $\mu\text{g}$  de partículas STA en las mismas condiciones descritas en la tabla anterior con 2 concentraciones de  $F_1$  y distintas concentraciones de  $F_6$  sin añadir OSCP.

Tabla XIII. Reconstitución de ATPasa sensible a oligomicina en partículas STA con  $F_6$  de levadura.

Factor añadido ( $\mu\text{g}$ )		Actividad específica		nmoles Pi sensibles a oligomicina
$F_1$	$F_6$	nmoles Pi $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ oligomicina		
A)				
14	---	369	261	108
14	1.0	399	307	92
14	2.5	415	227	188
14	5.0	446	246	200
14	10.0	430	323	107
B)				
20	---	419	291	128
20	1.0	431	268	163
20	2.5	512	303	209
20	5.0	419	291	328
20	10.0	419	244	175

Se reconstituyeron 200  $\mu\text{g}$  de partículas STA de corazón en las mismas condiciones descritas en la Tabla XI, con 2 cantidades de  $F_1$  de corazón de res y distintas concentraciones de  $F_6$  de levadura.



## V. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los experimentos presentados en este trabajo aportan evidencias experimentales que nos permiten identificar estructural y funcionalmente al factor  $F_6$  de mitocondrias de levadura como una proteína semejante a la descrita en mitocondrias de corazón de res, con base en los siguientes hechos:

1. La purificación del factor  $F_6$  de levadura en una extracción etanólica y como un subproducto de la marcha de purificación del inhibidor natural de la ATPasa, en condiciones semejantes a la purificación de  $F_6$  de mitocondrias de corazón de res. (Tabla I).

2. La composición de aminoácidos y el grado de hidrofobicidad son semejantes en ambas proteínas; sin embargo el peso molecular de la forma monomérica del factor  $F_6$  de levadura es ligeramente más alto (Tabla II y Figura 2).

3. La reacción de reducción del NAD por succinato, dependiente de ATP, tomada como una medida del acoplamiento entre el factor  $F_1$  y el factor  $F_0$  fué inducida de una manera cualitativamente semejante por el factor  $F_6$  de ambos orígenes, observándose una mayor eficiencia con el sistema homólogo (Tabla V).

4. La fijación específica de  $F_1$  al factor  $F_0$ , midiendo la actividad ATPasa sensible a oligomicina, mostró dependencia cualitativa de la presencia del factor  $F_6$  homólogo y heterólogo (Tablas XII y XIII), con mayor eficiencia cuando la

reconstitución se hizo con partículas de mitocondrias de corazón de res y factor  $F_6$  de mitocondrias del mismo origen.

5. La demostración de que el factor  $F_6$  de mitocondrias de levadura puede interaccionar con los sitios específicos - presentes en partículas de corazón de res y sin embargo no - tener determinantes antigénicos comunes, parece indicar que en la evolución se han preservado los "sitios activos" y las variaciones estructurales no han alterado la función pero sí la antigenicidad.

La identificación del factor estructural  $F_6$  en mitocondrias de levadura, con características semejantes a la de mitocondrias de mamífero, dos organismos muy alejados en la escala filogenética, demuestra que los factores que componen el sistema fosforilante  $F_1-F_0$ , se han preservado estructural y funcionalmente a través de la evolución.

La función estructural que parece desempeñar el factor  $F_6$ , que es la de conservar el gradiente de protones generado durante la cadena de transporte de electrones mediante el acoplamiento "correcto" del factor  $F_1$  al canal de  $H^+$ , parece ser una medida de seguridad que evita la pérdida de energía de la célula. La interacción de este factor con la  $F_0$  y la  $F_1$  y su estequiometría aún no se conocen y serán algunos de los objetivos en la continuación de este trabajo, cuyas conclusiones nos aportarán una idea más clara y completa de la funcionalidad del complejo sistema fosforilante de la membrana mitocondrial.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Lehninger A.L. 1975, "BIOCHEMESTRY". Worth Publishers -  
Inc. New York.
2. Sere P.A. 1972, "Symposia on Metabolic Regulation". Mehl-  
man M.A. y Hanson R.W. (Eds). Academic Press, New York  
and London.
3. Ernster L. y Kuylenstierna B. 1970, "Membranes of mito---  
chondria and Chloroplasts". Racker E. (Ed). A.C.S. Mono-  
graph 165, Van Nostrand Reinhold, N.Y.
4. De Pierre y Ernster 1977, Annu Rev Biochem 46:201-62.
5. Munjal D. y Nickerson P.A. 1973, J Sci Ind Res 32,2:70-77.
6. Kroon A.M. y Saccone C. (Eds) 1974, "The Biogenesis of ---  
Mitochondria". Academic Press, N.Y.
7. Kleiner y Fitzke 1979, Biochem Biophys Res Commun 86:211-  
217.
8. Fiskum G. y Lehninger A.L. 1980, Fed Proc 39,7:2432-2436.
9. Hinkle P.C. y Mc Carty R.E. 1978, Sci Am 238,3:104-123.
10. Mitchell P. 1976, J Theor Biol 62:327-367.
11. Hackenbrock C.R. 1968, J Cell Biol 37:345-369.
12. Lardy H.A., Johnson D. y Mc Murray W.C. 1958, Arch Biochem  
Biophys 78:587-597.
13. Tuena M y Gómez-Puyou A. 1981, "Temas Selectos de Fisio-  
logía Celular". Peña A., Drúcker-Colín R. y Tapia R. (E  
ds) UNAM, México. pp 1-12.
14. Racker E. 1970, "La Célula Viva" 2a Ed. Selecciones de Sci  
Am, Ed Blume. pp 150-158.

15. Pullman M.E. y Monroy G.C. 1963, J Biol Chem 238:3762-69.
16. Gómez-Puyou A., Tuena M. y Ernster L. 1979, Biochim ---  
Biophys Acta 547:252-257.
17. Celis H. 1980, Biochem Biophys Res Commun 92:26-31.
18. MacLennan D.H. y Tzagoloff A. 1968, Biochemistry 7,4:1603-  
1610.
19. Knowles A.F., Guillory R.J. y Racker E. 1971, J Biol Chem  
246:2672-2699.
20. Fessenden-Raden J.M. 1972, J Biol Chem 247:2351-2357.
21. Tuena M. y Gómez-Puyou A. 1981, Arq Biol Technol 24:207-  
221.
22. Lee C.P. y Ernster L. 1967, Methods Enzymol Vol X. Esta  
brook R. y Pullman M.P. (Eds). Academic Press. pp 543--  
548.
23. Russell L.K., Kirkley S.A., Kleyman T.R. y Chan S.H.P. -  
1976, Biochem Biophys Res Commun 73,2:434-443.
24. Satre M., De Jerpanion B., Huet J. y Vignais P.V. 1975,  
Biochim Biophys Acta 387:241-255.
25. Ebner E. y Maier K.L. 1977, J Biol Chem 252,2:671-676.
26. Smith S.L. 1967, Methods Enzymol Vol X. Estabrook R. y  
Pullman M.P. (Eds). Academic Press. pp 81-86.
27. Tuena M. y Gómez-Puyou A. 1977, Arch Biochem Biophys 182:  
82-86.
28. Senior A.E. 1979, Methods Enzymol Vol LV. Fleischer S. y  
Packer L. (Eds). Academic Press. pp 391-397.

29. Kanner I.B., Serrano R., Kandrach M.A. y Racker E. 1976, Biochem Biophys Res Commun 69,4:1050-1056.
30. Racker E. 1979, Methods Enzymol Vol LV. Fleischer S. y Packer L. (Eds). Academic Press. pp 398-401.
31. Fessenden M.J. y Racker E. 1967, Methods Enzymol Vol X. Estabrook R.W. y Pullman M.E. (Eds) Academic Press. pp 194-197.
32. Laemlli U.K. 1970, Nature (Lond) 227:680-685
33. Garvey J.S., Cremer N.E. y Susdorf D.H. 1977, "Methods in Immunology" 3a Ed. W.A. Benjamin Inc, London.
34. Miller E.J. 1972, Biochemistry 11:4903
35. Pullman M.E., Penefsky H., Datta A. y Racker E. 1960, J Biol Chem 253:3322-3329.
36. Summer J.B. 1974, Science (Wash DC) 100:413-415.
37. Ernster L. y Lee Ch. 1967, Methods Enzymol Vol X. Estabrook R.W. y Pullman M.E. (Eds) Academic Press. pp 729-738.
38. Penefsky H.S. 1977 J Biol Chem 252:2891-2988.
39. Jacobs E.E., Jacob M., Sanadi D.R. y Bradley L.B. 1956, J Biol Chem 223:147
40. Lowry O.L.H., Rosenbrough J.H., Farr A.L. y Randell R.J. 1951, J Biol Chem 193:265-275.
41. Maier K., Müller H. y Holzer H. 1979, J Biol Chem 254: 8491-8497.
42. Peterson G.L. 1979, Anal Biochem 100:201-220.

43. Sanadi R.D. y Joshi S. 1979, Methods Enzymol Vol LV. ---  
Fleischer S. y Packer L. (Eds). Academic Press. pp 380-391.
44. Glaser E., Norling B. y Ernster L. 1980, Eur J Biochem 110:  
225-235.
45. Racker E., Horstman L., Kling D. y Fessenden-Raden J.M.  
1969, J Biol Chem 244:6668-6674.
46. Pedersen P.L. 1975, J Bioenerg 6:243-275.