



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

MOVIMIENTOS DE LA PROTEÍNA INHIBIDORA DE
LA F_1F_0 -ATP SINTASA MITOCONDRIAL EN
RESPUESTA AL GRADIENTE ELECTROQUÍMICO
DE PROTONES

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MARGARITA LÓPEZ TOVAR



MÉXICO, D.F. EXÁMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2005.

0350240



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Jesús Fernando Montiel Aguirre
VOCAL	María Eugenia Torres Marquez
SECRETARIO	José de Jesús García Trejo
1er. SUPLENTE	Gloria Gutiérrez Venegas
2do. SUPLENTE	Rosa María Villegas Ortega

El trabajo se desarrollo en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de
Cardiología "Ignacio Chávez".



ASESOR: Dr. José de Jesús García Trejo



SUSTENTANTE: Margarita López Tovar

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Química

Por formarme como profesionista y acogerme como hijo, por el orgullo de ser Universitario.

Por mi raza hablará el espíritu.

MÉXICO!, PUMAS!!, UNIVERSIDAD!!! ...

A mis padres

Lizandro y Ma. de Jesús

Este trabajo de tesis se los dedico como una necesidad de demostrar lo capaz que puedo ser, y esto gracias a sus enseñanzas y a su cariño, porque para mí el mejor tesoro que me pueden heredar es su amor y comprensión. Nunca podré pagar el sacrificio que han hecho por hacer de mí una profesionista. Quiero que sepan que todo lo que hago lo realizo pensando en ustedes porque para mí son los seres más queridos a los cuales aparte de la vida les debo simplemente todo lo que soy.....

LOS AMO

A mis tíos Natalio, Lucia y Adrián.

Siempre he sentido que su cariño es como de un padre a un hijo y por ello hoy quiero dedicarles este logro como homenaje a aquel cariño, porque ustedes forman parte fundamental de mi formación personal, porque en mí tienen a una hija que los quiere con toda el alma...

Marcela, Gloria, Lizandro y Yadira.

Gracias por ser un ejemplo a seguir, por darme ánimos en todo proyecto que empieza, gracias por esos momentos que compartimos juntos, por el apoyo incondicional en todos los

aspectos. Porque a pesar de que ahora cada quien sigue su camino y empieza una nueva vida espero que siempre estemos juntos, por el amor que nos tenemos. Los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José de Jesús García Trejo, por confiar en mí y abrirme las puertas de su laboratorio para formar parte de su equipo de trabajo. Te agradezco todas las enseñanzas y el tiempo invertido en mí, espero no haberte defraudado.

A mis queridos amigos

Batiz, Dulce, Diana, Claudia, Erika, Gusa, Aldo, Belem, Luis, Gris, Amilcar, Pedro, Israel, Edgar, Cristian, José Luis, Liliana, Panchito porque con ellos viví un sinfín de historias que quedan marcadas en nuestros corazones, en cada pasillo, cada patio, cada jardinera y salón de clases de nuestra facultad, sin contar todos los lugares en los que dejamos huella. Son tantas vivencias que podría escribir todo un compendio en cinco tomos y quedar debiendo cinco más. No saben cuanta falta me hacen cada día de mi vida, los extraño y los quiero mucho...

Batiz: Gracias por tu compañía incomparable, por apoyarme en los momentos difíciles, por esas palabras de aliento, por tu amistad y cariño incondicional. Gran parte de esta tesis también te la debo a ti. Recuerda que siempre serás Universitario y tu escuela siempre será la Facultad de Química, por el simple hecho de amarla como lo haces, siéntete orgulloso de ser Puma. Y también gracias por tu valiosa asesoría técnica. Te quiero mucho.

Dulce: Que puedo decirte, sabes que no tengo que mencionarlo para que sepas lo que estoy pensando... Nos pasan cosas tan parecidas, que parece que estaba escrito que tu y yo formaríamos el equipo ideal, nunca encontrare a otra amiga como tu, te quiero mucho.

Fernando Minauro, Concepción Bravo, Fernanda De la Rosa, Paulina Cortés y Edgar Morales, tengo que agradecerles su amistad en el laboratorio me la pase muy bien con ustedes creo que no pude haber encontrado mejor compañía. Gracias por todo el tiempo dedicado y por los conocimientos transmitidos. Conchita siempre estas a pesar de tu ausencia. Gracias.

INDICE

Resumen	6
Introducción	7
Hipótesis	14
Objetivo General	14
Objetivos Particulares	14
Materiales y métodos	15
Resultados	20
Discusión de resultados	32
Conclusiones	37
Anexo I	
Apéndice I	
Referencias	

Resumen.

Dado que la ATP sintasa mitocondrial funciona como un motor molecular reversible, contiene un inhibidor fisiológico (IF_1) que previene la hidrólisis del ATP mitocondrial en condiciones donde el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$) disminuye. Existe una controversia en cuanto al mecanismo de la IF_1 . Algunos grupos sostienen que la IF_1 se desprende de la ATP sintasa cuando se incrementa el $\Delta\mu_{H^+}$ (Harris, et. al., 1979) en partículas submitocondriales (PSM); otros grupos han mostrado que la IF_1 no se libera al medio acuoso si no que permanece unida en un sitio no inhibitorio de la enzima en respuesta al $\Delta\mu_{H^+}$ (Gómez-Puyou, A. y col., 1979).

Objetivo.

Determinar si el establecimiento del $\Delta\mu_{H^+}$ en PSM (Partículas Submitocondriales) induce o no el desprendimiento de la IF_1 de la ATP sintasa y su liberación al medio.

Resultados.

La actividad de ATPasa es activada con succinato y se mantiene por un periodo de 10 minutos. Después de una proteólisis limitada con tripsina y análisis de tipo Western-blot anti- IF_1 , se observó que el establecimiento de un $\Delta\mu_{H^+}$ protege a la IF_1 de la proteólisis. La relación α/IF_1 en PSM activadas por gradiente de protones se mantiene igual en comparación con PSM no activadas.

Conclusiones.

El $\Delta\mu_{H^+}$ de protones inducido por succinato, provoca un incremento de dos veces en la actividad de la F_1F_0 -ATPasa en PSM, el máximo de activación se obtiene a los 10 minutos. El $\Delta\mu_{H^+}$ induce un cambio conformacional en la IF_1 endógena que permanece unida a la ATP sintasa en una orientación que oculta sus sitios de corte por tripsina. La IF_1 permanece unida a la ATP sintasa en respuesta al gradiente electroquímico de protones.

1.- INTRODUCCIÓN.

La mitocondria contiene dos membranas altamente especializadas que separan a la matriz mitocondrial del espacio intermembranal. La membrana externa contiene proteínas llamadas porinas que funcionan como canales inespecificos y la hacen permeable a iones y moléculas pequeñas. Algunas de estas moléculas pueden pasar al espacio intermembranal, pero no todas podrán ser permeables a la membrana interna mitocondrial. El espacio intermembranal es químicamente similar al citosol, con respecto al contenido de moléculas pequeñas, mientras que la matriz mitocondrial tiene una composición diferente debido a varios transportadores que seleccionan las moléculas que entran y salen de la matriz.

La mayor parte de las reacciones bioquímicas que realiza la mitocondria se llevan a cabo en la matriz mitocondrial, y en la membrana interna que es altamente especializada. La membrana interna mitocondrial posee una gran variedad de proteínas transportadoras que seleccionan moléculas que son metabolizadas o requeridas por las enzimas de la matriz mitocondrial. En esta membrana interna se encuentran los complejos de la fosforilación oxidativa (Del I-V: El complejo I o NADH-UQ oxidoreductasa, complejo II o Succinato deshidrogenasa, complejo III o UQH₂-cit c oxidoreductasa (bc1), complejo IV o citocromo c oxidasa, y el complejo V o ATP sintasa. De estos últimos, los complejos I, III, y IV son capaces de bombear protones a través de la membrana interna. La generación de ATP por la fosforilación oxidativa, vía cadena respiratoria depende de un proceso quimiosmótico. Los electrones del NADH y del FADH₂ son transportados a través de la cadena respiratoria en la membrana interna mitocondrial, la energía liberada se utiliza para bombear protones a través de la membrana interna, del espacio intermembranal a la matriz mitocondrial. Este proceso genera un gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$) a través de la membrana interna mitocondrial. Este último es usado por la ATP sintasa que cataliza la conversión de ADP + Pi a ATP, completando el proceso de fosforilación oxidativa (Voet, 1990).

La ATP sintasa (también llamada F₁F₀-ATPasa) es el factor de acoplamiento que sintetiza la mayor parte del ATP que requiere la célula para llevar a cabo todas sus funciones. Este complejo funciona como un motor rotacional acoplado a la síntesis de ATP al transporte de protones, contiene múltiples subunidades las cuales pueden agruparse y separarse experimentalmente en dos porciones, una extramembranal o F₁ y la otra transmembranal o

experimentalmente en dos porciones, una extramembranal o F_1 y la otra transmembranal o F_0 (fig. 1). La porción soluble llamada F_1 que contiene el hexámero $\alpha_3\beta_3$ poseedor de los tres sitios catalíticos, además de otras subunidades γ , δ y ϵ . La porción transmembranal F_0 que forma el canal de protones, está compuesta por las subunidades a (o Sub. 6), b., A6L, F6, f, g, e y el anillo de subunidades c (Sub. 9), ambos dominios se encuentran estabilizados y anclados por un tallo periférico compuesto por las subunidades b, d y OSCP (para el caso de la enzima de corazón de bovino). La energía proveniente de la fuerza protón motriz transmembranal genera cambios conformacionales y movimientos en las subunidades del rotor (γ , δ , ϵ y las subunidades c) y el estator (α , β , OSCP, b y a) durante la catálisis (García y cols., 2002). Los movimientos del rotor, o tallo central, son transmitidos al estator a los sitios catalíticos que, a su vez, alternan y cambian su afinidad por sustratos y productos (García, 2000).

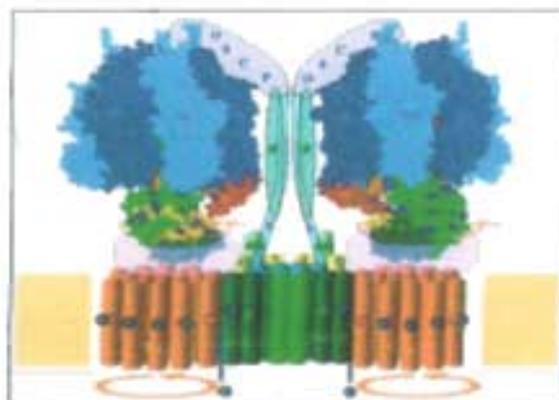


Fig. 1.- García y cols., 2002. Modelo estructural del dímero de la ATP sintasa mitocondrial, mostrando la posible localización de la IF1 en rojo. La porción F_1 está representada por las subunidades α (azul claro), β (azul oscuro), δ (verde oscuro), ϵ (monada), γ (verde claro) y la IF1 (rojo). La porción F_0 : anillo de subunidades c (amarillo oscuro), subunidad a ó b (verde oscuro), e (verde claro), g (amarillo claro), la subunidad f (amarillo vistoso), a6L (verde agua) y b6L (azul claro). Tallo periférico: d (verde agua) y OSCP (Ro). La flecha gira sentido manecillas del reloj vista desde F_0 , cuando ocurre esta la enzima sintetiza ATP y el sentido del giro inverso provoca la hidrólisis del ATP.

La actividad de la ATP sintasa en la mitocondria, es regulada *"in vivo"* por un inhibidor fisiológico (IF_1) que previene la hidrólisis del ATP mitocondrial en condiciones donde el

isquemia donde se ha demostrado que la IF_1 es un factor importante de protección contra el daño por isquemia-reperfusión del tejido cardiaco (Rouslin y cols., 1989 y Rouslin y cols., 1995). La hidrólisis de ATP es inhibida por la unión de esta proteína al sector F_1 de la enzima con una estequiometría de 1:1 (la unión depende de la presencia de Mg-ATP), (Dreyfus y cols., 1981). La restauración del $\Delta\mu_{H^+}$ favorece el desplazamiento de la IF_1 de su sitio inhibitorio. Por lo tanto la IF_1 ejerce una acción regulatoria en las propiedades catalíticas de la ATPasa mitocondrial, y juega un papel importante en el proceso de conservación de energía. El papel que ejerce la IF_1 en la regulación de la actividad de hidrólisis de ATP se ha caracterizado muy bien desde que Pullman y Monroy la aislaron por primera vez (Pullman y Monroy, 1963). Es de singular relevancia para esta tesis la activación de ATPasa por tripsina, presumiblemente a través de la proteólisis de la IF_1 . PSM-MgATP y PSM en "estado 3" se incubaron con tripsina durante diferentes tiempos, y la proteólisis se detuvo añadiendo un inhibidor de tripsina. Posteriormente se midió la actividad de ATPasa, se observó que se induce un aumento en esta actividad con respecto al tiempo de exposición a tripsina hasta conseguir un máximo de activación en 5 minutos que corresponde a la degradación del IF_1 unido a la enzima. Después de este tiempo la actividad disminuye debido a la proteólisis de otras subunidades importantes del complejo F_1F_0 , y por ende se pierde la actividad. Este efecto es muy marcado en PSM en "estado 3" las cuales se exponen a un $\Delta\mu_{H^+}$, con respecto a las PSM-MgATP (Tuena de Gómez Puyou y cols., 1983). Con este experimento, entre otros, se confirmó que la actividad de ATPasa es controlada por la proteína inhibidora (IF_1).

La unión de la IF_1 a la ATP sintasa es dependiente del pH. Durante la respiración mitocondrial, el pH es relativamente ácido afuera y alcalino en la matriz mitocondrial donde el ATP es sintetizado. En ausencia de oxígeno o en presencia de un desacoplante de la fosforilación oxidativa, la ATP sintasa tiende a girar en dirección de hidrólisis de ATP (sentido contrario de las manecillas del reloj, vista desde F_0), y por lo tanto la glicólisis se convierte en la única fuente de ATP celular. La alta velocidad de la glicólisis resulta en la reducción del pH citosólico, el cual es transmitido a la matriz mitocondrial, promoviendo la inhibición de la hidrólisis de ATP por la IF_1 como una respuesta para preservar el ATP celular (Chernyak y cols., 1991).

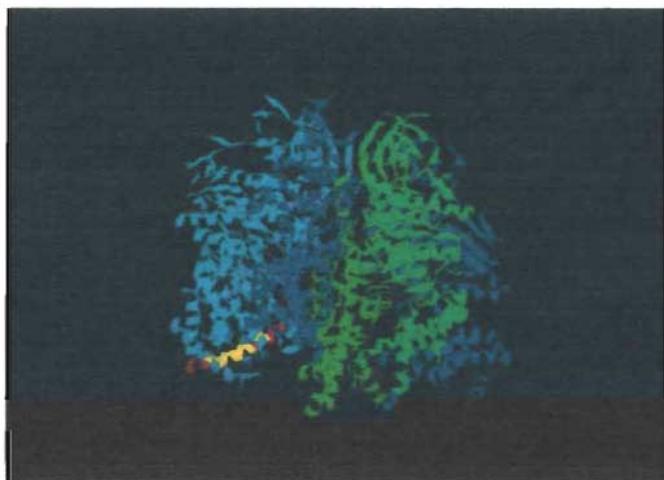
La IF_1 de bovino, originalmente aislada por Pullman y Monroy, es un péptido de 84 aminoácidos con un peso molecular de 10 KDa, (para el caso de la enzima de bovino), homólogo al ya caracterizado en mitocondria de rata, de *Saccharomyces cerevisiae* y plantas (Pullman y Monroy, 1979). La secuencia primaria revela que un 50 % de estos aminoácidos

son cargados (ácido glutámico> lisina>arginina, ácido aspártico) y carece de triptofanos y cisteínas. Esta secuencia primaria es muy conservada, particularmente los residuos del 14-47 (numeración en bovino) que han sido definidos como la mínima secuencia inhibitoria. El estado oligomérico de IF₁ de bovino ha sido estudiado a varios valores de pH por equilibrios de sedimentación y ultracentrifugación analítica y por ensayos de entrecruzamiento químico. Estas técnicas confirmaron que la proteína forma tetrámeros a pH 8, y por debajo de pH 6.5 la proteína es predominantemente dimérica (Cabezón y cols., 2000). Por medio de entrecruzamientos covalentes se encontró que a pH 8 la región de la IF₁ que forma el dímero consiste en los residuos que van desde el 44-84, y el fragmento que contribuye a la formación del tetrámero es del 32-84. Algunos de estos residuos entre la posición 32 y 49, que son necesarios para la formación del tetrámero, son sensibles al cambio de pH y por lo tanto a la interconversión de dímero y tetrámero. Un residuo importante en esta interconversión es la histidina 49, ya que una mutación en este residuo desaparece la activación-inactivación dependiente del pH.

Estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) revelan que la IF₁ dimeriza al formar una trenza de α -hélices sobre la región C-terminal y que a valores altos de pH, donde la proteína es tetramérica, la región inhibitoria se oculta (Fig. 1). Por lo tanto, con estos estudios se sugiere que la IF₁ existe en dos conformaciones: una conformación tetramérica inactiva que se enriquece a valores de pH mayores a 7.0, y otra forma dimérica activa, que predomina a valores de pH por debajo de 6.7 (Cabezón, y cols., 2000). Es de gran importancia conocer la estructura del complejo formado por la F₁-ATPasa y la proteína inhibitoria IF₁. Estudios de entrecruzamiento mostraron inicialmente que la IF₁ entrecruza con las subunidades α y β de la F₁ (Jackson y cols, 1988 y Mimura y cols., 1993). Estos antecedentes sugirieron inicialmente que el mecanismo de acción de la IF₁ era el de bloquear los cambios conformacionales de las interfases catalíticas $\alpha\beta$ (Harris, 1997, Pedersen, 1986). Recientemente, se demostró que además de entrecruzar con las subunidades α y β , la IF₁ es capaz de entrecruzar con las subunidades γ y ϵ del rotor de la F₁ a una distancia ≤ 12 Å. Previamente también se había encontrado una distancia aproximada de 40 Å entre la IF₁ y la subunidad γ por medio de estudios de transferencia de energía (FRET, Baracca y cols., 2002). Esto implica que la IF₁ además de interferir con los cambios conformacionales de los sitios catalíticos, también interfiere con la rotación intrínseca del cuello central de la enzima (Minauro-Sanmiguel y cols., 2002). Esto se corroboró posteriormente con la estructura cristalográfica del complejo F₁-I soluble de bovino en donde se encontró que los residuos 1-37 de la IF₁ se unen a la interfase α DP- β DP de la porción F₁ y

se encontró que los residuos 1-37 de la IF₁ se unen a la interfase αDP-βDP de la porción F₁ y también interactúa con la subunidad γ y del rotor de la enzima (Cabezón, y cols, 2003). Los residuos del 1-13 tienen un íntimo contacto con la subunidad γ de la F₁ y estas interacciones contribuyen a la estabilidad del complejo, los residuos del 48-56 de la IF₁ también ayudan a la estabilidad de este complejo, pero no interactúan directamente con la F₁, sin embargo pueden estar ayudando a la estabilidad por formación de dímeros de IF₁ en esta región. En la fig. 2 se muestra el cristal del complejo F₁-IF₁, las partes en azul y verde claro son las subunidades α y β, respectivamente; la subunidad γ se muestra en color verde y la IF₁ en rojo, la parte en amarillo es el sitio de corte de la quimotripsina. En esta figura se puede apreciar cómo esta proteína inhibidora se encuentra interactuando con las subunidades α y β del estator y parte de ella también interactúa con el rotor (subunidad γ en verde).

Fig. 2



1.- Cabezón y cols., 2000. Modelo que representa la estructura cristalografica del complejo F₁-IF₁ de la ATPasa de bovino. Colores azul y verde claro: α y β, verde: subunidad γ, rojo IF₁, amarillo: sitios de corte de quimotripsina.

Por otro lado, otros autores han demostrado por medio de ensayos de entrecruzamiento y proteólisis limitada con tripsina que el extremo carboxilo terminal de la IF₁ se une con la subunidad OSCP en un proceso independiente del pH, además de encontrar que los sitios de corte de esta proteasa en la IF₁ dentro del complejo IF₁-F₁F₀ se encuentran en el extremo carboxilo terminal de la IF₁ (Papa, y cols. 2004). Dianoux y colaboradores también exploraron

$\Delta\mu_{H^+}$, además de observar un incremento exponencial de las velocidades de síntesis y de hidrólisis de ATP.

Por otro lado, otros grupos (Dreyfus y cols., 1979) han mostrado evidencia de que la proteína inhibidora no se desprende de la enzima en respuesta al gradiente electroquímico de protones, sino que se reacomoda en otro lugar no inhibitorio dentro de la misma ATP sintasa. Esta evidencia incluye experimentos de titulación de anticuerpos radioactivos anti-IF₁ en PSM expuestas o no a un gradiente electroquímico de protones, encontrándose mayor cantidad de anticuerpos unidos a las primeras. Asimismo, se ha buscado la presencia de la IF₁ en el sobrenadante de centrifugación a alta velocidad de PSM que han sido o no expuestas a un $\Delta\mu_{H^+}$, y no se ha encontrado un incremento en la cantidad de la IF₁ que se desprende al sobrenadante (Dreyfus y cols., 1979). Estos resultados implican que la IF₁ no se desprende de la enzima en respuesta al $\Delta\mu_{H^+}$, sino que éste induce un cambio conformacional que provoca una mayor exposición de los grupos antigénicos de la IF₁ endógena. Independientemente de si la IF₁ se desprende o se reacomoda dentro de la enzima, el hecho es que para permitir la rotación del cuello central y los cambios conformacionales de las interfases catalíticas (α/β) en respuesta al $\Delta\mu_{H^+}$ durante la síntesis de ATP, la IF₁ debe cambiar su acomodo dentro de la enzima a una posición que no interfiera con estos cambios conformacionales esenciales para el funcionamiento de la enzima. Para comenzar a entender el mecanismo por el cual la IF₁ endógena deja de inhibir la síntesis de ATP en respuesta al $\Delta\mu_{H^+}$, en esta tesis se realizaron experimentos de activación de la F₁F₀-ATPasa de PSM energizadas con succinato o NADH. Posteriormente se correlacionó la activación de la enzima con la inmunodetección y proteólisis limitada de la IF₁ endógena para determinar el grado de exposición de la IF₁ completa, o de sus segmentos sensibles a proteólisis limitada. Los resultados de estos experimentos permitirán determinar no sólo si la IF₁ se desprende o no en respuesta al $\Delta\mu_{H^+}$, sino además ayudarán a definir los posibles segmentos de la IF₁ que se exponen al medio acuoso, de aquellos que se mantienen ocultos por permanecer unidos a la F₁F₀-ATP sintasa. Esto será la pauta para estudiar cómo se mueve la IF₁ dentro de la enzima en respuesta al $\Delta\mu_{H^+}$, para permitir la síntesis del ATP por el mecanismo rotacional de la ATP sintasa.

HIPÓTESIS

Si la proteína inhibidora de la F_1F_0 -ATP sintasa mitocondrial forma parte constitutiva de la enzima, y funciona como un inhibidor fisiológico para la hidrólisis de ATP entonces en respuesta al gradiente electroquímico de protones ésta debe de permanecer unida a la enzima en un sitio no inhibitorio dentro de la misma para permitir la síntesis de ATP.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el establecimiento del $\Delta\mu_{H^+}$ en PSM induce o no el desprendimiento de la IF_1 de la ATP sintasa y su liberación al medio.

OBJETIVO PARTICULAR

- 1.- Determinar el curso temporal de la activación de la F_1F_0 -ATPasa inducida por succinato y/o NADH en PSM de corazón de bovino.
- 2.- Correlacionar el curso temporal de la activación de la ATPasa con la formación del $\Delta\mu_{H^+}$ en PSM.
- 3- Realizar ensayos de proteólisis limitada de la IF_1 endógena en presencia y ausencia del $\Delta\mu_{H^+}$ para determinar si éste induce la liberación o exposición de la IF_1 a proteasas exógenas.
- 4.- Realizar ensayos de solubilización de la F_1F_0 -ATP-sintasa nativa, en presencia o ausencia de $\Delta\mu_{H^+}$ para cuantificar la IF_1 unida a la enzima, por medio de 2D de Geles Azules Nativos transferidos a membrana de PVDF y revelados por inmunodetección

3.- MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 *Obtención de mitocondrias de corazón de bovino. [Beltrán y cols. Manual para el estudio de membranas biológicas. IFC, UNAM, 15-19]*

Se limpia el corazón de tejido conectivo, grasa y coágulos de sangre y se corta el músculo en cubos de 2 a 4 cm por cada lado. Se muele la carne en un molino de carne.

Generalmente se obtiene de 400 a 600 g de carne de un corazón de tamaño regular.

Se adicionan 4 litros de amortiguador A por cada Kg de carne molida y se ajusta el pH a 7.4 con Tris saturado (generalmente se requieren de 10 a 15 ml de Tris saturado por cada 2 Kg de carne). Se licua durante 90 segundos y se ajusta nuevamente el pH a 7.4 con Tris saturado. Se coloca el licuado en botellas de centrifuga de 250 o 500 ml de capacidad y se centrifuga a 1100 x g durante 10 minutos a 4 °C para sedimentar los restos del tejido y células no rotas y dejar en el sobrenadante (SN) a las mitocondrias. El SN se decanta a través de una gasa cuádruple colocada en un vaso de 5 litros. El precipitado se desecha. El sobrenadante se centrifuga a 16000 x g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado obtenido son las mitocondrias, las cuales se resuspenden por homogeneización manual en baño de hielo con un "potter" en un volumen mínimo del amortiguador B. Una vez homogeneizadas, las mitocondrias se llevan a 500 ml del mismo buffer B por cada Kg de carne molida. Se recentrifuga la suspensión a 600 x g a 4°C utilizando el rotor GSA. Se descarta el precipitado blanco rojizo que contiene miosina y eritrocitos, tratando de recuperar suavemente el máximo de mitocondrias adheridas al botón blanco. El sobrenadante se recentrifuga a 16 000 x g por 15 minutos a 4°C. Se descarta el sobrenadante.

Nota: El precipitado son las mitocondrias que se resuspenden con un pincel en el mínimo volumen posible (2 a 5 ml por botella) de sacarosa 250 mM para homogeneizar como se explico anteriormente. Estas mitocondrias se pueden usar inmediatamente o almacenar en alícuotas a -70 °C. Si las mitocondrias se van a almacenar es recomendable que estén muy

concentradas (50 a 70 mg/ml). En estas condiciones las mitocondrias pueden permanecer almacenadas por lo menos 6 meses sin perder sus propiedades. Una pequeña alícuota (10-50 µl de las mitocondrias se separa para determinar la cantidad de proteína por el método de Lowry después de diluirlas aproximadamente 1:10 en agua o buffer de sacarosa.

Precauciones: El procedimiento mecánico para obtener mitocondrias de tejido debe ser tan suave como sea posible para preservar la integridad de la mitocondria y su grado de acoplamiento.

3.2 Obtención de partículas submitocondriales Mg-ATP (SMP-MgATP). [Beltrán y cols. Manual para el estudio de membranas biológicas. IFC, UNAM, 15-19]

Las mitocondrias preparadas como se indica en la sección 3.1, se resuspenden a 20 mg/ml en Medio I. Su pH se ajusta a un intervalo de 6.9 a 7.1 con KOH, después, en lotes de 15 ml, las mitocondrias se sonicar de 5 a 7 veces durante 15 segundos, separados por descansos de 45 segundos para evitar que se caliente demasiado la muestra (todo esto en baño frío de hielo con agua). Justo antes de sonicar, se agrega el Mg-ATP como indica el Medio I.

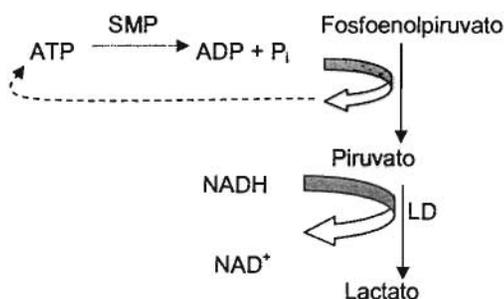
Después de sonicar se sedimentan las mitocondrias no rotas a 12 000 r.p.m. por 15 minutos a 4 °C. Se guarda el sobrenadante (SN₁), mientras que los paquetes se resuspenden en Medio I a la mitad del volumen original. Se ajusta el pH de la resuspensión con KOH a un intervalo de 6.9 a 7.1 y se sonicar como anteriormente se explicó. Posteriormente se centrifugan a 12000 r.p.m. a 4 °C por 15 minutos y se recupera el sobrenadante (SN₂). Se juntaron el SN₁ y el SN₂ conteniendo a las PSM y ambos se centrifugan a 45 000 r.p.m. por 45 minutos a 4 °C. El paquete obtenido de esta centrifugación se lava con un volumen equivalente de sacarosa 250 mM. Se centrifuga a 45 000 r.p.m. por 45 minutos a 4 °C. El paquete se resuspende a 10 mg/ml en Sacarosa 250 mM, MES/tris pH 7.5 y se centrifuga a 45 000 r.p.m. 30 minutos, tras lo cual se guarda el paquete de partículas submitocondriales Mg-ATP (Mg-ATP SMP) a -75 °C.

3.3 Medición de ΔpH . [Birte y cols. *The Journal of Biological Chemistry*. 274:28351-28355 (1999)].

Se adiciona el fluoróforo ACMA en buffer para medir ΔpH a una concentración final de $5 \mu M$, en una celda con agitación y oxigenación constante. La señal de fluorescencia se obtiene trabajando a una $\lambda_{Excitación}$ 415 nm y $\lambda_{Emisión}$ 480 nm, una vez estabilizada la señal se adicionan PSM a una concentración final de 1 mg/ml, para iniciar la generación del gradiente de protones se adiciona al medio 10 mM de succinato. Al término del gradiente se agrega nigericina.

3.4 Determinación espectrofotométrica de actividad ATPasa. [Beltrán y cols. *Manual para el estudio de membranas biológicas*. IFC, UNAM, 15-19]

La determinación consiste en incubar a la enzima soluble o membranar en presencia del sustrato y de un sistema regenerador de ATP (fosfoenolpiruvato y piruvato cinasa), de NADH y deshidrogenasa láctica que convierten el piruvato (producto del sistema regenerador) en lactato. Lo que se mide es la desaparición de NADH por absorción a 340 nm.



Una vez preparada la mezcla de reacción para medir la actividad, se incuba la celda durante 2-3 minutos para descartar la oxidación de NADH debida a la contaminación de ADP en la solución de ATP. Se inicia la reacción adicionando 1-24 µl de muestra de ATPasa (1-5 µg de proteína si es F₁ soluble y 10-50 µg si son SMP) y registrar la D.O. a 340 nm)

Calculo de la actividad:

$$\text{Actividad hidrolítica} = \frac{\text{Vol. de reacción (mL)} * \text{D.O.} \frac{340}{\text{min}}}{(\mu\text{mol} * \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}) \text{ mg de proteína} * \epsilon \text{ NADH}}$$

3.5 Medición de hidrólisis de ATP en SMP Mg-ATP, por activación con succinato y NADH.

Se diluyen las SMP a 1mg/ml en un volumen de 500 µl con medio Sacarosa 20 mM-Tris 20 mM, se mantiene en agitación constante a 37 °C y oxigenadas, se toma una alícuota de 10 µl y se le determina actividad de ATPasa contando como tiempo cero esta medición, para iniciar la activación se adiciona succinato 10 mM y se toman alícuotas de 10 µl a diferentes tiempos (0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0 y 10 minutos), se diluyen en el medio que contiene la mezcla de reacción para medir actividad de ATPasa a 37 °C (este medio contiene el sustrato para la ATPasa así como sustratos para las enzimas acoplantes) en una celda de espectrofotómetro. La actividad se determina siguiendo la desaparición del NADH a 340 nm.

Para el caso de la energización de las PSM con NADH, el protocolo es exactamente el mismo, excepto que esta vez en lugar de adicionar el succinato se adiciona 20U de ADH (alcohol deshidrogenasa), 1% de etanol y la energización de las PSM comienza con la adición de 0.6 mM de NAD⁺.

3.6.- Proteólisis limitada a tiempos cortos, en SMP Mg-ATP activadas con succinato y NADH

Se diluyen PSM Mg-ATP en un volumen de 100 μ l a una concentración final de 1 mg/ml en medio de Sacarosa 200 mM-Tris 20 mM, se mantienen aereadas y agitadas a temperatura ambiente, empieza la proteólisis se inicia adicionando a la tripsina a una concentración

relativa de 1.2 μ g /100 μ g de proteína total (PSM). Posteriormente se toman alícuotas de 12 μ l a diferentes tiempos para detener la proteólisis adicionando 5mM de PMSF.

Stock de tripsina 0.77 mg/ml

Stock de PMSF 100mM

RESULTADOS.

El modelo con el que se decidió trabajar son partículas submitocondriales de corazón de bovino, ya que son vesículas invertidas en las cuales se tienen expuesta al medio la porción F_1 , que es la parte catalítica de la ATP sintasa mitocondrial.

Se midió el curso temporal de hidrólisis de ATP, utilizando dos sustratos diferentes para inducir la formación del gradiente electroquímico de protones: succinato y NADH. El ensayo se realizó a dos valores de pH: 7.4 que es el más cercano al pH fisiológico ensayado con este sistema, y pH de 8.0 en donde ya se reportado que a valores más alcalinos se obtiene una mayor actividad de ATPasa, y como control se realizó el mismo ensayo de activación de hidrólisis de ATP (descrito en métodos) en presencia de un desacoplante FCCP (carbonil cianida *p*-trifluoruro-metoxifenil hidrazona) el cual tiene como función abatir el $\Delta\mu_{H^+}$. La finalidad de este ensayo es encontrar el tiempo en el cual se obtiene la mayor actividad de hidrólisis de ATP y a que pH se lleva a cabo, además de evidenciar que la activación se efectúa por influencia de un aumento en el $\Delta\mu_{H^+}$.

Activación de hidrólisis de ATP con succinato 10 mM.

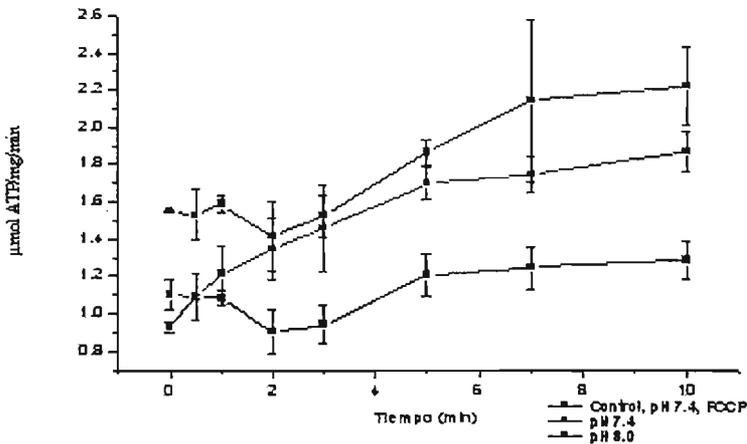


Fig. 1 Curso temporal de hidrólisis de ATP por incremento del gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{H^+}$). Para conocer detalles del experimento ver métodos.

El gráfico de la fig. 1 muestra que al aumentar el tiempo de exposición al gradiente de protones aumenta la actividad hidrolítica de ATP, hasta llegar a un máximo de actividad aproximadamente a los 8-10 minutos; para ambos valores de pH ensayados se consigue al menos el doble de actividad con respecto al control, y es de mayor magnitud a pH de 8 que a pH de 7.4. El control no tiene una activación significativa debido a la presencia del desacoplante.

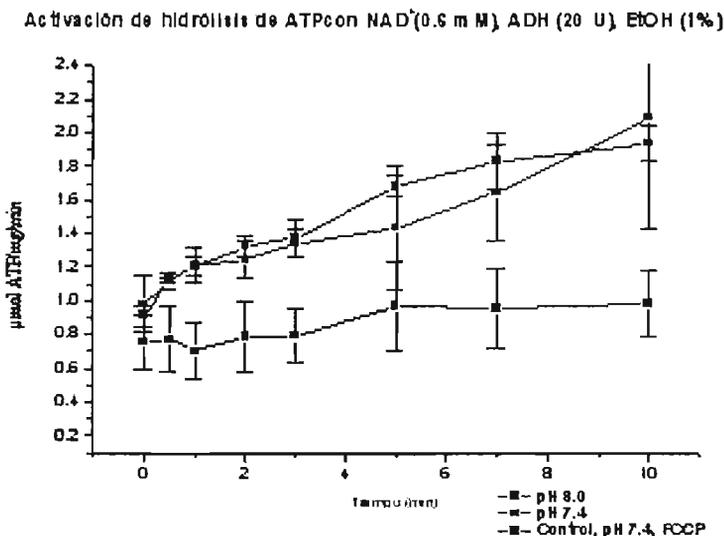


Fig. 2 Curso temporal de hidrólisis de ATP por incremento del gradiente electroquímico de protones ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$). Ver métodos.

De la misma forma se determinó la actividad de hidrólisis de ATP, utilizando otro sustrato para la creación del gradiente de protones que activa desde el complejo I de la cadena respiratoria, prediciendo así que se creara un mayor $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ y por lo tanto una mayor actividad hidrolítica, los resultados que se obtuvieron se encuentran resumidos en el gráfico de la figura 2, donde podemos apreciar que, como en los resultados anteriores el ensayo control que contiene el desacoplante FCCP (4 μM) no registró un aumento significativo en la actividad hidrolítica de ATP. Se consiguieron valores de actividad hidrolítica de ATP más altos a pH de 8.0 que a pH de 7.4, sin embargo para ambos casos se consiguió al menos el

doble de activación con respecto al control. Los valores más altos de actividad se registraron entre 8 y 10 minutos.

Una vez identificado el tiempo en el cual se conseguía el máximo de actividad de ATPasa lo que prosigue es correlacionar esta activación con la formación y la duración del $\Delta\mu_{H^+}$, para ello se midió cualitativamente el ΔpH en las PSM, utilizando ACMA (9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina) como fluoróforo y trabajando a una $\lambda_{Excitación}$ 415 nm, $\lambda_{Emisión}$ 480 nm. Dado que no hay una diferencia muy notoria entre las activaciones utilizando los dos sustratos se eligió succinato 10 mM para generar el gradiente de protones trabajando a un pH de 7.4, por ser más sencillo el procedimiento. Los trazos que se consiguieron se muestran en la figura 3.

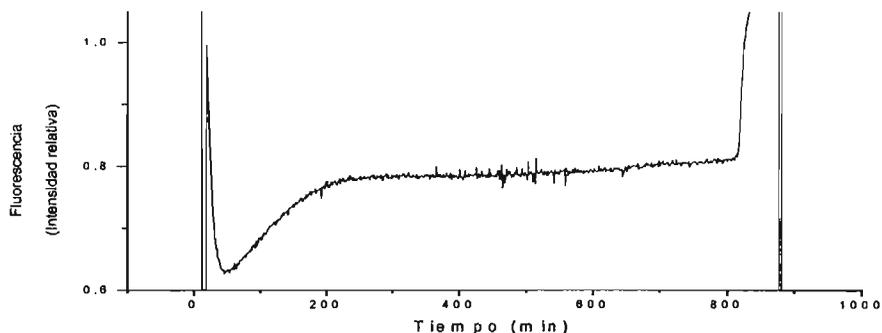


Figura 3. Formación del $\Delta\mu_{H^+}$ impulsado por la oxidación de succinato y monitoreado por el apagamiento de la fluorescencia del ACMA. Después de la estabilización de la señal del ACMA, se inició la formación del gradiente con succinato 10 mM donde se indica con una flecha. (Ver métodos).

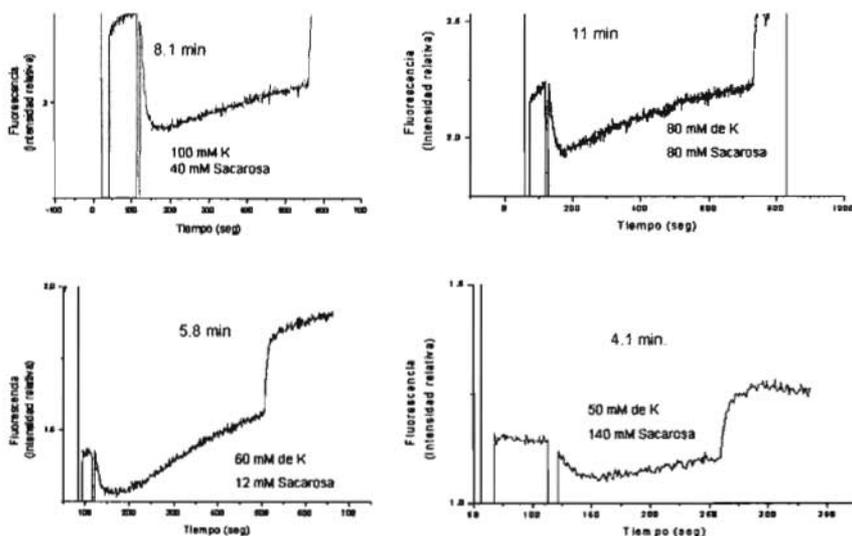
La señal observada corresponde a la intensidad de fluorescencia del ACMA, como se indica en el protocolo, al estabilizarse esta señal en el medio que contiene las PSM se procede a agregar el succinato para iniciar la formación del gradiente de protones, inmediatamente después existe un apagamiento de la fluorescencia, lo cual indica la formación del gradiente de protones impulsado por la oxidación del succinato.

El tiempo que tarda en estabilizarse el gradiente es de aproximadamente 3 minutos, y su duración es de 13-14 minutos lo cual correlaciona muy bien con el tiempo en el cual se obtiene la máxima activación (comparar con Figs. 1 y 2). El amortiguador que se utiliza para este protocolo contiene 100 mM de K^+ , por efecto de una alta concentración de sal como el

K^+ , podría sugerirse que el aumento en la actividad de hidrólisis de ATP es debido al desplazamiento de la proteína inhibidora (IF_1) de su sitio de inhibición, por lo tanto se intentó minimizar la concentración de este catión en el medio para realizar la medición en estas condiciones, y así disminuir la contribución del KCl en la activación de la enzima en respuesta a la liberación de su proteína inhibidora. Los trazos que se obtuvieron se muestran en la figura 4 con la mitad de concentración original de KCl (50 mM) se mantiene el gradiente por 4 minutos, y conforme aumenta la concentración de la sal, aumenta la duración del $\Delta\mu_{H^+}$. En todos los casos el tiempo en que tarda en establecerse el gradiente es el mismo, lo que cambia es su duración. La osmolaridad se mantuvo constante variando las concentraciones de sacarosa. Se determinó que la mínima cantidad a utilizarse es de 80 mM de K^+ obteniendo un promedio de 11 minutos en la duración del gradiente.

Fig. 4.

FORMACIÓN DE $\Delta\mu_{H^+}$ IMPULSADO POR SUCCINATO EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE KCL.



Dados estos resultados, se volvió a medir el curso temporal de hidrólisis de ATP, generando el gradiente de protones con succinato a un pH de 7.4 y en presencia de 80 mM de K⁺. Lo que se encontró es que los valores de las actividades desde un comienzo eran más elevados, sin embargo se sigue el mismo patrón ya encontrado, es decir al aumentar el tiempo de exposición al gradiente de protones aumenta la actividad hidrolítica de ATP, hasta llegar a un máximo de actividad a los 8-10 minutos; para ambos valores de pH ensayados se consigue al menos el doble de actividad con respecto al control, y es de mayor magnitud a pH de 8 que a pH de 7.4. El control no tiene una activación significativa debido a la presencia del desacoplante. (Resultados no mostrados).

Ensayos de proteólisis limitada con tripsina.

Los resultados anteriores indican que el $\Delta\mu_{H^+}$ se establece rápidamente, durante los primeros 1-2 minutos en las condiciones usadas para todos los experimentos. Una vez formado, este $\Delta\mu_{H^+}$ es estable durante al menos 10 minutos, tiempo máximo en el que se siguió monitoreando la actividad de ATPasa. Si la proteína inhibidora se esta desprendiendo de la F₁ de la enzima, se esperaría que se volviese más accesible al medio y por lo tanto a proteasas añadidas de manera controlada. De manera contraria, si la IF₁ no se desprende de la enzima en respuesta al $\Delta\mu_{H^+}$, entonces no se esperarían cambios en el curso temporal de la proteólisis limitada de la IF₁ endógena.

Para evaluar esta hipótesis, se llevaron a cabo los siguientes experimentos de proteólisis limitada de la IF₁ en PSM-Mg-ATP.

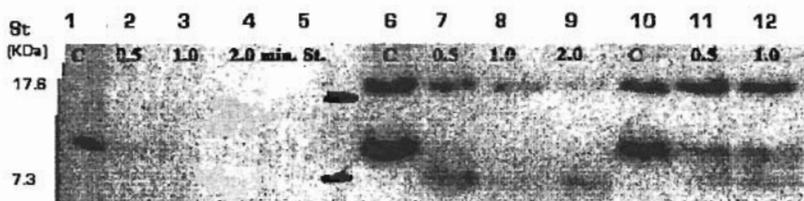


Figura 5. Proteólisis limitada del IF₁ endógeno en PSM, en presencia y ausencia de un $\Delta\mu_{H^+}$. Ver métodos.

Los ensayos de proteólisis limitada con tripsina (1.2 μg tripsina/ μg proteína) se realizaron a tiempos cortos de 0-2 minutos, utilizando como inhibidor de proteasas PMSF (5 mM). Posterior al ensayo de proteólisis, las muestras se corrieron en un gel desnaturizante tipo Von-Jagow lineal al 16 % y se transfirieron a una membrana de PVDF para revelarlas por inmunodetección con anticuerpos monoclonales anti-IF₁. En la figura 5 el carril 1 corresponde a uno de los controles, el cual corresponde a IF₁ recombinante y purificada de bovino, del carril 2-4 corresponde al perfil de proteólisis de la IF₁ bovina recombinante y purificada, en donde podemos observar que a partir de 0.5 minutos no se observa nada de proteína. En el carril 5 se encuentra el estándar de peso molecular, carril 6, corresponde al control de IF₁ endógena purificada de PSM-MgATP de corazón de bovino, carriles del 7-9, perfil de proteólisis de IF₁ endógeno en PSM-MgATP. Se puede observar que tanto la forma dimérica como la monomérica de esta proteína disminuyen conforme aumenta el tiempo de tripsinólisis. Carriles 10 control de IF₁ endógeno purificado de PSM-MgATP, carriles 11 y 12, perfil de proteólisis de IF₁ endógeno expuesto 10 minutos al gradiente de protones y después proteolizado. Se puede observar que existe una mayor protección a la digestión de la proteasa en la forma dimérica en comparación con la forma monomérica de la IF₁, esta última es más susceptible a ser degradada. Si se comparan los dos patrones de proteólisis de IF₁ endógeno con y sin exposición previa al gradiente de protones, podemos encontrar que cuando hay presencia de gradiente hay una protección contra la tripsinización de la IF₁. En la siguiente figura (fig. 6) se estudió el efecto de un desacoplante (FCCP 4 μM), en la tripsinólisis limitada de la IF₁ endógena en PSM-MgATP cuya respiración se ha estimulado con succinato.

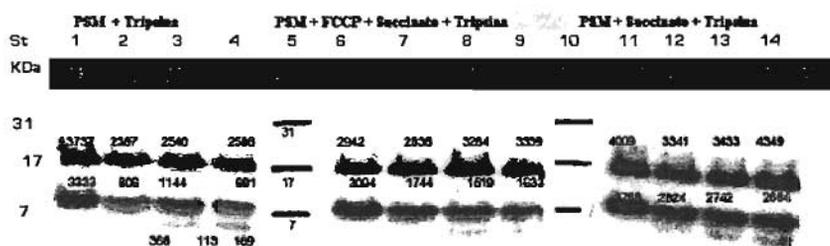


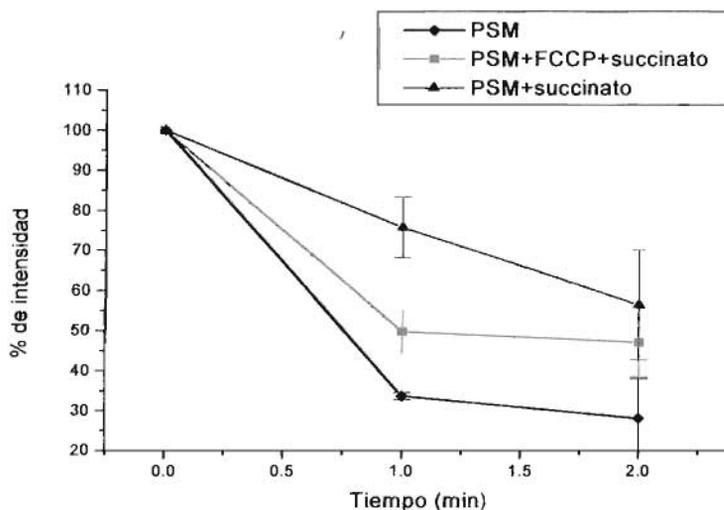
Fig. 6 Proteólisis limitada del IF₁ endógeno en PSM, en presencia y ausencia de un $\Delta\mu_{H^+}$, inducido por succinato. La banda de arriba de peso aproximado a 20 KDa corresponde a la forma dimérica de la IF₁ y la banda de 10 KDa a la forma monomérica. Ver métodos.

En la figura 6, los carriles del 2-4 representan el patrón de proteólisis de IF₁ endógeno, utilizando un control (carril 1) donde no se añadió tripsina; carril 5 y 10 estándares de peso molecular, carril 6 control IF₁, en presencia de FCCP (4μM) y expuesto al gradiente de protones por 10 minutos, carriles del 6-9 perfil de proteólisis de IF₁, en presencia de FCCP (4μM) y expuesto al gradiente de protones por 10 minutos y después digerido con tripsina; carril 11 control IF₁ expuesto al gradiente de protones, carriles del 12-14, patrón de proteólisis de IF₁ endógeno expuesto al gradiente de protones por diez minutos y después digerido con tripsina. De nuevo se observa que la forma dimérica de la IF₁ es mucho menos susceptible a los cortes de la tripsina en comparación con la forma monomérica. Se observa una protección muy pronunciada hacia los cortes por tripsina en la IF₁ que a sido expuesta previamente al gradiente de protones en comparación con las PSM que no fueron energizadas con succinato. En las muestras que contuvieron FCCP previo al succinato, se observó una velocidad de proteólisis intermedia a las velocidades observadas con y sin energización con succinato.

Se calcularon las densitometrías de cada banda representante del IF₁ dimérico y monomérico a los diferentes tiempos de proteólisis, y con varias repeticiones de este experimento (n=4) se realizaron promedios sobre las densitometrías. Para poder registrar la disminución del IF₁ que corresponde a la parte proteolizada, se tomo como un 100 % a la cantidad de IF₁ presente en los controles, los cuales no se encuentran expuestos a la proteasa. Con estos datos se pudo relacionar el tiempo de proteólisis con la intensidad relativa de cada banda, produciendo la siguiente grafica en la figura 7.

Fig. 7

Curso temporal de la tripsinólisis limitada de la IF₁ endógena en PSM-Mg-ATP +/- $\Delta\mu_{H^+}$

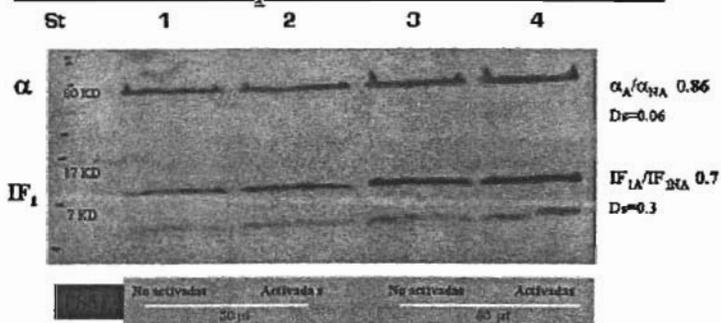


La línea negra representa la degradación del IF₁ endógeno, donde podemos apreciar que al minuto 2 se a degradado en un 70 %, la línea azul corresponde a la IF₁ endógena en partículas energizadas durante 10 minutos en presencia de un desacoplante, en este caso el porcentaje de inhibidor proteolizado es de un 50 % al minuto 2, y por último la línea verde representa la IF₁ endógena en partículas energizadas durante 10 minutos y posteriormente proteolizado, en donde al segundo minuto se a degradado solo un 40 %. Con estos resultados podemos aseverar que el IF₁ es menos susceptible a ser degradado por la tripsina cuando las PSM son expuestas al $\Delta\mu_{H^+}$.

Así mismo, también se comprobó que al prevenir la formación del $\Delta\mu_{H^+}$ con el desacoplante, se aumentó la velocidad de tripsinización de la IF₁ a una velocidad mayor que en presencia del $\Delta\mu_{H^+}$, aunque menor a la que se observó en las PSM.

Fig. 8

Cuantificación de IF₁ libre en el sobrenadante en PSM



α_A = Subunidad alfa detectada en PSM activadas con gradiente de protones. α_{NA} = Subunidad alfa en PSM no activadas con gradiente de protones

α_A/α_{NA} = Relación entre la cantidad de subunidad alfa en PSM activadas en comparación con a cantidad de subunidad alfa en PSM no activadas.

IF_{1A} = Proteína inhibidora detectada en PSM activadas

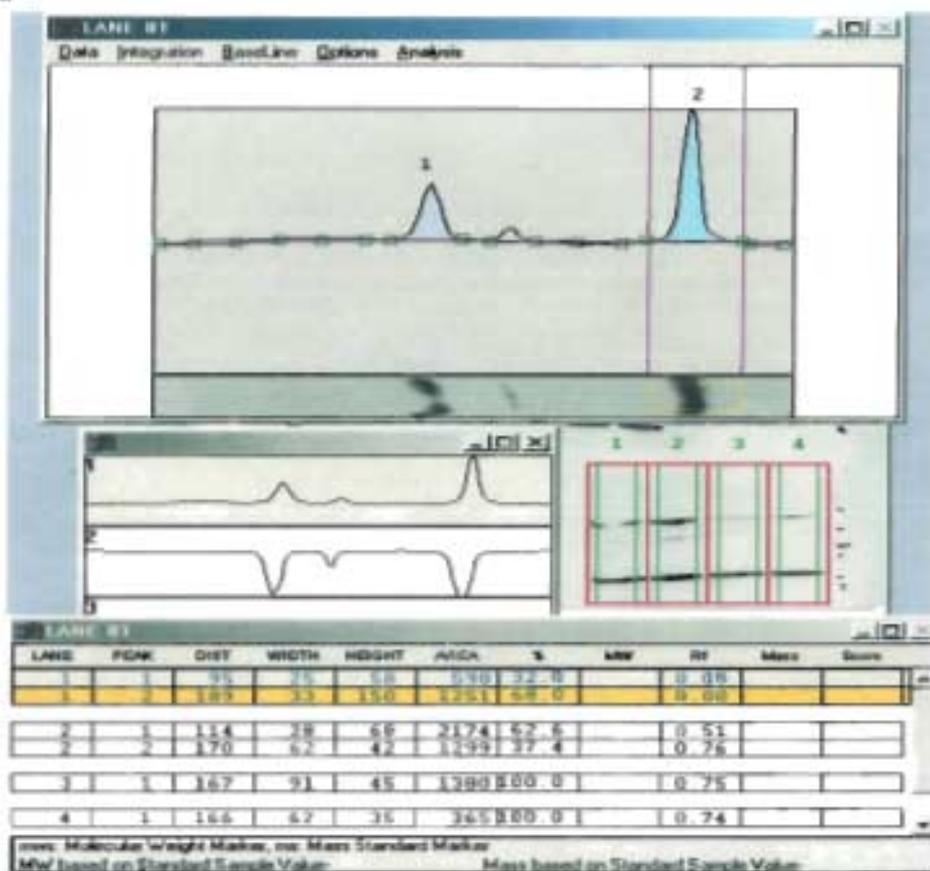
IF_{1NA} = Proteína inhibidora detectada en PSM no activadas con gradiente de protones

IF_{1A}/IF_{1NA} = Relación entre la cantidad de IF₁ en PSM activadas en comparación con a cantidad de IF₁ en PSM no activadas.

PSM expuestas y no expuestas a un $\Delta\mu_{H^+}$. Para ello se utilizaron PSM-MgATP a una concentración de 1 mg/ml en un volumen final de 500 μ l, se generó un $\Delta\mu_{H^+}$ por oxidación de 10 mM de succinato durante 10 minutos, y posteriormente se centrifugó a 45 000 RPM por 1 h. Posteriormente se tomaron alícuotas del sobrenadante, para cargarlas en un gel de electroforesis desnaturalizante de Von Jagow, lineal al 16 %. Posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF 2h, 100 mA y se revelaron por inmunodetección con anticuerpos anti- α y anti-IF₁. En la figura 8 las bandas de 80 KDa representan a la subunidad α de la porción F₁, la banda de 20 KDa es el dímero de la proteína inhibidora y la de 10 kDa es el monómero de la IF₁. El carril uno representa a los estándares de peso molecular, carriles del 2-3 contienen un total de 30 μ l del sobrenadante, donde el carril 2 son PSM no activadas con gradiente de protones y el carril 3 PSM activadas con gradiente de protones. En los carriles del 4-5 se cargó el doble de la cantidad de sobrenadante anterior (60 μ l) esto es con la finalidad de tener más probabilidades de detectar la señal de ambas subunidades tanto de α como de la IF₁, carril 4 y 6 son PSM activadas y no activadas con gradiente de protones respectivamente.

Estos resultados muestran que la cantidad de IF, detectada en el sobrenadante de PSM expuestas al gradiente de protones no es mucho mayor en comparación a la cantidad detectada en el sobrenadante de PSM no expuestas al gradiente de protones. Cálculos densitométricos (ver figura 9) de estas bandas indicaron que la presencia del $\Delta\mu_{H^+}$, aumentó en un 18 % la cantidad de IF1 en el sobrenadante.

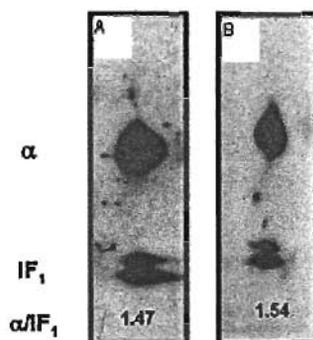
Fig. 9



En la figura lo que se observa son los cálculos del área bajo la curva de cada señal de la banda del Western-blot, los cuales representan el valor densitométrico de cada banda. El cálculo mostrado en esta figura corresponde al área bajo la curva de la señal de la subunidad alfa en PSM no activadas, y de esta misma manera se realizó para las demás subunidades en las diferentes situaciones ya mencionadas.

Para mostrar evidencia directa que la IF_1 se queda unida dentro de la ATP sintasa se procedió a solubilizar a la enzima con un detergente que extrae al complejo F_1F_0 completo y funcional de la membrana interna mitocondrial, en condiciones donde mantiene unido a su inhibidor endógeno (Aggeler y cols, 2000). Para ello, se solubilizaron PSM expuestas al gradiente de protones utilizando una relación Lauril Maltósido/proteína de 2.5g/g. Las proteínas solubilizadas se corrieron en un gel Azul Nativo donde se separan los cinco complejos respiratorios y este gel se somete a una segunda dimensión desnaturizante, obteniendo el patrón de bandeado correspondiente a las subunidades del complejo V (ATP sintasa). Este gel se transfiere a una membrana de PVDF y se revela por inmunodetección con anticuerpos anti- α y anti- IF_1 , para observar si se conserva la misma relación entre la subunidad α y la IF_1 en PSM que no se exponen al gradiente de protones en comparación con PSM expuestas al mismo.

Fig. 10



A- PSM solubilizadas con lauril maltósido 2.5g LM/g proteína y corridas en un gel nativo, posteriormente se corrió una 2D en un gel desnaturizante SDS reveladas por inmunodetección con anticuerpos anti- α y anti- IF_1 .

B- PSM activadas con succinato 10 mM, solubilizadas con lauril maltósido 2.5g LM/g proteína y corridas en un gel nativo, posteriormente se corrió una 2D en un gel desnaturizante SDS reveladas por inmunodetección con anticuerpos anti- α y anti- IF_1 .

α/IF_1 = Valor obtenido del cociente del valor densitométrico correspondiente a la banda de la subunidad alfa y el valor densitométrico de la proteína inhibidora en el Western-blot.

La imagen de la izquierda en la figura 10, es un control que contiene solo PSM y la imagen de la derecha son PSM expuestas al gradiente de protones. La banda de peso aproximado a 80 KDa corresponde a la señal de la subunidad α de F_1 , la banda de 20 y 10 KDa son IF_1 dimerica y monomérica respectivamente. Podemos ver si analizamos la relación α/IF_1 de cada experimento que esta no cambia, por lo tanto se puede enfatizar que la cantidad de IF_1 que se encuentra unida a la enzima no tiene un cambio significativo cuando aumenta el gradiente de protones.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La enzima fue activada mediante la generación del gradiente de protones inducido por NADH y succinato, sustratos del complejo I y III de la cadena respiratoria respectivamente; como era de esperarse la magnitud de activación con NADH resultó ser un poco mayor con respecto a la activación con succinato, esto es debido a que se está creando un mayor bombeo de protones conducido por los complejos I, III y IV a diferencia de la activación con succinato donde solo se encuentran bombeando protones complejos III y IV. El pH también influye en la activación de la enzima, dado que la unión de la IF_1 a la enzima es dependiente de este parámetro. El estado oligomérico de la IF_1 ha sido estudiado a varios valores de pH por equilibrios de sedimentación y ultracentrifugación analítica, mediante estas técnicas confirmaron que la IF_1 forma tetrámeros inactivos a pH de 8 (Cabezón y cols., 2000), es decir en esta conformación la proteína es incapaz de inhibir la hidrólisis de ATP. A pesar de que estos estudios se realizaron con IF_1 purificada, podría pensarse que la IF_1 endógena en el modelo utilizado (PSM) en esta tesis tiene un comportamiento similar y de esta forma se puede explicar que a pH de 8 se obtienen valores de actividad hidrolítica mayores que a pH de 7.4. Por otro lado se puede resaltar que el aumento en la actividad hidrolítica de ATP es debido al aumento del $\Delta\mu_H$, dado que se tiene un control negativo en presencia de un desacoplante CCCP (4 μM) que abate este gradiente, el cual no mostró el incremento en la actividad de ATPasa. Para ambos casos el tiempo que registró la duración del gradiente es muy similar 8-10 min., lo cual indica que en este modelo "in vitro" las condiciones de pH y el sustrato con el que se active el gradiente utilizadas en este experimento, no influyen en la duración del mismo.

Una vez identificado el tiempo en el cual se conseguía el máximo de actividad de ATPasa, lo que prosigue es correlacionar y validar esta activación con la formación y la duración del $\Delta\mu_H$, inducido por succinato. En los trazos obtenidos por la técnica de medición de ΔpH se agrega previamente el fluoróforo ACMA y las PSM para que el sistema se equilibre, una vez que la fluorescencia del ACMA se estabiliza, se agrega al medio el sustrato oxidable (succinato 10 mM) que activa el gradiente de protones se produce un apagamiento de la fluorescencia debida a la acumulación del fluoróforo en el interior de las vesículas invertidas. Esta internalización del fluoróforo es efecto de la generación del gradiente de protones, al inicio la caída de la señal de fluorescencia es brusca y después de

3 minutos la señal se estabiliza, lo que indica equilibrio estable entre el ACMA que entra y el ACMA que sale. En un promedio de 10-11 minutos la señal vuelve a elevarse a los niveles basales antes de agregar el succinato, lo que indica que el gradiente de protones a concluido, esto podría ser debido a que este sistema utilizado ya no es estable y probablemente las partículas sean en este momento demasiado permeables, como para seguir sosteniendo el gradiente de protones. Esto ocurre generalmente cuando el sustrato oxidable o el oxígeno se vuelven limitantes. Cabe recalcar que se observó que la duración del gradiente es de 10 minutos lo que nos ayuda a validar que en este tiempo se obtenga la máxima actividad de ATPasa.

Esta caracterizado que la ATPasa puede ser activada por incremento del gradiente de protones y también existe la activación por alta concentración de sal como 150 mM de K^+ , combinado con pH alcalino y temperatura del 40° C. En estas últimas condiciones provocan el desprendimiento de la proteína inhibidora de su sitio inhibitorio para la hidrólisis de ATP. Dado que el método del ACMA de detección del ΔpH utiliza un medio el cual contiene 150 mM de KCl, los experimentos de apagamiento de fluorescencia del ACMA se repitieron hasta encontrar las condiciones en las cuales pueda observarse la misma duración del gradiente durante 10 minutos pero utilizando la mínima concentración de sal (K^+). De esta manera se podría evaluar la activación de la ATPasa por gradiente de protones, separándola de la activación por sal. Los resultados obtenidos nos condujeron a utilizar como mínima concentración 80 mM de K^+ , obteniendo un promedio de 11 minutos en la duración del gradiente.

Como la concentración de sal todavía era un poco elevada (80 mM) se prosiguió a monitorear el curso de actividad de hidrólisis del ATP en presencia de 80 mM de K^+ , para ver su comportamiento. Lo que se obtuvo fue un patrón muy similar a las activaciones antes citadas, con la diferencia de que los valores basales de actividad estaban por arriba de los normales y se alcanzaba un aumento en la activación de hidrólisis de ATP de hasta tres veces con respecto al control. Lo que debe de estar pasando en este experimento, es que, ahora la actividad no es solo influenciada por el aumento del gradiente de protones, sino que también se le suma la activación por efecto de la sal. Sin embargo lo más sobresaliente es que el control en el cual se agrega un desacoplante que abate el gradiente de protones, no tiene una activación significativa, por lo tanto se puede concluir que el aumento en la actividad de hidrólisis de ATP es debido al gradiente de protones.

Una vez establecido el $\Delta\mu_{H^+}$ en las PSM ocurre el proceso de activación de la F_1F_0 -ATPasa de manera relativamente lenta ya que es hasta el minuto 10 donde se alcanza la máxima actividad de ATPasa. Esta activación debe involucrar cambios en la conformación de la IF_1 unida a la enzima completa dentro de las PSM que producen el incremento en la actividad de ATPasa. Es por ello que se decidió utilizar algunas proteasas exógenas para explorar si estos cambios están asociados al desprendimiento de la IF_1 de la enzima.

En los experimentos de proteólisis limitada se pretende observar la degradación progresiva de la proteína inhibidora a diferentes tiempos de exposición de las PSM al gradiente de protones, mediante la detección por medio de Western-blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti- IF_1 . Como control positivo de esta proteólisis se utilizó a la IF_1 bovina recombinante y purificada, la cual se disocia fácilmente en geles desnaturalizantes y por lo tanto prácticamente da una sola señal en el Western-blot correspondiente al monómero de esta proteína. Después de agregar la tripsina, al medio minuto ya no se observa señal de la proteína inhibidora lo que me está diciendo que esta ha sido proteolizada totalmente, o al menos que la está degradando de tal manera que el anticuerpo ya no tiene sitio de reconocimiento en ella. Ahora a diferencia del experimento anterior lo que sigue es agregar la proteasa a las PSM, manteniendo un control en donde no hay presencia de tripsina, lo que podemos observar en el Western-blot es solo la señal de la proteína inhibidora en sus dos conformaciones de dímero y de monómero. Dado que se está utilizando un anticuerpo monoclonal anti- IF_1 , se puede asegurar completamente que las bandas que se observan corresponden únicamente a la IF_1 ; el control en este experimento me da la señal tanto del dímero como del monómero a 20 y 10 KDa respectivamente. Después de 0.5 minutos de haber agregado la tripsina ya se observa una disminución en la señal del dímero y del monómero, más acentuada en el último por que los sitios de corte de la tripsina en esta conformación se pensaría que están más accesibles, también se alcanzan a observar los fragmentos proteolizados en los cuales debe encontrarse el epítipo del anticuerpo; después del minuto de proteólisis la proteína inhibidora ya no se observa, por lo tanto puedo decir que la tripsina tiene accesibles los sitios de corte en la IF_1 que se encuentra unida a la enzima. El siguiente experimento es comparar como se comporta la proteólisis cuando existe la generación del gradiente de protones y lo que notamos es lo siguiente: en el control (que son PSM expuestas durante 10 minutos al gradiente de protones) antes de

agregar la proteasa se observa la banda del dímero y del monómero, 0.5 y 1 minuto después de agregar la tripsina nos percatamos que la degradación de la IF₁, (más acentuada en la conformación del dímero que del monómero) es menor en comparación cuando no hay gradiente de protones. Consecuentemente se puede pensar que debido a la influencia del gradiente de protones esta proteína inhibidora se esta reacomodando de tal manera que esconde los sitios donde corta la tripsina. El siguiente paso fue estudiar la influencia del desacoplante el cual abate el $\Delta\mu_{H^+}$ generado por succinato, este experimento es un control importante que ayuda a verificar si los efectos producidos por el succinato se deben o no mayoritariamente a la energización de la membrana y lo que se encontró es que cuando se previene la formación del $\Delta\mu_{H^+}$ con el desacoplante, la IF₁ se expone más que cuando se forma este gradiente, y se degrada a una velocidad mayor que tiende a parecerse al observado en PSM no energizadas (sin succinato). Con este resultado se apoya más a la premisa que sugiere un reacomodo conformacional de la IF₁ endógena, en respuesta al $\Delta\mu_{H^+}$, de tal forma que se ocultan más los sitios de corte por tripsina.

Observando la grafica que corresponde a los promedios de estos experimentos (Fig. 7) se puede confirmar la protección a la digestión por tripsina en el IF₁ que a sido expuesto al $\Delta\mu_{H^+}$, ya que solo se digirió un 40 % de a IF₁ monomérica, en comparación al que nunca ha visto gradiente y que fue digerido un porcentaje mucho mayor de IF₁ (70 %). Así mismo también se comprobó que al prevenir la formación del $\Delta\mu_{H^+}$ con el desacoplante, se aumentó la velocidad de tripsinización de la IF₁ a una velocidad mayor en presencia de $\Delta\mu_{H^+}$, aunque menor a la que se observó en las PSM.

Por otro lado se pudo comprobar que la IF₁ endógena en las PSM no es liberada al medio acuoso en respuesta al $\Delta\mu_{H^+}$ en el experimento donde se estimó en el sobrenadante, (por medio de densitometrías de Western-blot revelado con anticuerpos monoclonales anti-IF₁ y anti- α) la relación de una subunidad de la F₁ como α con respecto a IF₁. Se puede apreciar que no se detectó un aumento significativo en la cantidad de α y la IF₁ en el sobrenadante de PSM expuestas y no expuestas al $\Delta\mu_{H^+}$, es decir que la liberación de la IF₁ de la enzima no responde a un $\Delta\mu_{H^+}$, dado que los cálculos densitométricos indican que solo aumento un 18 % la cantidad de IF₁ en el sobrenadante. Esto indica que la mayoría de la IF₁ endógena permanece asociada a las PSM después de incrementar la actividad de F₁F₀-ATPasa por exposición al $\Delta\mu_{H^+}$ generado con succinato.

Los resultados anteriores muestran que la IF_1 permanece asociada a las PSM, pero no comprueban que la IF_1 endógena permanece unida a la F_1F_0 -ATP sintasa. Es decir existe la posibilidad de que parte de la IF_1 exista asociada a otras proteínas o a la membrana interna mitocondrial. Para descartar esta posibilidad se expuso a las PSM por un tiempo de 10 minutos al gradiente de protones inducido por succinato, después de este tiempo aisló a la enzima completa y se estudió la relación que existe entre una subunidad de la F_1 , como la α y la proteína inhibidora dentro de la enzima (α/IF_1), y se encontró que esta relación no cambia en comparación con PSM no expuestas al gradiente de protones, por lo tanto la mayoría de la IF_1 permanece unida a la ATP sintasa, en ausencia o en presencia de una activación previa generada con un $\Delta\mu_{H^+}$ generado por succinato. Se puede pensar que cuando hay un gradiente de protones algo ocurre dentro de la enzima que la proteína inhibidora responde a este estímulo y sufre cambios conformacionales que conllevan a su reacomodo dentro de la misma enzima.

CONCLUSIONES

- 1.- El gradiente de protones inducido por succinato o NADH induce un incremento de dos veces en la actividad de F_1F_0 -ATPasa en PSM. El máximo de activación se obtiene aproximadamente a los 8-10 min.
- 2.- El $\Delta_{\mu H^+}$ induce un cambio conformacional en la IF_1 endógena de tal manera que se protege de la proteólisis limitada con tripsina.
- 3.- La activación de la F_1F_0 -ATPasa por el $\Delta_{\mu H^+}$ no se encuentra asociada a una liberación significativa de la IF_1 al medio acuoso después de energizar a las PSM con succinato.
4. Se conserva la misma relación σ/IF_1 en ATP sintasa activada y no activada con succinato después de solubilizarla con lauril maltósido y someterla a electroforesis en segunda dimensión nativa y desnaturalizante.
- 5.- Todos estos resultados implican que la mayoría de la IF_1 endógena no se libera al medio en respuesta al $\Delta_{\mu H^+}$, si no que permanece unida a la ATP sintasa en una orientación que oculta sus sitios de corte por tripsina. Por lo tanto la mayoría de la IF_1 no se desprende de la enzima en respuesta al gradiente electroquímico de protones.

APENDICE I. REACTIVOS

1.- Amortiguadores usados para el aislamiento de mitocondrias de corazón de bovino.

Amortiguador A	
Sacarosa	250 mM
Tris	5 mM
EDTA	15 mM
pH final 7.4, ajustando con HCl	

Amortiguador B	
Sacarosa	250 mM
Tris	5 mM
Sacarosa	250 mM

2.-Medio usado para la obtención de PSM-MgATP

Medio I	
Sacarosa	250 mM
ATP	6 mM
Acetato de Mg	6 mM

3.-Buffer para medir Δ pH

Buffer para medir Δ pH	
Mg	15 mM
MOPS	10 mM
EGTA	0.1 mM
Sacarosa	40 mM
KCl	100 mM
ACMA	5 μ M
pH	7.1

4.-Mezcla de reacción para medir la actividad de ATPasa.

Para 3 ml de volumen final	Concentraciones finales
2.9 ml de mezcla básica	
20 μ l ATP 300 mM	3 mM
17 μ l de NADH 30 mM	0.17 mM
10 μ l de PEP 300 mM	1 mM
2-5 μ l de PK	4 unidades
2-5 μ l rotenona 1mg/ml	0.33 mg/ml
1 μ l FCCP 1 mM	0.33 mM

5.-Mezcla Básica:

Sacarosa	250 mM
Tris-acetato	50 mM
Acetato de Mg	3 mM
Acetato de K	30 mM
pH 7.4	

6.-Reactivos empleados para la determinación de proteína por el método de Lowry

Reactivos
A Na_2CO_3 al 2 % en NaOH 0.1 N
B $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1 % tartrato Na-K al 2 % en NaOH 0.1 N
C 100 ml de A + 2 ml de B (prepararlo diariamente)
D Reactivo de Folin diluido (regularmente se diluye 1:1 con agua). Prepararlo en el momento de usarse
Solución estándar de albúmina de suero bovino: 1 mg/ml*.

*Curva estándar: 5-100 μg de BSA (la curva es lineal hasta 60 μg)

7.-Acrilamida usada para preparación de geles de electroforesis desnaturizante Von-Jagow.

Acrilamida 30 % (100ml)	
Acrilamida	30 g
Bis acrilamida	0.938 g

8.-Amortiguadores para geles de electroforesis desnaturizante Von-Jagow.

Amortiguador para el gel (100ml)	
Tris	36.34 g
HCl	8.28 g
SDS	0.3 g
Amortiguador de pH inferior ánodo (+) (1 L)	
Tris/HCl	24.06 g
pH 8.93	
Amortiguador de pH superior cátodo (-) (1 L)	
Tris	12.11 g
Tricina	17.93 g
SDS	1 g
pH 8.25	

9.- Preparación de soluciones para geles Von-Jagow a los porcentajes usados.

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

10.- Mezcla de desnaturalización empleada.

Mezcla de Desnaturalización	
H ₂ O	3.0 ml
Tris-HCl pH 6.8	1.0 ml
Glicerol	1.6 ml
SDS 10 %	1.6 ml
β-mercaptoetanol	0.8 ml
0.5 % Azul de bromofenol	0.4 ml

11.-Preparación de la solución teñidora usada

Azul de Coomassie (1L).	
Coomasie Brilliant Blue R-250	500 mg
Isopropanol	250 ml
Ácido Acético Glacial	100 ml
H ₂ O	650 ml

12.-Mezcla de acrilamida-bis acrilamida

AB mix (mezcla de acrilamida- bisacrilamida)
48 g de acrilamida en 100 ml
1.5 g de bisacrilamida en 100 ml

13.- Amortiguadores empleados para la preparación del gel de electroforesis nativo.

Amortiguador de pH del gel (4 °C)	
Bis-Tris	150 mM
pH 7.0	
Amortiguador de pH del cátodo A (4 °C)	
Tricina	50 mM
Bis.Tris HCl	15 mM
Serva Blue G	0.02 %
pH 7.0	
Amortiguador de pH de ánodo (4 °C)	
Bis-tris HCl	50 mM
pH 7.0	

14.-Geles a diferentes porcentajes empleados

	Amortiguador de muestra 4 %	6%	13 %
AB mix	0.5 ml	2.5 ml	4.7 ml
Amortiguador del gel	2.0 ml	7 ml	6.0 ml
Glicerol	-	-	3.6 g
PSA 1 %	50 µl	90 µl	60µl
TEMED	6 µl	9µl	6µl
Volumen total	6 ml	21 µl	18 ml

15.-Preparación del amortiguador usado para la transferencia

Amortiguador de transferencia CAPS (2 L)
4.4 g de CAPS
1800 ml de H ₂ O
200 ml de Metanol
Ajustar el pH a 11 con NaOH 4 N

REFERENCIAS.

- 1.-Borsh M., Graber P., Subunit movement individual H(+)- ATP synthesis and hydrolysis revealed by fluorescence resonance energy transfer. (2005) *Biochem. Soc. Trans.* 33(Pt 4) 878-82.
- 2.- Beltrán y cols. Manual para el estudio de membranas biológicas. Dpto. de Bioenergética, IFC, UNAM, pp.15-19.
- 3.--Cabezón, E., Butler, J.G., Runswick, M.J., Walker, J.E. Modulation of the Dimerization State of the Bovine F1-ATPase Inhibitor Protein, IF1, by pH. (2000) *Journal Biological Chemistry* 275(33): 25460-25464.
- 4.--Cabezón, E., Arechaga, I., Butler, J., Walker, J.E. Dimerization of Bovine F1-ATPase by Binding the Inhibitor Protein, IF1. (2000) *Journal Biological Chemistry* Vol. 275(37): 28353-28355.
- 5.--Cabezón, E., Montgomery, M., Leslie, A., Walker, J.E. The Structure of Bovine F1-ATPase with its Regulatory Protein IF1. (2003) *Nature Structural Biology*, 142: 215-220.
- 6.-Cipriano, D.J., Bi, Y., Dunn, S., Genetic Fusions of Globular Proteins to the Subunit of the Escherichia coli ATP Synthase. (2002) *The Journal of Biological Chemistry*. 277(19): 16782-16790.
- 7.-Chemyak BV, Dukhovich VF, Khodjaev EYu. Regulation of ATP hydrolysis in hepatoma 22a mitochondria. (1991) *Arch Biochem Biophys.*;286(2):604-9.
- 8.-Dianoux, A.-C., Freyssinet, J.-M., Specific Fragmentation of Natural Inhibitor of Mitochondrial ATPase by Trombin. (1982) *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 107(2): 435-441.
- 9.-Dianoux, A., Tsugita, A., Klein, G., Vignais, P. Effects of Proteolytic Fragmentations on the Activity of the Mitochondrial Natural ATPase Inhibitor. (1982) Elsevier Biomedical Press. 140(2): 223-228.
- 10.-Dreyfus, G., Célis, H., Ramírez, J. Isolation of the Mitochondrial F1-F0 Adenosine Triphosphatase by Sepharose - Hexylammonium Chromatography: Properties and Constitution in Liposomes. (1984) *Analytical Biochemistry*. 142: 215-220.
- 11.- Dreyfus, G., Gómez Puyou, A., Tuena de Gómez Puyou, M. Electrochemical Gradient Induced Displacement of the Natural ATPase Inhibitor Protein from Mitochondrial ATPase as Detected by Antibodies against the Inhibitor Protein. (1981) 100(1): 400-406.

- 12.- Domínguez-Ramírez, L., Mendoza-Hernández, G., Carabez-Trejo, A., Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. Equilibrium between Monomeric and Dimeric Mitochondrial F1-Inhibitor protein Complexes. (2001) FEBS 507: 191-194.
- 13.- Fischer, S., Gräber, P., Turina, P. The Activity of the ATP Synthase from *Escherichia coli* is Regulated by the Transmembrane Protein Motive Force. (2000) 275(39): 30157-30162.
- 14.- Galkin, M., Venard, R., Vaillien, J., Velours, J., Haraux, F. Functional Transitions of F₀-F₁-ATPase Mediated by the Inhibitory Peptide IF1 in Yeast Coupled Submitochondrial Particles. (2004) European Journal Biochemistry. 271: 1963-1970.
- 15.-García, J.J. The F₀F₁-ATP Synthase: Binding Energy, Coupling and Rotational Catalysis. (2000) Recent. Res. Devol. Bioener. 1: 41-62.
- 16.-Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., Ernster, L. Inactive to Active Transitions of the Mitochondrial ATPase Complex as Controlled by the ATPase Inhibitor. (1979) Biochimica et Biophysica Acta. 547: 252-257.
- 17.-Harris, D.A. Functional Regions of the H⁺-ATPase Inhibitory Protein from Ox Heart Mitochondria. (1997) Acta 1320: 8-16.
- 18.-Hekman, C., Hatefi, Y. The F₀ Subunits of Bovine Mitochondrial ATP Synthase Complex: Purification, Antibody Production and Interspecies Cross-Immunoactivity. (1991) Archives of Biochemistry and Biophysics. 284(1): 90-97.
- 19.-Itoh, H., Takanashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinoshita Jr., K. Mechanically Driven ATP Synthesis by F₁-ATPase. (2004) Nature Vol. 427. 465-468.
- 20.- Jackson & Harris, The mitochondrial ATP synthase inhibitor protein binds near the terminal of the F₁ beta-subunit. (1988) FEBS 229:224-8, Mimura et al., 1993 J.Biochem 113:350.
- 21.-Ko, Y.H., Delannoy, M., Hüllihen, J., Chiu, W., Pedersen, P.L. Mitochondrial ATP Synthasome. (2003) The Journal of Biological Chemistry. Vol. 278(14): 12305-12309.
- 22.-Lebowitz, M.S., Pedersen, P.L. Protein Inhibitor of Mitochondrial ATP Synthase: Relationship of Inhibitor Structure to pH Dependent Regulation. (1996) Archives of Biochemistry and Biophysics. 330(2): 342-354.
- 23.- Mimura, H., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Ichikawa, N., Tagawa, K., Binding of an intrinsic ATPase inhibitor to the interface between alpha and beta subunits of F₁F₀-ATPase upon the energization of mitochondria. (1993) J. Biochem. 113(3): 350- 4.
- 24.-Minauro-Sanmiguel, F., Bravo, C., García, J.J. Cross-Linking of the Endogenous Inhibitor Protein (IF1) with Rotor (γ , ϵ) and Stator (σ) Subunits of the Mitochondrial ATP Synthase. (2002) Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 34(6): 433-443.

- 25.-Mitome, N., Suzuki, T., Hayashi, S., Yoshida, M. Termophilia ATP Synthase has a Decamer c-ring: Indication of Non Integer 10:3 H⁺/ATP Ratio and Permissive Elastic Coupling. (2004) PNAS. 101(33): 12159-12164.
- 26.-Pullman, M.E., Monroy, G. A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. (1963) The Journal of Biological Chemistry. 238(11): 3762-3769.
- 27.-Rouslin, W., Broge, Ch.W. Factors Affecting the Reactivation of the Mitochondrial Adenosine 5'-Triphosphatase and the Release of ATPase Inhibitor Protein During and Following the Reenergization of Mitochondria from Ischemia Cardiac Muscle. (1989) Archives of Biochemistry and Biophysics. 275(2): 385-394.
- 28.-Rouslin, W., Broge, Ch.W., Guerrieri, F., Capozza, G. ATPase Activity, IF1 Content and Proto Conductivity of ESMP from Control and Ischemic Slow and Fast Heart-Rate Hearts. (1995) Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 22(4): 459-466.
- 29.-Rouslin, W., Broge, Ch.W. Regulation of the Mitochondrial Adenosine 5'-Triphosphatase in situ During Ischemia and in Vitro in Intact and Sonicated Mitochondria from Slow and Fast Heart-Rate Hearts. (1990) Archives of Biochemistry and Biophysics. 280(1): 103-111.
- 30.-Schägger, H., Von Jagow, G. Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate, Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 KDa. (1987) Analytical Biochemistry. 166: 368-379.
- 31.-Schägger, H., Von Jagow, G. Blue Native Electrophoresis for Isolation of Membrane Protein Complexes in Enzymatically Active Form. (1991) Analytical Biochemistry. 199: 223-231.
- 32.-Scholenberg, B., Aggeler, R., Murray, J., Capaldi, R.A. The γ ϵ -c Subunit Interface in the ATP Synthase of Escherichia coli. (1999) The Journal of Biological Chemistry. 274(48): 34233-34237.
- 33.-Scholenberg, B., Capaldi, R.A. The ϵ Subunit of the F1F0 Complex of Escherichia coli. (1999) The Journal of Biological Chemistry. 274(40): 28351-28355.
- 34.-Schwerzmann, K., Pedersen, P.L. Regulation of the Mitochondrial ATP Synthase/ATPase Complex. (1986) Vol. 250(1): 1-18.
- 35.-Solaini, G., Baracca, A., Gabellier, E., Lenaz, G. Modification of the Mitochondrial F1-ATPase ϵ Subunit, Enhancement of the ATPase Activity of the IF1-F1 Complex and IF1-Binding Dependence of the Conformation of the ϵ Subunit. (1997) Journal Biochemistry. 327: 443-448.
- 36.-Stout, J.S., Partridge, B.E., Dibbern, D.A., Schuster, S.M. Peptide Analogs of the Beef Heart Mitochondrial F1-ATPase Inhibitor Protein. (1993) Biochemistry. 32: 7496-7502.
- 37.-Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., García Trejo, J.J. The H⁺-ATP Synthase: A Biochemical Challenge. (1995) Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science. Volume 47(3): 121-130.

- 38.-Tuena de Gómez-Puyou, M., Gavilanes, M., Gómez-Puyou, A., Ernster, L. Control of Activity Status of Heart Mitochondrial ATPase. Role of the Proton-Motive Force and Ca²⁺. (1980) *Acta* 592: 396-405.
- 39.-Tuena de Gómez-Puyou, M., Muller, U., Devars, S., Nava, A., Dreyfus, G. Functional and Immunological Characterization of ATPase Inhibitor Proteins from Heart, Liver and Yeast Mitochondrial. (1982) Elsevier Biomedical Press. 146(1): 168-172.
- 40.-Tuena de Gómez-Puyou, M., Muller, U., Dreyfus, G., Ayala, G., Gómez-Puyou, A. Regulation of the Synthesis and Hydrolysis of ATP by Mitochondrial ATPase. (1983) 258(22): 13680-13684.
- 41.-Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Nordenbrand, K., Muller, U., Ernster, L. The Interaction of Mitochondrial F₁-ATPase with the Natural ATPase Inhibitor Protein. (1980) *Biochimica et Biophysica Acta* 592: 385-395.
- 42.-Towbin, H., Theophil, S., Gordon, J. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 76(9): 4350-4354.
- 43.- Zanotti, F., Raho, G., Gaballo, A., Papa, S. Inhibitory and Anchaing Domains in the ATPase Inhibitor Protein IF1 of Bovine Heart Mitochondrial ATP Synthase. (2004) *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 36(5): 447-457.
- 44.- Zanotti, F., Raho, G., Gaballo, A., Gaballo, A., Papa, S. Inhibitory and Anchoring Domains in the ATPase Inhibitor Protin IF1 of Bovine Heart Mitochondrial ATP Synthase. (2004) *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 35(5)447-457.