

20
7

Influencia del ATP sintetizado en la F_1 -ATPasa mitocondrial soluble sobre algunas características catalíticas y estructurales de la enzima.

Tesis que presenta Eugenia Silva-Herzog Márquez, para obtener el grado de Licenciada en Investigación Biomédica Básica.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	<u>PAG.</u>
<u>INTRODUCCION</u>	
I. Cadena de Transporte de Electrones.....	2
II. H^+ -ATP sintetasa.....	7
A. Estructura	
1. Sector Catalítico	8
2. Sector Membranal.....	11
B. Catálisis.....	13
1. Características Generales	
2. Modelos del Mecanismo Catalítico.....	16
a) Modelo de Tres Sitios Idénticos Alternantes.	17
b) Modelo de Dos Sitios Catalíticos Alternantes.	21
c) Modelo de Subunidades Heterogéneas. Un sitio catalítico y dos Reguladores.....	23
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	
I. Preparaciones Biológicas.....	28
A. Preparación de Mitocondrias de Corazón de Res	
B. Preparación de Partículas Submitocondriales.....	29
C. Preparación del Factor de Acoplamiento F_1	30
II. Preparación de [γ - ^{32}P] ATP.....	31
III. Métodos de Cuantificación y Determinación.....	32
A. Ensayo de Actividad Hidrolítica	

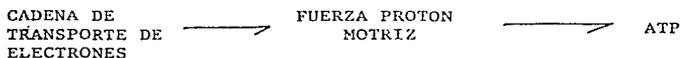
	<u>PAG.</u>
1. Ensayo Radioactivo	
2. Ensayo Espectrofotométrico.....	33
B. Ensayo de Síntesis de ATP.....	34
C. Identificación del [$-^{32}\text{P}$] ATP formado	
1. Columnas de PEI-celulosa	
2. Ensayo de Luciferín-Luciferasa.....	35
D. Cuantificación de Proteína	
<u>RESULTADOS</u>	37
I. La Enzima en Dimetilsulfóxido.....	38
A. Características Catalíticas	
B. Cambios en Conformación.....	42
II. La Enzima con ATP Sintetizado.....	46
A. Características Catalíticas	
1. Hidrólisis en Concentraciones Altas de Mg^{2+}	
2. Hidrólisis en Concentraciones Bajas de Mg^{2+}	50
B. Cambios en Conformación.....	55
<u>DISCUSION Y CONCLUSIONES</u>	59
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	72
<u>ABREVIATURAS</u>	79
<u>INDICE DE TABLAS, ESQUEMAS Y FIGURAS</u>	81

I N T R O D U C C I O N

La energía es indispensable para el funcionamiento y reproducción de las células vivas. La fuente última de energía para la vida es la radiación solar. Los vegetales y algunas bacterias la utilizan directamente para llevar a cabo la fotosíntesis de compuestos orgánicos; mientras que otras bacterias y todos los animales obtienen su energía de la oxidación de estos compuestos orgánicos.

Dentro de la célula la energía se puede encontrar y expresar en varias formas; una de las principales es la energía osmótica a través del establecimiento de gradientes electroquímicos de protones entre un lado y otro de ciertas membranas. Muchas de las reacciones que producen y las que consumen energía están ligadas por circuitos de protones. Esta energía protónica se utiliza para una gran variedad de funciones en la célula: rotación flagelar en bacterias, transporte de iones y metabolitos, generación de un potencial de membrana, transporte de proteínas y síntesis de adenosín trifosfato (ATP). Este último es la forma más importante en la cual la energía química se conserva y almacena en todos los organismos. La hidrólisis de ATP, a su vez, se acompaña de la liberación de energía que permite que sucedan algunas reacciones termodinámicamente desfavorables, sosteniendo así la mayor parte del metabolismo celular. La transformación del gradiente de H^+ en energía para la síntesis de ATP fue propuesta por Peter Mitchell en 1961 (1) como la hipótesis quimiosmótica y constituye el "dogma

central" de la bioenergética. Esto se puede esquematizar de la siguiente forma:



La transducción de energía ya sea de la oxidación de sustratos (fosforilación oxidativa) o de la absorción de luz (fotofosforilación) a una fuerza protón motriz, y la utilización de esta energía protónica para la síntesis de ATP están catalizados por complejos multienzimáticos localizados en membranas.

El sistema de fosforilación oxidativa en eucariontes se localiza en la membrana interna mitocondrial que está compuesta de aproximadamente 70% proteína y 30% lípidos. En las mitocondrias de corazón de res, aproximadamente el 50% de la proteína de la membrana interna está asociada al sistema enzimático que cataliza la fosforilación oxidativa. El resto incluye, sistemas de transporte y enzimas que actúan como donadores de electrones para la cadena respiratoria. Funcionalmente el sistema de fosforilación oxidativa mitocondrial se puede dividir en 5 complejos lípido-protéicos:

- NADH: ubiquinona oxidoreductasa (complejo I)
- succinato: ubiquinona oxidoreductasa (complejo II)
- ubiquinol: ferricitocromo c oxidoreductasa (complejo III)
- ferrocitocromo c: oxígeno oxidoreductasa (complejo IV)
- H⁺-ATP sintetasa. (complejo V)

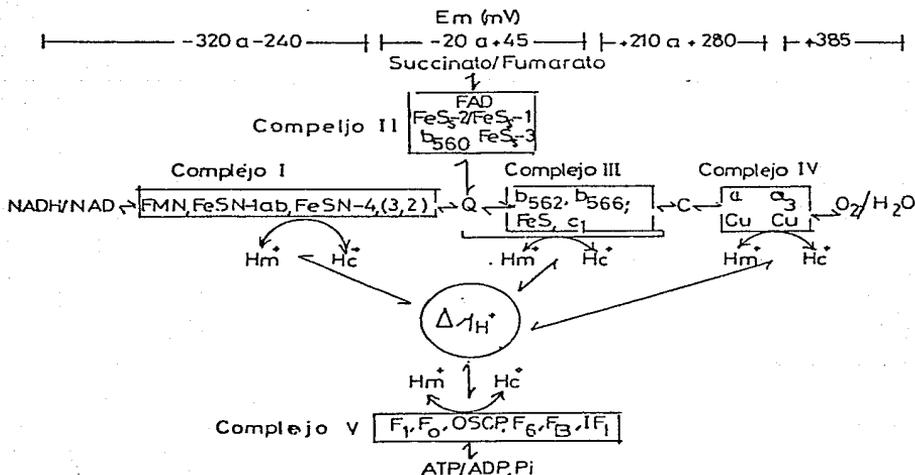
La composición de estos complejos se describe en la siguiente tabla:

T A B L A I
COMPOSICION DE LOS COMPLEJOS DEL SISTEMA DE FOSFORILACION OXIDATIVA ^(a)

COMPLEJOS	PESO MOLECULAR $\times 10^6$ (MONOMERO)	POLIPEPTIDOS	GRUPOS PROSTETICOS	RELACION EN MITOCONDRIAS
I	0.7 - 0.9	25	FMN, gpo. FeS	1
II	0.14	4-5	FAD, gpo. Fe-S b_{560} hemo	2
III	0.25	9-10	b_{562} , b_{566} , c_1 hemo, gpo. [2Fe-2S]	3
IV	0.16-0.17	8	hemo aa_3 , Cu_a , Cu_{a3}	6-7
V	0.5	12-14	adenin nucleotidos Mg^{2+}	

(a) Tomado de (2)

Funcionalmente, los 5 complejos interactúan como se muestra en el siguiente esquema:



Esquema 1. Interacción entre los complejos del sistema de fosforilación oxidativa. FeSN-4 (3,2) = FeSN-4, FeSN-3, FeSN-2.

Los complejos I, II, III y IV, la ubiquinona (Q) y el citocromo c forman la cadena respiratoria, que cataliza la transferencia de equivalentes reductores del NADH o del succinato generados en la matriz mitocondrial, al oxígeno. Como se muestra en el esquema, los acarreadores de electrones de la cadena, parecen abarcar 3 regiones cuasi-equipotenciales, donde la caída de energía es menor de 100 mV. En estas regiones hay una conservación máxima de energía. También hay intervalos (representados por el rompimiento de la escala de potencial medio (E_m)), donde la caída de energía parece ser mayor de 100 mV. El significado de esto en el mecanismo de transducción de energía no se conoce.

Entre etapas a lo largo de la cadena, representados por el complejo I, III y IV, la energía de oxidación se conserva a través de la translocación vectorial de protones generando un gradiente electroquímico de protones ($\Delta \tilde{\mu}_{H^+}$), que como ya se mencionó se puede utilizar para la translocación de iones, transporte proteico y síntesis de ATP entre otras funciones. El sistema es reversible hasta el nivel del citocromo c que es la tercera región equipotencial (5). Sin embargo, el paso final de la transferencia de electrones del citocromo a_3 al oxígeno no es reversible, lo cual desplaza el equilibrio del sistema en dirección a la síntesis de ATP. Los complejos I, III y IV aislados catalizan la translocación de protones acoplada a la transferencia de electrones al reconstituirse en vesículas (6) y la incorporación del complejo I o IV con la ATP sintetasa en liposomas, reconstituye la fosforilación oxidativa (7). A continuación describimos brevemente cada uno de los complejos.

NADH: ubiquinona oxidoreductasa. Complejo I.

Este complejo cataliza la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona, acoplada a una translocación vectorial de protones. La estequiometría de la translocación de protones acoplada a la transferencia de electrones (H^+/e^-) se ha calculado que tiene un valor de 1 ó 2 (6). Sin embargo el mecanismo de translocación no se conoce (8).

El complejo I está compuesto de por lo menos 10 polipéptidos diferentes, algunos de los cuales se han identificado como la NADH-deshidrogenasa, una ferrosulfoproteína no hemo con 4 FeS, la ubiquinona, un flavín mononucleótido (FMN) y un azufre ácido lávil.

Succinato: ubiquinona oxidoreductasa. Complejo II.

El complejo II cataliza la transferencia de electrones del succinato a la ubiquinona. No transloca protones.

Este complejo está compuesto de 4 polipéptidos, siendo el principal componente la succinato deshidrogenasa; además contiene un flavín adenín nucleótido (FAD), 3 Fe no hemo, 1 azufre ácido lávil y 1 citocromo b_{558} (7).

Ubiquinol: ferricitocromo c oxidoreductasa. Complejo III.

Este complejo cataliza la transferencia de electrones de la ubiquinona reducida (QH_2) al citocromo c. El mecanismo involucra un ciclo en el que la ubiquinona reducida primero se oxida a semiquinona por el citocromo b_{565} y después a la ubiquinona completamente oxidada por el cito-

cromo c_1 . En la "parte reductora" del ciclo, la ubiquinona reduce al citocromo b_{562} y pasa a la forma de semiquinona. En un segundo paso la ubiquinona se reduce nuevamente por el sustrato, ya sea del complejo I o II (7,8). La transferencia de electrones a través del complejo III está acoplada a la translocación de protones, con una estequiometría de $H^+/e^- = 2$ y una translocación neta de carga positiva para afuera de $q^+/e^- = 1$ (2).

El complejo III es un dímero. Cada monómero está compuesto por 9-10 polipéptidos diferentes, 3 de los cuales están asociados a los centros redox. Estos centros son los hemo b_{562} , b_{566} y c_1 , el complejo $[2 Fe-2S]$ tipo Rieske. Además de dos especies de semiquinona en diferentes dominios del complejo.

Ferricitocromo c: oxígeno oxidoreductasa. Complejo IV.

Se ha designado también como citocromo oxidasa; es un complejo polipeptídico que cataliza el paso terminal de la cadena respiratoria. Cataliza la reducción con 4 electrones del oxígeno molecular por un solo donador de electrones, el ferricitocromo c. Está compuesta por 2 centros redox que difieren en E_m aparente en 100 mV. El primer centro es el citocromo a Cu_a que recibe electrones del ferrocitocromo c y el segundo centro es el citocromo a_3 Cu_{a_3} que es el sitio de reducción del oxígeno.

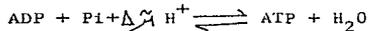
La citocromo oxidasa es una bomba de protones redox dependiente. Se ha propuesto que genera una fuerza protón motriz por dos mecanismos diferentes acoplados y en serie. Primero una translocación pura de protones que involucra al hemo y segundo una "anulación" de cargas eléctricas cuando los electrones del citocromo c en el lado citoplásmico se unen con un protón que proviene del lado de la matriz mitocondrial y se unen a $1/2 O_2$ para formar H_2O . Este último paso es el único irreversible de la cadena de transporte de electrones (7).

La fuerza protón motriz generada de esta forma por la cadena de transporte de electrones se transforma en energía química de ATP por la H^+ -ATP sintetasa (complejo V) que se encuentra localizada en la cara interna de la membrana interna mitocondrial.

H^+ -ATP sintetasa

A. Estructura

La H^+ -ATP sintetasa mitocondrial es la enzima terminal de la fosforilación oxidativa. Cataliza la siguiente reacción reversible:



La H^+ ATP sintetasa tanto mitocondrial como de cloroplastos y bacterias, consta de dos sectores: el factor de acoplamiento F_1 que sale de la membrana y que se puede liberar de ésta por distintos métodos físicos. La forma soluble de la enzima (F_1), retiene la habilidad de hidrolizar ATP, pero no la de sintetizarlo, excepto en condiciones especiales que se detallarán más adelante. El otro factor es el sector hidrofóbico o

F_o, está integrado a la membrana y tiene la capacidad de translocar los protones.

1. Sector Catalítico

Se ha descrito que el factor de acoplamiento F₁ tiene un peso molecular de 347,000 (9) o de 360,000 (10), y consiste de 5 subunidades diferentes: α , β , δ , δ y ϵ y de un péptido disociable, la proteína inhibidora. La estequiometría de las subunidades se ha establecido como $\alpha_3\beta_3\delta\delta\epsilon$ por estudios de marcaje de grupos sulfhidrilos en el factor F₁ de la bacteria termofílica PS3 (TF₁) por Yoshida (11) y, en experimentos de marcaje de afinidad y recuperación de las subunidades purificadas realizados por Esch y Allison (12).

Se han identificado sitios de unión de adenín nucleótidos sólo en las subunidades α y β . Estos sitios son de dos tipos; unos en que la unión es rápida y reversible (sitios intercambiables) y que corresponden a los catalíticos, y otros en que la unión es lenta y prácticamente no son disociables (sitios no-intercambiables). Con base en las siguientes observaciones se ha postulado a la subunidad β como la responsable de la actividad catalítica. Experimentos de inhibición de la actividad hidrolítica por diciclohexilcarbodimida marcado con ¹⁴C (DCCD) de Yoshida (13,14) que se acompañan del marcaje de la subunidad β y experimentos con análogos de ATP fotoreactivos que se unen covalentemente al sitio activo, muestran que éste se encuentra en la subunidad β (15,16). Se han descrito por lo menos 4 residuos esenciales para la actividad en la subunidad β y son: arginina, lisina, tirosina, y glutámico. Se

ha propuesto que el residuo de arginina participa en la unión al fosfato (17,18), el de lisina en la unión de adenín nucleótidos (19), el de tirosina con el ADP y el de glutámico en la unión de Mg^{2+} (20). Recientemente se ha logrado observar en la subunidad β aislada actividad hidrolítica aunque muy baja (21).

Estos resultados, sugieren que el sitio catalítico del complejo H^+ -ATP sintetasa está localizado en la subunidad β del factor de acoplamiento F_1 . Sin embargo, también se ha propuesto que el sitio activo puede estar localizado en la subunidad β pero en la interfase entre ésta y la subunidad α (22,23). También hay resultados que sugieren que en esta interfase están localizados los sitios de nucleótidos no intercambiables (24).

El sitio de unión de adenín nucleótidos de la unidad α es de alta afinidad y de disociación lenta y ha sido calificado como incapaz de intercambiar nucleótidos. La asociación del nucleótido a la subunidad α no requiere de Mg^{2+} (25), y se ha descartado que tenga una relación directa en la catálisis (26,28). El papel de estos tres sitios no se conoce con exactitud por lo que se ha propuesto una función reguladora (29,23) o una esencialmente estructural análoga a la de algunos metales intrínsecos de algunas enzimas (30). Sin embargo no se tiene la certeza sobre la composición de adenín nucleótidos en la H^+ -ATP sintetasa in vivo.

La subunidad δ no tiene sitios de unión para nucleótidos. Los estudios de entrecruzamiento en el complejo aislado (31), y otros más recientes acerca de la estructura tridimensional de la enzima, sugieren que la subunidad δ está en la parte central del complejo, interactuando con las subunidades α y β . De esta forma se le ha propuesto un papel organizador del complejo $\alpha\beta\delta$, que es la mínima unidad con actividad catalítica del orden de la enzima nativa (32) (la β aislada tiene muy baja actividad).

Con respecto a las subunidades δ y ϵ se ha propuesto que interactúan con el sector membranal. Se ha demostrado que la subunidad δ aislada inhibe la conductancia a protones y permite la formación de un potencial, que se aumenta por la adición de la subunidad ϵ en partículas sub-mitocondriales (33). En bacterias se ha probado que la subunidad ϵ es la que interactúa principalmente con el sector membranal (32,34). De esta forma se ha propuesto que las subunidades δ y ϵ tanto mitocondriales como bacterianas, se unen al sector membranal y lo conectan con el complejo $\alpha\beta\delta$ aunque no hay evidencias claras de cómo se unen al resto del factor F_1 .

La proteína inhibidora generalmente se encuentra asociada a la F_1 in vivo, y es capaz de inhibir la hidrólisis de ATP en la enzima soluble y en la unida a la membrana, así como todas las reacciones dependientes de hidrólisis de ATP en la mitocondria. Se ha propuesto que la asociación de la proteína inhibidora con la ATP sintetasa in vivo se regula

por el estado energético de la membrana (35,37) y por la cantidad de proteína inhibidora presente (38). Para que la proteína inhibidora inhiba a la ATP sintetasa se requiere que la enzima hidrolice sustrato (39). Gómez-Fernández y Harris (40) proponen que la hidrólisis de NTP produce un estado conformacional que favorece la interacción de la proteína inhibidora con la ATP sintetasa; por otro lado Van de Stadt y colaboradores (35) han propuesto que la interacción depende de la relación ATP/ADP.

Existen evidencias que demuestran que la proteína inhibidora se une a la subunidad β de la F_1 soluble (41) y hay resultados experimentales que sugieren que se une a un sitio diferente al sitio catalítico (42). Se ha demostrado que se necesita sólo 1 mol de proteína inhibidora para inhibir totalmente 1 mol de F_1 (41) a pesar de que existen 3 moles de β por F_1 . Sin embargo, no se sabe si tienen más sitios de unión.

2. Sector Membranal.

El factor F_0 es muy poco conocido; se ha estudiado y purificado en bacterias, en donde constan de tres subunidades diferentes, a, b y c. En mitocondrias se han detectado por lo menos 9 polipéptidos diferentes como componentes de F_0 . La estequiometría de este sector en bacterias no está bien establecida, pero se ha propuesto $a_1b_2c_{10}$, ó $a_1b_2c_{12}$, ó $a_1b_2c_6$ (30). Los datos sobre la hidrofobicidad de las secuencias de los polipéptidos sugieren que atraviesan la membrana dos veces y que tienen una porción que une ambas partes por fuera de la membrana.

Se ha demostrado que los polímeros de la subunidad c, o proteolípido, son capaces de translocar selectivamente protones. El mecanismo de translocación de protones a través de la membrana se conoce poco. Por otro lado, los resultados de experimentos de mutaciones y digestión con proteasas sugieren que las subunidades a y b están relacionadas con la unión del sector membranal al factor F_1 .

También se han descrito en la H^+ -ATP sintetasa mitocondrial otros segmentos que no son propiamente ni del sector F_1 ni del sector F_0 y son: la proteína que confiere sensibilidad a oligomicina (OSCP), el factor B (F_B) y el factor 6 (F_6).

La OSCP tiene como función principal unir al factor F_1 con el sector membranal (43,44) y confiere sensibilidad de la actividad hidrolítica a la oligomicina, (aunque no es el sitio de unión de ésta) (31,15) al DCCD y a la rutamicina (44). Esta proteína es esencial para la correcta reconstitución del factor F_1 con el sector membranal (46).

El factor B es una proteína que está unida a F_0 aparentemente por medio de la subunidad c de ésta. Se ha sugerido que participa en la organización del canal de protones a través de sus grupos tiol (47) aunque no hay evidencia directa. Es necesario para el acoplamiento del factor F_0 y la translocación de protones con el factor F_1 y la actividad catalítica (48).

El papel del factor 6 no está bien definido todavía; se ha propuesto que participa en la unión de F_1 a F_0 (49-51) de una manera no directa sino

en conjunto con la OSCP (52) aunque hay evidencias contradictorias (48).

B. Catálisis.

Existen muchos resultados que demuestran que la síntesis y la hidrólisis de ATP comparten el mismo sitio catalítico en la H^+ -ATP sintetasa mitocondrial, de cloroplastos y bacterias. Sin embargo, se debe suponer que la entrada de energía debe favorecer algún estado conformacional del sitio catalítico en que la reacción de síntesis sea preferente (53).

Se ha demostrado también que no existe en el ciclo catalítico un intermediario fosforilado covalente. Por un lado ciertos estudios estereoquímicos de la reacción de transferencia del grupo fosforil a su aceptor, y el análisis de la configuración del producto, demostraron que hay una transferencia directa del fosfato del ATP al H_2O durante la hidrólisis (54). Por otro lado, los estudios de recambio con ^{18}O durante la síntesis han probado que el puente de oxígeno entre el ADP y el Pi lo da el ADP (55), lo cual indica que no hay intermediarios covalentes con la enzima durante esta transferencia.

Existen evidencias que sugieren que la interconversión reversible de ATP en ADP y Pi en el sitio catalítico puede ocurrir sin necesidad de un cambio apreciable de energía libre. El grupo de Grubmeyer en cloroplastos (56) dedujo una K_{eq} de 0.5 para la hidrólisis de ATP no estimulada y Feldman y Sigman (57) midiendo la síntesis de ATP una K_{eq} de 2.

El grupo de Boyer, midiendo recambio $\text{Pi} \rightleftharpoons \text{H}_2^{18}\text{O}$ en la F_1 soluble demostró una interconversión continua de ATP en ADP y Pi en el sitio activo (58).

De manera independiente, el grupo de de Meis demostró que una enzima soluble, en este caso la pirofosfatasa, en un medio con una menor actividad de agua producido por solventes orgánicos, es capaz de sintetizar pirofosfato a partir de Pi del medio (59). Sakamoto y Tonomura (60) observaron que la F_1 mitocondrial sintetiza ATP unido a la enzima a partir de ADP y Pi del medio en un medio con dimetilsulfóxido (Me_2SO). Lo cual corrobora que la formación del enlace β - δ -Fosforil del ATP se lleva a cabo sin necesidad de energía.

La F_1 nativa contiene 3 moles de nucleótidos unidos no intercambiables y es capaz de unir 3 moles más del análogo no hidrolizable 5' -adenilil- β - δ - imidodifosfato (AMP-PNP) por mol de F_1 , con una alta cooperatividad negativa de unión entre los sitios. El primer sitio tiene una K_d de 18 nM y los otros dos de menor afinidad, con una K_d de alrededor de 1 μM (61). Esta cooperatividad negativa también se ha reportado para el mismo sustrato (ATP) y para otros análogos como el 2', 3' -O- (2,4,6-Trinitrofenil) ATP (TNP-ATP) (62).

Cuando un solo sitio catalítico de la F_1 une sustrato, ("primer sitio"), la enzima muestra una velocidad de hidrólisis muy baja siendo la disociación del producto el paso limitante (56,62,63). Al ocuparse un segundo sitio catalítico, ya sea por un análogo o incluso por el mismo sustra-

to, hay una aceleración de 10^6 veces en la hidrólisis del "primer sitio" (61,63). Se ha sugerido también que la ocupación del tercer sitio provoca a su vez una aceleración, aunque menor, en la hidrólisis del segundo sitio.

Grubmeyer y colaboradores (56) determinaron en F_1 de cloroplastos una K_a para ATP en el "primer sitio" de $10^{-12} M^{-1}$ y una K_d para el ADP en hidrólisis no promovida de $0.28 \mu M$. Cross por su parte (61), encontró una K_m para el segundo y tercer sitios de 30 y $150 \mu M$ respectivamente. El incremento en la velocidad de hidrólisis de ATP en el "primer sitio" por la unión de sustrato en el "segundo sitio" involucra tanto la aceleración de la velocidad de rompimiento del enlace, como el aumento en la liberación del producto (63,61). La afinidad por los productos en el "primer sitio" decrece por un factor de 10^5 o hasta 10^6 al ocuparse el segundo sitio, lo cual aumenta la velocidad de salida de éste. El grupo de Boyer ha mostrado que la unión de ADP y P_i promueve la liberación de ATP durante la síntesis (64) y que la unión de ATP promueve la liberación de ADP y P_i durante la hidrólisis neta (65). Estas características demuestran una cooperatividad positiva de catálisis y una negativa de unión de nucleótidos.

El grupo de Hatefi ha demostrado que esta cooperatividad entre sitios es también característica esencial en la reacción de síntesis en la ATP sintetasa mitocondrial unida a membrana (66) y el grupo de Boyer lo ha demostrado para la fotofosforilación (61). De esta forma la coopera-

tividad entre sitios y los cambios grandes en afinidades de los sitios catalíticos por sus sustratos y productos, son parte necesaria e integral de la catálisis tanto hidrolítica como sintética.

Por otro lado, se han reportado numerosos agentes que modifican a la F_1 y reaccionan con la mitad o con un tercio de los sitios. Tanto el 4-Cloro-7-Nitrobenzofurazano (Nbf-Cl) como el de DCCD uniéndose a un solo residuo en la F_1 (para Nbf-Cl una tirosina (68-69) y glutámico para DCCD (70-71)), inhiben en más de un 95% la capacidad hidrolítica de la enzima. También se sabe que 1 mol de efrapeptina por mol de F_1 inhibe tanto la síntesis como la hidrólisis de ATP en partículas submitocondriales (72).

Modelos del Mecanismo Catalítico

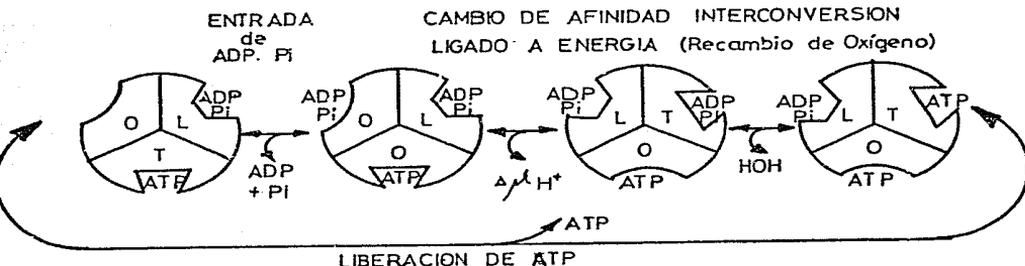
De esta forma y basados en las siguientes premisas, se han postulado varios modelos que intentan explicar el mecanismo catalítico de la H^+ -ATP sintetasa.

1. El rompimiento y la formación del enlace $\beta - \gamma$ - fosforil del ATP puede proceder sin un requerimiento de energía en el sitio catalítico tanto en la F_1 soluble como en la unida a membrana.
2. La energía del gradiente electroquímico de protones, generada por la cadena de transporte de electrones o la hidrólisis de ATP, y no los protones directamente como se ha propuesto (73), pueden provocar cambios en las afinidades de los sitios de unión de adenín nucleótidos y Pi en la F_1 , de tal forma que la unión de sustrato y la liberación de producto se faciliten.

3. Los sitios de nucleótidos muestran un alto grado de interacción. Hay cooperatividad negativa de unión y positiva de catálisis.

Modelo de tres sitios idénticos y alternantes

El grupo de Boyer ha propuesto el "mecanismo de cambio de afinidad de unión dependiente de energía" (revisado en 27), cuyo fundamento es la participación alternante y en secuencia de los tres sitios catalíticos, con cambios de afinidad en la unión de nucleótidos dependientes de energía como base para la síntesis de ATP en la enzima unida a membrana (74); aunque se aplica también a la enzima soluble. Una característica importante de este modelo es que los tres sitios se toman como idénticos y participando en secuencia. Durante la hidrólisis cada sitio "en turno" pasa por tres etapas: unión de ATP, interconversión del ATP fuertemente unido en ADP y Pi fuertemente unidos, y liberación del ADP y Pi; en la síntesis el proceso sería igual pero de dirección opuesta. Cada una de las tres subunidades pasarían por un estado transitorio correspondiente a cada una de las tres diferentes conformaciones principales en un tiempo dado.



Esquema 2. Participación de los tres sitios alternantes en el mecanismo de cambio de unión. El esquema muestra un tercio del ciclo de la enzima según el modelo. L = unión débil (catalíticamente inactivo), T = unión fuerte (catalíticamente activo), O = sitio con baja afinidad (inactivo).

Proponen que la translocación de protones debe estar acoplada a una transición conformacional del complejo enzimático que determine los cambios de afinidad en la unión de Pi, ADP y ATP.

Tomando en cuenta que el complejo ATP sintetasa tiene una cinética de enzima cooperativa (75,76), se ha estudiado el mecanismo por el cual una subunidad afecta la velocidad de reacción de otra subunidad o del complejo entero. Si la unión de un ligando a una subunidad modifica la velocidad de la reacción en otra subunidad, la concentración en el medio de este ligando cambiará la partición de los intermediarios de la reacción en la enzima (58). El grupo de Boyer utiliza las reacciones de recambio como monitores de los intermediarios de la reacción. Las más utilizadas son: la reacción de incorporación del ^{18}O del $[\text{O}^{18}] \text{HOH}$ en el Pi durante la hidrólisis de ATP y la reacción de incorporación de ^{18}O en el ATP durante la síntesis. La modulación de estas reacciones de recambio de oxígeno por el estado de energización, la presencia de desacoplantes e inhibidores, o por cambios en la concentración de sustratos, ha contribuido importantemente al desarrollo del modelo de los sitios catalíticos alternantes.

Los resultados de estos recambios se han analizado bajo la premisa de que reflejan el rompimiento reversible de ATP unido en ADP y Pi fijos en un sitio catalítico. En la hidrólisis de ATP catalizada por cualquier ATP sintetasa en presencia de H^{18}OH , un mínimo de un átomo de oxígeno del agua debe aparecer en cada Pi formado, lo cual está determinado por la estequiometría de la reacción (recambio medio). Otros ^{18}O adicionales pue-

den aparecer por reacciones de recambio; en el recambio $\text{ATP} \rightleftharpoons \text{HOH}$ hay una incorporación de más de un átomo de oxígeno del agua en el Pi del ATP en el sitio catalítico antes de que se libere (recambio intermedio). Esto permite una estimación del número de veces que el ATP en el sitio catalítico se hidroliza y sintetiza antes de liberarse el Pi al medio (58).

En esta forma, la relación O/P (oxígenos del agua en cada Pi liberado durante la hidrólisis), tiene un límite superior de cuatro, que corresponde a un número infinito de reacciones reversibles antes de la liberación del Pi y un límite inferior de 1 determinado por la estequiometría de la reacción. A bajas concentraciones de ATP (0.035 μ M), el $^{18}\text{O}/\text{P}$ es de 3.96 y a concentraciones altas de ATP (5 mM) de 1.02. Si se calcula el número de hidrólisis reversibles del ATP unido antes de la liberación de Pi se ve que hay una diferencia de 1.1×10^4 veces, lo cual sugiere la posible utilización de la energía de unión del ATP para cambiar la velocidad de las reacciones involucradas. Esto a su vez es un reflejo del grado de acoplamiento entre los sitios alternantes.

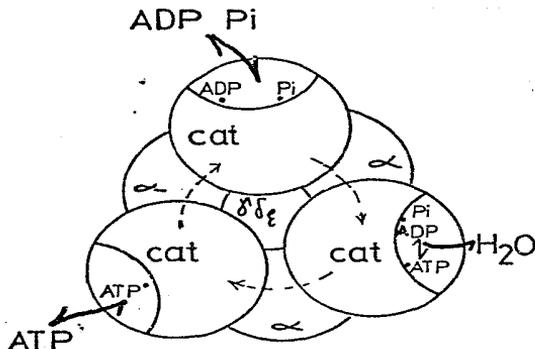
El recambio $\text{Pi} \rightleftharpoons \text{HOH}$ en partículas submitocondriales es dependiente de energía (77), ya sea de un sustrato oxidable o de la hidrólisis de ATP. Esto sugiere un requerimiento de energía en la unión y el rompimiento del ATP para dar la energía de unión de Pi en una forma que permita la formación reversible de ATP. La relación $^{18}\text{O}/^{32}\text{P}$ cae en el tiempo sólo si hay ATP en el medio; lo que sugiere que la liberación del Pi al medio requiere de ATP además de la presencia de energía proveniente de la oxi-

dación de sustratos (78).

Se han medido también los efectos de variaciones en la concentración de Pi a concentraciones saturantes de ADP, y de variaciones de las concentraciones de ADP a concentraciones saturantes de Pi durante la síntesis. Al disminuir la concentración de Pi el grado de recambio intermedio aumenta i.e. cada ATP unido pasa por más rompimientos reversibles antes de ser liberado. De la misma forma hay un incremento del recambio intermedio $ATP \rightleftharpoons HOH$ a bajas concentraciones de ADP. Esto sugiere que el ATP sintetizado en un sitio no se libera hasta que se unen el ADP y el Pi en un segundo sitio (64).

En este modelo, durante la fosforilación oxidativa neta, el ATP se forma en un sitio y está fuertemente unido. No se libera hasta que ADP y Pi se unen a un segundo sitio y exista gradiente de H^+ lo que permite que el complejo ATP sintetasa membranaral esté energizado. En condiciones para la hidrólisis, la unión de ATP en un sitio se acompaña de la hidrólisis del ATP antes fuertemente unido en un segundo sitio.

En este modelo existe un solo sitio de interacción de energía que provoca una transición conformacional responsable tanto de la promoción de la unión de ADP y Pi en un sitio como de la liberación del ATP fuertemente unido en otro sitio (64).



cat = subunidad catalítica

Esquema 3. Modelo de tres sitios idénticos y alternantes.

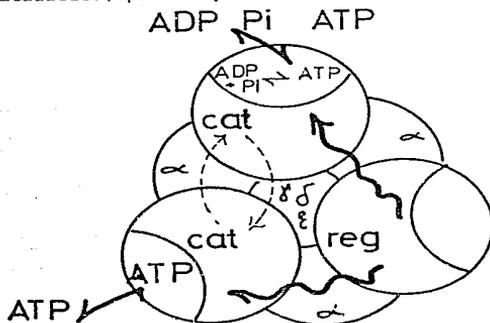
Modelo de dos sitios catalíticos alternantes y uno regulador

Analizando el número de sitios de unión del análogo hidrolizable de ATP TNP-ATP el grupo de Grubmeyer y Penefsky observa que éste tiene dos sitios de unión y que ambos se pueden hidrolizar a la misma velocidad, por ello proponen dos sitios catalíticos (62). La velocidad de hidrólisis en estos sitios aumenta al incrementar la concentración de TNP-ATP o de otros nucleótidos en el medio y se ve muy disminuida cuando la relación nucleótido-enzima es muy baja (63).

De esta forma, se propone un mecanismo en el que también hay una participación en secuencia de los sitios con cambios de unión dependientes

de energía, pero sólo de dos subunidades β . Por su parte, el grupo de Gautheron, Godinot y Di Pietro (79) sugiere que la otra subunidad β no catalítica es reguladora. Demuestran una cinética bifásica de inhibición de la actividad por un análogo de ATP, el 5' [P-(fluorosulfonyl) benzoil] adenosina (FSEA) y por lo que propone la existencia de dos tipos de sitios, uno regulador y otro catalítico coexistente (79).

También han demostrado un comportamiento "histerético" de la F_1 ATP sintetasa (80) que se caracteriza por la unión lenta de ADP que induce una inhibición progresiva de la hidrólisis de ATP. La unión de 1 mol de ADP por mol de F_1 es capaz de inhibir casi totalmente la actividad. Esta inhibición y la unión de ADP son reversibles sólo en ausencia de Mg^{2+} . En esta forma proponen que el Mg^{2+} atrapa al ADP en un sitio y lo deja en no-equilibrio con el medio y que este ADP unido en un sitio regulador es capaz de inhibir totalmente la actividad. Este sitio no tiene las características de los clasificados de unión fuerte, puesto que el nucleótido se desprende al filtrar por gel, y tampoco es un sitio catalítico, puesto que el nucleótido permanece durante la hidrólisis (81)



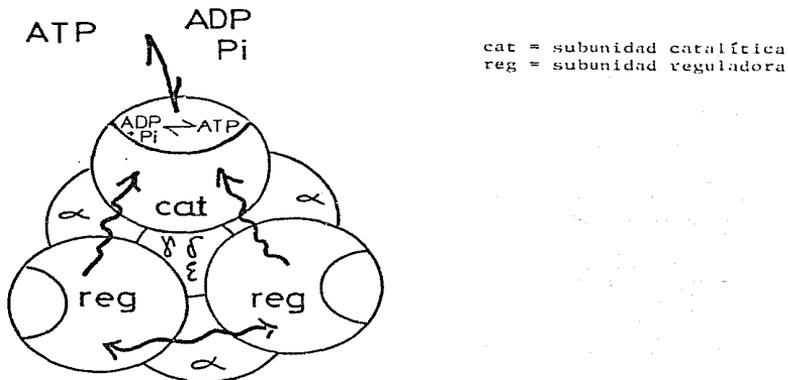
cat = subunidad catalítica.
reg = subunidad reguladora.

Esquema 4. Modelo de 2 sitios catalíticos alternantes y uno regulador

Modelo de subunidades heterogéneas. Un sitio catalítico y dos reguladores.

El grupo de Wang por su parte, propone la existencia de una subunidad catalítica y dos subunidades reguladoras (82-85). Estos investigadores proponen que la hidrólisis y la síntesis suceden en el sitio catalítico de una subunidad β determinada, que a su vez interactúa con las subunidades menores y con los otros dos sitios catalíticos latentes en una forma única, siendo las propiedades catalíticas de este sitio afectadas por estados de ligación de nucleótidos en los sitios catalíticos latentes y por los sitios reguladores (83). Los mencionados investigadores observaron que tanto en la enzima particulada como en la soluble, se presenta una recuperación de la actividad después de la inhibición por varios reactivos covalentes como el Nbf-Cl y el DCCD, sin que disminuya la cantidad de inhibidor unido. El experimento consistió en marcar la enzima con uno de estos inhibidores (1 inhibidor por enzima), después se indujo un rearrreglo de las subunidades (con LiCl en la enzima soluble (84) y por reconstitución a partículas (83)), finalmente se midió la actividad de la enzima rearrreglada comparada con la de una enzima control sin inhibidor covalente. Por otro lado, también se ha observado que la unión de ADP y Pi a una subunidad β diferente a la catalítica provoca un cambio drástico en la fluorescencia del Nbf unido al sitio catalítico (82,85). En esta forma se propone que la unión de ADP provoca un cambio conformacional en la(s) subunidad(es) β reguladoras, el cual a su vez desencadena, a través de interacciones entre las subunidades, un cambio conforma-

cional en la subunidad β catalítica modulando así sus propiedades catalíticas.



Esquema 5. Modelo de subunidades heterogéneas.

Estos tres modelos difieren principalmente en la participación relativa de las tres subunidades β durante la catálisis. Hay varios puntos en los que se expresan claramente sus diferencias más importantes:

1. El aumento en la concentración de sustratos incrementa varias veces la velocidad de catálisis.

El modelo de tres sitios catalíticos equivalentes (Boyer y colaboradores) lo explica por una cooperatividad positiva entre las tres subunidades, en la cual la unión del sustrato en un segundo sitio, aumenta la velocidad de hidrólisis del primer sitio. En el otro ex-

temo, está el modelo de un solo sitio catalítico (Wang y colaboradores) que lo explica también por interacciones entre las subunidades, pero en este caso el nucleótido se une a una subunidad β reguladora que no es capaz de hidrolizarlo, y que en estas condiciones estimula la hidrólisis de la subunidad β catalítica. El modelo que propone dos sitios catalíticos (Gautheron y colaboradores y Penefsky y colaboradores) propone una cooperatividad positiva, pero sólo requiere de dos sitios para explicar sus resultados.

2. Hay inhibidores que en cantidades subestequiométricas (1 inhibidor por enzima), inhiben completamente la hidrólisis, pero la síntesis no se ve inhibida en igual proporción.

El modelo de tres sitios equivalentes predice que la catálisis requiere de los tres sitios intactos para poder realizar la reacción. Propone que la síntesis se ve menos afectada porque los tres sitios catalizan a menor velocidad. El modelo de un sitio catalítico explica que el inhibidor se une a la subunidad catalítica y por esto no hay actividad al unirse 1 mol de inhibidor por mol de enzima, y que la síntesis no se ve afectada porque en las condiciones en las que se mide, (reconstitución de la F_1 -modificada en partículas submitocondriales depletadas de F_1), se favorece el rearrreglo de las subunidades, pasándose la β modificada ahora a un "sitio regulador" y otra subunidad β antes reguladora pasa a ser catalítica.

3. La localización y el efecto del ADP que se une e inhibe la hidrólisis.

El modelo de tres sitios equivalentes propone que el ADP se une a un sitio catalítico y la inhibición se debe a que se requiere de la sustitución de ese ADP por ATP; sin embargo, esto sólo sucede sin Mg^{2+} . En cambio en el modelo de dos sitios catalíticos y uno regulador, se propone que el ADP se une al sitio catalítico o regulador puesto que permanece en la enzima durante la hidrólisis de MgATP, a pesar de que modifica la hidrólisis de éste.

De esta forma se ve que la interacción entre los diferentes sitios de unión de adenín nucleótidos así como el contenido de éstos es una parte esencial del mecanismo catalítico, y de la estructura de la H^+ -ATP sintetasa; sin embargo de ninguna manera está claro aún cuál es la interrelación entre los distintos sitios catalíticos y los reguladores de la ATP sintetasa. Para tratar de alcanzar una mejor comprensión de las distintas interacciones de los distintos sitios de la H^+ -ATP sintetasa mitocondrial, decidimos explorar si la actividad hidrolítica y la reactividad de grupos específicos de la enzima se ven afectados cuando un ADP unido en un sitio catalítico se transforma en ATP en un medio con Pi, Mg^{2+} y Mg_2SO . Pensamos que la posibilidad de transformar un ADP en ATP en un sitio catalítico, ofrece un buen modelo para estudiar cómo una subunidad catalítica a la cual se le puede modificar el contenido de adenín nucleótidos afecta el ciclo catalítico, la participación relativa de las subunidades en distintas condiciones, así como algunos efectos sobre la conformación de la enzima.

Para poder analizar el posible efecto de este ATP unido y sintetizado en la enzima, primero se analizaron las características catalíticas y la reactividad de residuos de aminoácidos específicos en Me_2SO . Para este último punto utilizamos al inhibidor covalente Nbf-Cl que se sabe se une a una tirosina de la subunidad β de la F_1 . Después se analizaron la actividad hidrolítica y la reactividad de este mismo residuo a Nbf-Cl en la enzima que previamente sintetizó ATP comparándola con una enzima en que la síntesis fue prevenida.

MATERIALES Y METODOS

I. Preparaciones Biológicas.

A. Preparación de mitocondrias de corazón de res.

La utilización de corazón de res permite la obtención de grandes cantidades de mitocondrias ricas en crestas sobre las cuales está localizada la H⁺-ATP sintetasa. El método utilizado para el aislamiento de las mitocondrias es una modificación del descrito por Low y Vallin en 1963 (86). Los corazones de res frescos son mantenidos en baño de hielo y todo el procedimiento se lleva a cabo en un cuarto a + 4°C.

Los corazones se limpian de tejido conectivo, grasa y coágulos de sangre. Se cortan en trozos pequeños y se muelen en un molino de carne. Por cada kilogramo de carne molida se agregan 4 litros de sacarosa 250 mM/Tris-Cl 5mM pH 7.4/EDTA 15 mM y se reajusta el pH con Tris-base concentrado. Se homogeneiza en una licuadora Waring Mod 32 DL39 por 30 segundos a la velocidad media del aparato y se vuelve a ajustar el pH a 7.4 con Tris-base concentrado. Este homogeneizado se centrifuga por 10 minutos a 1,110 x g a 4°C que permite desechar células rotas, el sobrenadante se pasa por una gasa doble y se recentrifuga a 15,300 x g

por 10 minutos. El precipitado, que contiene el paquete de mitocondrias, se resuspende en sacarosa 250 mM/Tris-Cl 5mM pH 7.4 y se centrifuga 10 minutos a 15,300 x g. En este precipitado se separan mitocondrias ligeras de mitocondrias pesadas, ambas se resuspenden en sacarosa 250 mM, se les determina protefina y se almacenan en fracciones de 10 a 50 ml en un ultracongelador a - 70°C.

B. Preparación de partículas submitocondriales

Las partículas submitocondriales (psm) se obtienen por exposición de las mitocondrias a ultrasonido. Este tratamiento provoca la ruptura de una gran parte de las crestas mitocondriales y produce vesículas invertidas con respecto a la membrana interna de la mitocondria; de esta forma, el factor de acoplamiento F_1 se encuentra ahora en la cara externa de las vesículas.

Las psm se obtuvieron siguiendo el método descrito por Klein y colaboradores (87) que consiste en resuspender y homogeneizar las mitocondrias ligeras en sacarosa 75mM/KCl 250 mM/Tris-SO₄ 30 mM pH 8.0/EDTA 2mM a 20 mg/ml. Sonicar 2 minutos en baño de hielo. Este sonicado se centrifuga a 17,400 x g por 15 minutos. El sobrenadante que contie-

ne las partículas, se incuba 1 hora a temperatura ambiente y se centrifuga a $105,000 \times g$ por 30 minutos a 25°C . El precipitado son las partículas submitocondriales de Klein (psm-K) que se resuspenden en sacarosa 250 mM , se les determina proteína y se almacenan en el ultrancongelador a -70°C .

C. Preparación del factor de acoplamiento F_1

El aislamiento del factor de acoplamiento F_1 , se hizo siguiendo el método descrito por Tuena de Gómez -Puyou y colaboradores (88), y consiste en descongelar y resuspender las psm-K a 30 mg/ml en sacarosa 100 mM /ATP 4 mM /EDTA 2 mM ajustar el pH a 9.2 con NH_4OH y dejar toda la noche a temperatura ambiente. Previamente reajustado el pH a 9.2 se sonica 10 minutos a una temperatura entre 40 y 50°C . Se centrifuga a $105,000 \times g$ por 90 minutos a 25°C y el sobrenadante, que contiene la actividad de ATPasa se aplica a una columna de AH-Sefarosa 4-B de $20 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ previamente equilibrada con sacarosa 150 mM /ATP 2 mM /EDTA 2 mM (Medio 1) con flujo lento. Después se lava con $75-100 \text{ ml}$ de Medio 1 y se eluye con sacarosa 150 mM /ATP 2 mM /EDTA 2 mM /KCl 1 M ; se recogen fracciones de 3 ml . Se juntan las fracciones con actividad de ATPasa y se precipitan con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado a pH 7.4 volumen a volumen por goteo. Se dejan toda la noche en frío. Se centrifuga a $17,400 \times g$ por 10 minutos, el precipitado se resuspende en Medio 1, se determina proteína y actividad, se precipita con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado a pH 7.4 v/v por goteo y se deja en hielo por varias horas.

La F_1 en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 50 % de saturación se centrifuga durante 10 minutos. La enzima se resuspende en 1 ml de sacarosa 250 mM/ATP 30mM/Tris- SO_4 10 mM pH 7.4/EDTA 2mM a una concentración de 4 mg/ml. La suspensión se calienta 4 minutos a 60-64°C en un baño de ebullición y se pasa a un baño a temperatura ambiente. Se centrifuga 10 minutos en la centrífuga clínica, para eliminar la proteína desnaturalizada, el sobrenadante se recupera y se precipita v/v con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado pH 7.4 por goteo. En esta forma la enzima permanece más o menos estable a 4°C durante 4 a 6 semanas. En el momento del experimento la suspensión de la enzima se centrifuga en una centrífuga clínica por 10 minutos y se filtra por columnas de 1 ml de Sefarosa G-50 fine equilibrada con MOPS 25mM, centrifugando en una centrífuga clínica a 3,500 rpm por 45 segundos siguiendo el método descrito por Penefsky (84) modificado en el laboratorio.

II. Preparación de [δ - ^{32}P] ATP

El marcaje del ATP en la posición δ se hizo siguiendo el método de Glynn y Chappell (90) que se describe a continuación: en un volumen final de 10 ml se mezcla ATP 6mM/MgCl $_2$ 9mM/EGTA 1.5 mM pH 7.0/Tris-HCl 75 mM pH 8.0/ Mercaptoetanol 0.15 ml/ac fosfoglicérico 6 mg/ cisteina 5.1 mg/NADH 1 mg/ ^{32}P 1 ml. Se le añaden 0.05 ml de una mezcla de fosfoglicerato cinasa y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa de Boehringer, verificando que la reacción ocurra siguiendo la oxidación del NADH por la disminución de la absorbencia a 340 nm. Se deja una hora incubando a temperatura ambiente y se para la reacción hirviendo la mezcla por 45

segundos. Se diluye 6 veces y esta mezcla se aplica a una columna de DOWEX 1-10 (200-400 mesh) montada en una jeringa de 5 ml a la que primero se le pasan 100 ml de NaOH 1N/EDTA 1 mM y luego se lava con agua hasta neutralizar el pH. Una vez absorbida la muestra se lava exhaustivamente con agua. Se eluye con HCl 1N colectándose en Tris concentrado para neutralizar. Se cuenta una alícuota en el contador de centelleo y se mide la absorbencia a 259 nm para cuantificar el contenido de ATP, con estos datos se calcula la actividad específica del [γ - 32 P] ATP. La absorbencia molar del ATP ($a_M = 15.4 \times 10^3$ a 259 nm y pH 7.0).

III. Métodos de cuantificación y determinación.

A. Ensayo de actividad hidrolítica.

La actividad hidrolítica de la F_1 -ATP sintetasa se determinó a 30°C, tanto por la liberación de 32 P del [γ - 32 P] ATP, como por la desaparición de NADH en un sistema acoplado regenerador de ATP.

1. Ensayo radioactivo.

La fracción a medir se incuba en un medio de MOPS 50mM/MgCl₂ 10 a 1 mM/ [γ - 32 P] ATP en distintas concentraciones y dimitilsulfóxido (Me₂SO) de 0 a 60% v/v. La reacción se inicia con la enzima previamente filtrada en columnas de Sefarosa G-50 fine (ver página 31) (3 μ g-15 μ g), y se para con ácido tricloroacético (TCA) para una concentración final de 0.1 M y se conserva en hielo. El fosfato liberado durante la reacción se cuantifica como fosfomolibdato siguiendo el método descrito por el grupo de

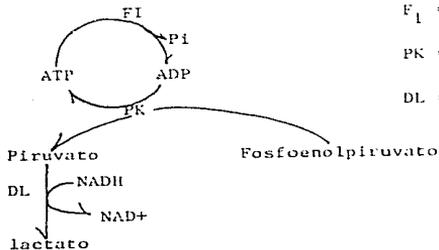
Gómez-Puyou (91), que se describe a continuación: a cada fracción por determinar se le agrega 1 ml de molibdato de amonio 3.3% en H_2SO_4 3.7 N

0.1 ml acetona y 1 ml isobutanolbenceno 1:1 saturado con agua (IBB); la mezcla se agita durante 1 minuto y se centrifuga en una centrífuga clínica por 1 minuto. Se toma una alícuota de la fase orgánica y se cuenta el ^{32}P -molibdato, aplicando esta muestra a papel cuantificando el ^{32}P en un contador de centelleo.

2. Ensayo espectrofotométrico.

El ensayo espectrofotométrico se hizo siguiendo el método descrito por Pullman y colaboradores (92), que permite el registro continuo de la actividad hidrolítica.

De la fracción a determinar se toma una alícuota (1-3 μ g) y se pasa a una cuveta de 3 ml que contiene sacarosa 50 mM/Tris Acetato 50 mM pH 8.0/ Acetato de Mg^{2+} 3mM/Acetato de K^+ 3 mM/Fosfoenol piruvato 1 mM/NADH 0.2 mM/ATP 3 mM/Piruvato cinasa 10 unidades y Deshidrogenasa láctica 10 unidades. Se mide la desaparición de NADH contra el tiempo a 340 nm en un espectrofotómetro y esto convertido por el coeficiente de extinción molar del NADH corresponde a la hidrólisis de ATP



F_1 = factor de acoplamiento₁

PK = Piruvato Cinasa

DL = Deshidrogenasa láctica

B. Ensayo de síntesis de ATP.

Se incubó la enzima previamente filtrada, generalmente a una concentración de 1 mg/ml en un medio que contiene MOPS 50 mM pH 7.4/MgCl₂ 10mM/³²P_i 6 2mM (2 X 10⁵ a 5 X 10⁵ cpm/nmol) y Me₂SO de 0 a 60% v/v (medio de síntesis) durante 60 minutos a 30°C.

Para cuantificar el contenido de AT³²P sintetizado en la enzima se para la reacción con TCA a una concentración final de 6% y se conserva en hielo. Se añade 0.5 ml de molibdato de amonio 3.3% en H₂SO₄ 3.7 N, 0.1 ml de acetona; el fosfomolibdato se extrae a la fase orgánica con 2 ml de IBB. Se hacen 7 extracciones más, añadiendo en cada extracción 20 µl de 20 mM KH₂PO₄ frío como acarreador, acetona 100 µl y 1 ml IBB para eliminar todo el ³²P libre que no se incorporó como ATP. De la fase acuosa se toma una fracción, se aplica a papel y se cuantifica el contenido de [^γ-³²P] ATP en un contador de centelleo.

C. Identificación del [^γ-³²P] ATP formado.

El componente radioactivo formado en la F₁-ATP sintetasa soluble se identificó como [^γ-³²P] ATP siguiendo los siguientes criterios:

1. Columna de PEI-Celulosa.

Se incubó la enzima con ³²Pi, Mg²⁺ y Me₂SO por 60 minutos, la reacción se para con 0.16 ml de HCl concentrado. Se añade ATP no radioactivo co-

mo acarreador ($0.4 \mu\text{mol}$) y se centrifuga en una centrífuga clínica. El sobrenadante, 1.1 ml, se mezcla con 0.4 ml de molibdato de amonio 60 mM en HCl 10 mM y la mezcla se extrae con IBB 5 veces añadiendo 0.4 mM de KH_2PO_4 y 3 veces con 10 mM de KH_2PO_4 . Se ajusta la fase acuosa a pH 7.0 con KOH concentrado y se divide en 2 partes iguales. Una se incuba con glucosa 50 mM y 400 unidades de hexocinasa y otra sólo con glucosa 50 mM por 45 minutos a temperatura ambiente. Después ambas mezclas se aplican a columnas de PEI-Celulosa y se eluyen con LiCl 0.6, 1.0, 1.5 M como fue descrito por Mangusson y colaboradores (93). En este sistema la glucosa 6-P y AMP eluyen con LiCl 0.6M, el ADP con LiCl 1M y el ATP con LiCl 1.5 M.

2. Ensayo con Luciferín-Luciferasa.

De cada una de las fracciones eluidas de las columnas de PEI-Celulosa se tomó una alícuota y se le determinó la concentración de ATP por el método de la Luciferín-Luciferasa (96). La luz emitida durante 1 minuto se midió en el fotómetro 15 segundos después de la edición de $2 \mu\text{l}$ de la muestra a 1 ml de un medio que contiene MOPS 50 mM pH 7.4/ KH_2PO_4 5mM/ MgCl_2 mM/AMP $5.3 \mu\text{M}$ y 0.6 mg de una mezcla del sistema Luciferín-Luciferasa de Sigma Chemicals Co.

D. Cuantificación de Proteína.

Para la determinación de proteína en mitocondrias y partículas submitocondriales, se siguió el método descrito por Gornall y colaboradores (95)

utilizando el reactivo de Biuret. Para la proteína purificada se siguió el método descrito por Lowry y colaboradores (96) utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu Reactivo de Fenol 2 Normal, en ambas determinaciones se utilizó albúmina sérica bovina como estándar.

R E S U L T A D O S

En un medio acuoso la síntesis de ATP sólo se lleva a cabo en enzimas integradas a la membrana y está acoplada al gradiente electroquímico de H^+ , a pesar de que se sabe que no es la formación del enlace β - γ - fosforil del ATP la que requiere de energía (27,97); se ha propuesto que la unión del ADP y el Pi al sitio activo y la liberación de ATP son los pasos en que se requiere de energía. Por otro lado, se ha observado que la desorganización de la estructura del agua provocada por algunos cosolventes permite observar síntesis de ATP unido a la enzima soluble tanto de mitocondrias (60,101,104), como de cloroplastos (57,99) y bacterias (100).

Aprovechando la propiedad de la F_1 soluble mitocondrial de sintetizar ATP fuertemente unido, es posible explorar el efecto que la transformación de un ADP unido en ATP fijo en el sitio catalítico tiene sobre la conformación y los pasos del ciclo catalítico de la enzima. Con esta idea se analizaron primero las características catalíticas y estructurales de la enzima en los solventes orgánicos como base para analizar después el efecto del ATP fuertemente unido al sitio catalítico sobre la catálisis y conformación de la enzima en presencia de dimetilsulfóxido (Me_2SO).

I. La Enzima en Dimetilsulfóxido

A. Características catalíticas.

Se analizó la hidrólisis y la síntesis de ATP por la F_1 soluble en un medio con distintas concentraciones de dimetilsulfóxido (Me_2SO). De acuerdo con reportes anteriores, (60,101) el incremento de la concentración de Me_2SO en un medio con Mg^{2+} y Pi produce un aumento en la cantidad de ATP sintetizado. Sin embargo, y a diferencia de lo reportado por Sakamoto y Tonomura (60), nuestra preparación de F_1 no necesita de ADP en el medio para sintetizar ATP unido a la enzima, (figura 1). Esto es, la síntesis de ATP en la enzima de nuestra preparación, se lleva a cabo con ADP ya unido a la enzima.

Es importante hacer notar que la síntesis máxima de ATP fuertemente unido es de aproximadamente 0.4 moles de ATP por mol de F_1 .

La síntesis de ATP no se debe a una interacción específica del Me_2SO con la enzima, ya que también se ha observado síntesis de ATP en presencia de otros solventes orgánicos que modifican la estructura del agua como el etilenglicol y en poli-etilenglicoles de varios pesos moleculares (101).

La capacidad de la enzima soluble para hidrolizar ATP también se afecta por la presencia de Me_2SO en el medio. El Me_2SO en concentraciones de 20 y hasta 40% estimula la hidrólisis. Sin embargo, a una concentración de 50% Me_2SO en la cual hay una mayor síntesis, la hidrólisis se inhibe en un 70% (figura 2).

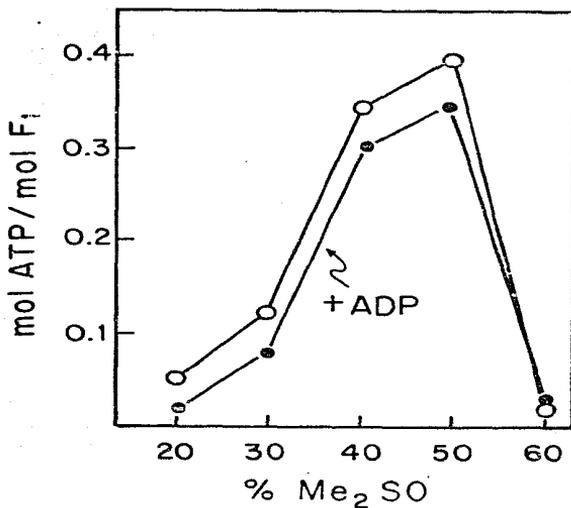


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de Me₂SO en la síntesis de ATP.

La F₁ soluble (0.7 mg/ml) se incubó en un medio con MOPS 50mM pH 7.4, MgCl 10 mM, ³²Pi 1mM, a las concentraciones indicadas de Me₂SO (v/v); donde se indica se añadió 0.2 mM ADP. La mezcla se incubó por 60 minutos a 30°C y se cuantificó el [γ -³²P] ATP formado como se describió en material y métodos.

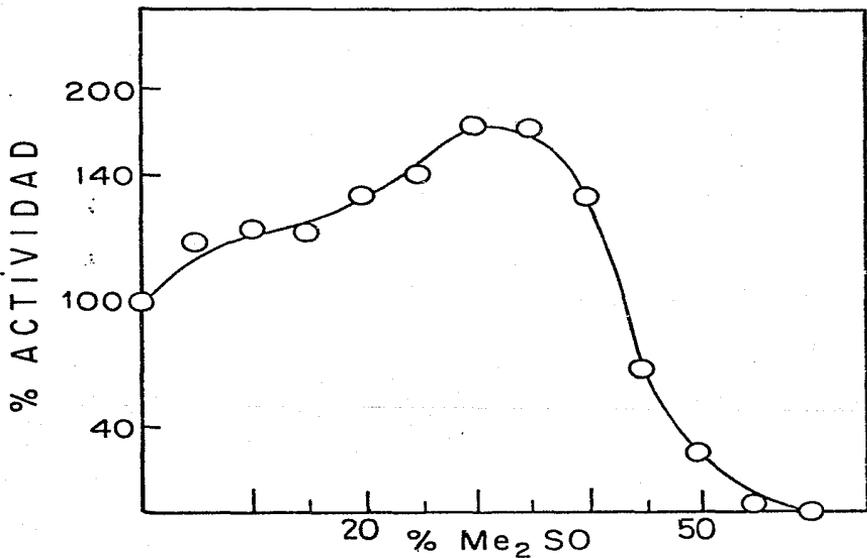


Figura 2. Efecto del Me₂SO en la hidrólisis de ATP.

Se incubó la F₁ soluble (0.02 mg/ml) por 3 minutos en NOPS 50 mM pH 7.4. MgCl₂ 3mM, [γ-³²P] ATP 3mM a las concentraciones indicadas de Me₂SO (v/v). Se midió la actividad hidrolítica por liberación de ³²Pi como se describió en material y métodos.

Para determinar si el efecto de Me_2SO se debe total o parcialmente a un efecto desnaturizador del solvente sobre la enzima, se hicieron experimentos de "reversibilidad" diluyendo a menos del 3% la concentración de Me_2SO al medir la actividad. Se incubó a la enzima en distintas concentraciones de Me_2SO por 5 min después se añadió [γ - ^{32}P] ATP para medir la actividad, diluyendo la concentración del solvente 60 veces.

T A B L A 2

REVERSIBILIDAD DEL EFECTO DEL Me_2SO

Me_2SO % (1)	% actividad (2)
40	98
45	84
50	63
55	22
60	5

(1) Concentración de Me_2SO en la preincubación.

(2) % de actividad de la enzima después de diluir 60 veces el Me_2SO .
100% actividad de la enzima con 0% de Me_2SO .

Como se muestra en la tabla 2, la actividad de la enzima incubada en 40% de Me_2SO es totalmente reversible, lo cual sugiere que el Me_2SO no produce desnaturización de la enzima. A concentraciones mayores de Me_2SO hay una menor recuperación de la actividad al diluir el solvente, lo cual

sugiere una mezcla de efectos: por un lado el efecto desnaturalizador del solvente que predomina en la enzima expuesta a 60% de Me_2SO y por otro lado un efecto que produce la inhibición de la actividad hidrolítica y el aumento en la capacidad de síntesis de la enzima, que se hace más aparente a concentraciones de 40 y 50% de Me_2SO .

De esta forma es posible trabajar a concentraciones de 40 y hasta 50% Me_2SO , sin que la desnaturalización de la enzima sea un factor determinante.

El Me_2SO no sólo afecta la cantidad de ATP hidrolizado por la enzima, sino también su velocidad de hidrólisis. Se midió la hidrólisis de ATP contra tiempo en diferentes concentraciones de Me_2SO (figura 3). En un medio totalmente acuoso la velocidad de hidrólisis disminuye al irse hidrolizando el ATP; esto se ha atribuido a una inhibición por el ADP producido durante la reacción. Sin embargo, en Me_2SO la actividad es lineal hasta los 5 minutos cuando menos, a pesar de que la velocidad en los tiempos iniciales es menor en Me_2SO .

B. Cambios en conformación.

Los cambios funcionales de la enzima producidos por el solvente pueden estar acompañados de cambios conformacionales. El monitor que utilizamos para investigar esta posibilidad fue la medida de la sensibilidad al inhibidor covalente 4-cloro-7-nitrobenzofurazano (Nbf-Cl), que se une

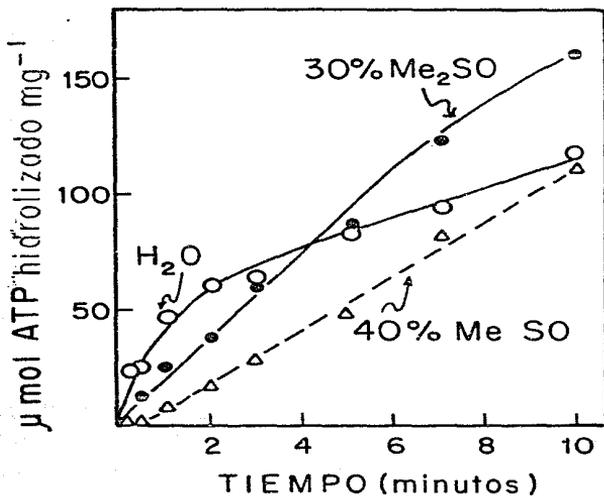


Figura 3. Hidrólisis de ATP en Me_2SO .

F_1 (0.01 mg/ml) se incubó en MOPS 50mM pH 7.4, MgCl_2 3mM, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 3mM, y Me_2SO en las concentraciones indicadas. A los tiempos señalados se tomaron alícuotas y se midió el $^{32}\text{P}_i$ liberado como se explicó en material y métodos.

a la tirosina 311 de la subunidad β de la F_1 (102). El Nbf-Cl inhibe un 98% la actividad hidrolítica de la enzima con una estequiometría de 1 Nbf-Cl por F_1 (68,69) y es reversible al añadir ditiotreitól (DTT) En otras condiciones (pH alcalino o iluminación) el Nbf se cambia a una lisina, cercana, de donde su unión ya no es reversible por la adición de DTT (68,69). De manera que, si la conformación de la enzima en el solvente cambia, puede ser que la accesibilidad de la tirosina, o de la lisina, a la que se une el Nbf-Cl cambie también y así su sensibilidad al inhibidor y la reversibilidad por incubación con DTT. En la figura 4 se muestra este experimento. Se preincubó la enzima con $100 \mu\text{M}$ Nbf-Cl en diferentes concentraciones de Me_2SO y se midió la actividad hidrolítica espectrofotométricamente tomando alícuotas a diferentes tiempos. La actividad se midió después de una dilución de 60 veces de tal forma que el Me_2SO no interfiera en la determinación. Como se muestra en la figura la enzima incubada en presencia de 40% de Me_2SO es menos sensible a la inhibición por Nbf-Cl. Después de una hora de incubación con Nbf-Cl la enzima en un medio totalmente acuoso está casi totalmente inhibida, en cambio la enzima en un medio con 40% Me_2SO todavía conserva un 30% de la actividad inicial. Esto se podría explicar por un cambio en la accesibilidad de la tirosina o por una dificultad de Nbf-Cl para llegar a la enzima debida al Me_2SO . Sin embargo, al agregar DTT, la enzima en un medio acuoso revierte a casi un 80% y la enzima en 40% Me_2SO sólo un 50% de la actividad inicial. Más aún, si se aumenta la concentración de Me_2SO a 50%, la enzima se vuelve prácticamente igual de sensible a Nbf-Cl que la enzima en un medio totalmente acuoso, pero a diferencia del sistema acuoso, la inhibición es totalmente irreversible por DTT. En nuestra opinión estos datos reflejan una diferente conformación de la enzima en presencia del Me_2SO .

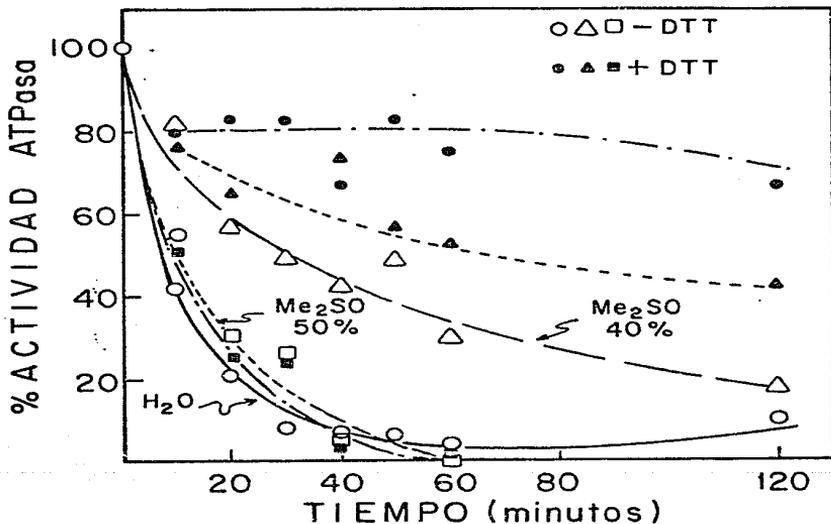


Figura 4. Efecto del Me₂SO en la inhibición de la actividad hidrolítica por Nbf-Cl.

La F₁ (0.015 mg/ml) se incubó en MOPS 50mM, a las concentraciones indicadas de Me₂SO v/v, por 5 minutos. En este momento se tomó una alícuota y se midió la actividad hidrolítica espectrofotométricamente (material y métodos). La actividad de la enzima fue de 43.2, 51.1 y 15 μmol de ATP hidrolizado mg⁻¹ min⁻¹, para la enzima en un medio totalmente acuoso y a 40 y 50% Me₂SO respectivamente. Estas actividades se consideraron como 100%. Después se agregó Nbf-Cl a una concentración final de 100 μM y se tomaron muestras a los tiempos indicados (O, Δ, □). Durante el registro de la actividad de ATPasa, se agregó DTT directamente a la cuveta a una concentración final de 0.5 mM y se siguió registrando la actividad (●, ▲, ■).

11. La Enzima con ATP Sintetizado.

Las observaciones anteriores fueron la base para explorar el efecto del ATP sintetizado fuertemente unido al sitio catalítico de la enzima sobre las características estructurales y catalíticas de ésta.

A. Características Catalíticas.

Se exploró la hidrólisis de ATP exógeno en Me_2SO a concentraciones relativamente altas y bajas de Mg^{2+} , cuando la enzima tiene un sitio catalítico ocupado con ATP previamente sintetizado.

1. Hidrólisis en concentraciones altas de Mg^{2+}

Se incubó la enzima en distintas concentraciones de Me_2SO en condiciones en que se sintetiza ATP fuertemente unido; una enzima control se incubó en los mismos medios pero en ausencia de P_i . Después de 60 minutos de incubación, tiempo en el cual ya se había producido la síntesis de ATP, se midió la capacidad de la enzima para hidrolizar ATP del medio. La reacción de hidrólisis se inició con la adición de [γ - ^{32}P] ATP y se tomaron muestras a distintos tiempos (notar que la concentración de Mg^{2+} en el medio en que se mide la hidrólisis es igual que en la síntesis, 10 mM). Los resultados de este experimento se muestran en la figura 9. En un medio con 40% de Me_2SO (parte A), la enzima incubada en presencia de P_i , tiene una mayor velocidad de hidrólisis de ATP del medio que la enzima que no formó ATP. Esta diferencia se podría deber a un efecto del ATP previamente sintetizado o a la presencia de la alta concentración de

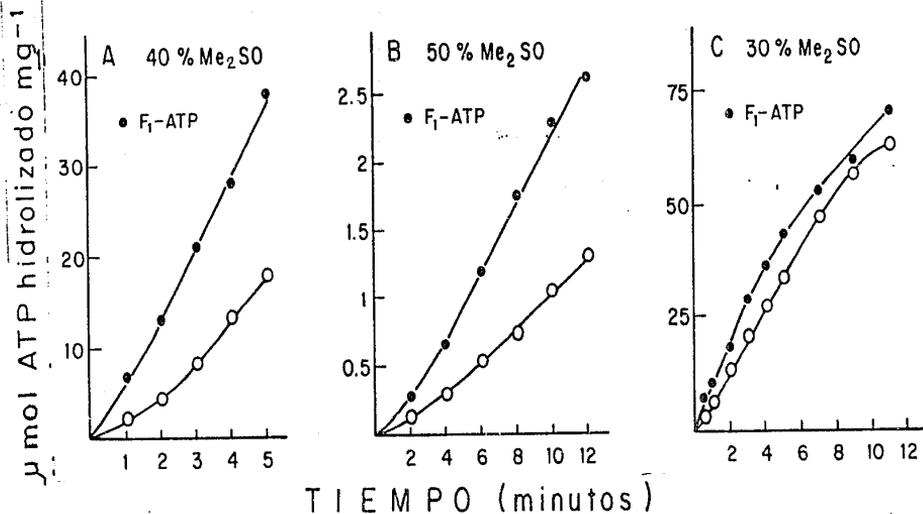


Figura 5. Efecto de la concentración de Me₂SO en la hidrólisis de ATP del medio de una enzima que sintetizó ATP fuertemente unido y una enzima que no sintetizó ATP.

Se preincubó F₁ (0.1 mg/ml) en un medio que contiene MOPS 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 10 mM, en las concentraciones indicadas de Me₂SO (v/v) con \odot o sin \circ KH₂PO₄ 2 mM por 60 minutos. En A y C se agregó [γ -³²P] ATP 3mM y se tomaron muestras a los tiempos indicados. En la parte B se centrifugó la enzima, se resuspendió en un medio con 50% Me₂SO MOPS 50 mM, MgCl₂ 10 mM y [γ -³²P] ATP 3mM y se tomaron muestras a los tiempos indicados. Se determinó ³²Pi como se explicó en material y métodos.

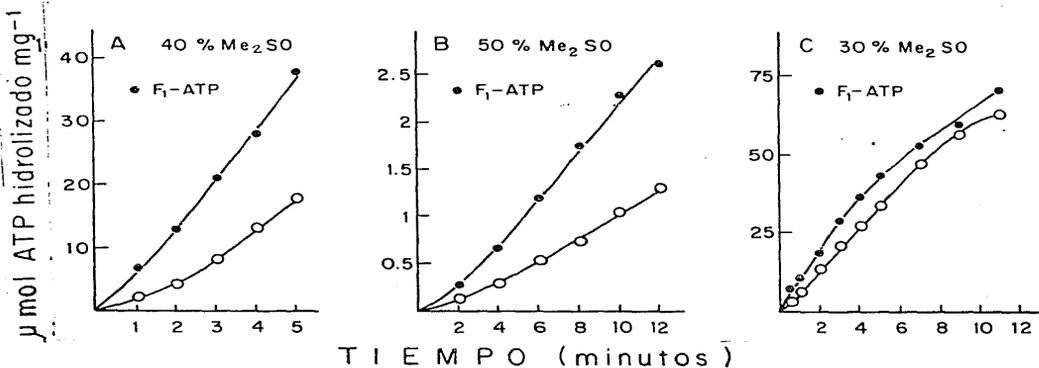


Figura 5. Efecto de la concentración de Me₂SO en la hidrólisis de ATP del medio de una enzima que sintetizó ATP fuertemente unido y una enzima que no sintetizó ATP.

Se preincubó F₁ (0.1 mg/ml) en un medio que contiene MOPS 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 10 mM, en las concentraciones indicadas de Me₂SO (v/v) con \bullet o sin \circ K₂H₂P₄ 2 mM por 60 minutos. En A y C se agregó [γ -³²P] ATP 3mM y se tomaron muestras a los tiempos indicados. En la parte B se centrifugó la enzima, se resuspendió en un medio con 50% Me₂SO MOPS 50 mM, MgCl₂ 10 mM y [γ -³²P] ATP 3mM y se tomaron muestras a los tiempos indicados. Se determinó ³²Pi como se explicó en material y métodos.

Pi (2 mM). Para aclarar este punto se hizo el siguiente experimento aprovechando el hecho de que la enzima en Me_2SO se hace menos soluble en agua. En condiciones de síntesis y 50% de Me_2SO prácticamente toda la enzima se puede sedimentar por centrifugación y todo el ATP formado aparece en el precipitado. De esta forma se incubó una enzima con Pi y otra sin Pi en el medio de síntesis con 50% Me_2SO por 60 minutos. Se centrifugaron, se descartó el sobrenadante, y por lo tanto el Pi. Posteriormente las dos enzimas se resuspendieron en un medio igual (MOPS, Me_2SO 50% y Mg^{2+}) pero sin Pi. En este medio se repitió el experimento de hidrólisis detallado para 40% Me_2SO . Los resultados se muestran en la parte B de la figura 5; se observó que la enzima que se incubó con Pi sintetizó en ATP tiene una mayor velocidad de hidrólisis. Por lo que podemos concluir que el efecto estimulador en la hidrólisis se debe a la presencia de ATP unido y no a la alta concentración de Pi en el medio.

Tratando de analizar si este ATP sintetizado que estimula la hidrólisis participa directamente en el ciclo catalítico, se siguió el destino de éste durante la hidrólisis del ATP externo. El experimento se hizo de la misma forma que en el que se midió la hidrólisis, pero en este caso se utilizó ^{32}P durante la parte de síntesis y ATP frío durante la parte de hidrólisis, y se midió la cantidad de [^{32}P] ATP unido a la enzima. En la figura 6 se muestra que en presencia de 40 y 50% Me_2SO al añadir ATP 3 mM, el ATP sintetizado sólo se hidroliza parcialmente a pesar de que todo el ATP añadido se hidroliza en menos de 3 minutos (figura 5). Esto es, aun cuando la enzima pasa por muchos ciclos catalíticos el ATP previamente sintetizado no se hidroliza totalmente.

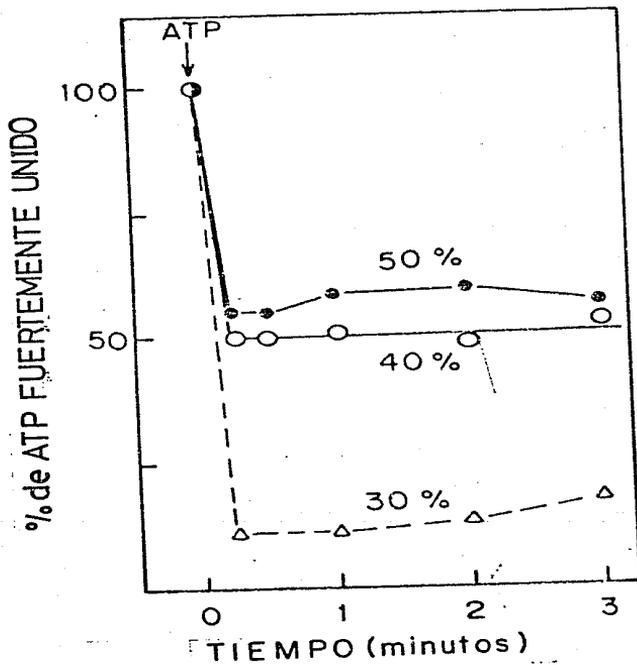


Figura 6. Efecto de la hidrólisis de ATP externo sobre el contenido de ATP fuertemente unido en distintas concentraciones de Me₂SO.

F₁ (0.9 mg/ml) se incubó en MOPS 50 mM, MgCl₂ 10 mM, ³²Pi 1 mM y 30, 40 y 50% Me₂SO. Después de 60 minutos se tomó una alícuota y se midió el [γ -³²P] ATP formado. Estos valores son 0.08, 0.39 y 0.41 mol de ATP formado por mol de F₁, en 30, 40 y 50% Me₂SO respectivamente y se tomaron como 100%. Se agregó ATP para dar una concentración final de 3mM (tiempo cero), se tomaron alícuotas en los tiempos señalados y se determinó el [γ -³²P] ATP remanente.

Sin embargo, en un medio con 30% de Me_2SO en el que se sintetiza menos ATP (0.1 moles de ATP/mol F_1) y en el cual no parece haber un efecto de éste en la hidrólisis del ATP externo (figura 5 parte C), el ATP sintetizado es hidrolizado casi totalmente en los primeros ciclos catalíticos (figura 6).

Estas observaciones sugieren que en ciertas condiciones la presencia de un ATP sintetizado en un sitio catalítico (como se discute más adelante) de la enzima, afecta la actividad hidrolítica de ésta, sin que la hidrólisis de ATP externo incluya la hidrólisis total de este ATP.

2. Hidrólisis en Concentraciones Bajas de Mg^{2+} .

Se sabe que el Mg^{2+} tiene efectos sobre la enzima; por ejemplo a concentraciones altas inhibe la hidrólisis de ATP (114,115) y acelera la síntesis del ATP fuertemente unido (101). Decidimos explorar el efecto del ATP sintetizado sobre la hidrólisis medida en un medio con concentraciones bajas de Mg^{2+} MgCl_2 1mM y Pi 0.1 mM (aunque ya se demostró que en estas condiciones el Pi no afecta) a distintas concentraciones de ATP externo y Me_2SO .

En la figura 7 se muestra un experimento en el que se incubó una enzima en Medio de síntesis con 40% Me_2SO y otra como control sin Me_2SO se midió la hidrólisis de ATP añadido a dos concentraciones 0.01 y 1mM a través del tiempo, en un medio con 1 mM Mg^{2+} . Como se ve en la figura, tanto con 0.01 mM (A) como con 1 mM (B) de ATP después de 2 minutos la velocidad de hidrólisis de ambas enzimas es igual, a diferencia de lo observado

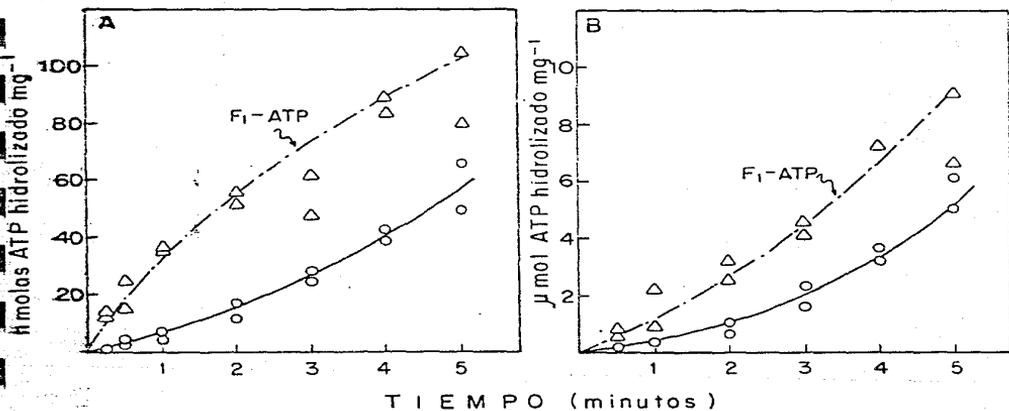


Figura 7. Efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la hidrólisis de ATP del medio de una enzima que sintetizó ATP fuertemente unido y una enzima que no sintetizó ATP.

Se preincubó la F_1 (0.05 mg/ml) en un medio que contiene MOPS 50 mM pH 7.4, $MgCl_2$ 10 mM, Me_2SO 40% con Δ o sin \bigcirc KH_2PO_4 2mM por 60 minutos. En este momento se agregó 0.01 mM (A) o 1mM (B) de $[\gamma -^{32}P]$ ATP diluyendo la concentración de Mg^{2+} en el medio de reacción a 1mM libre final. En los tiempos indicados se tomaron alícuotas y se cuantificó el $^{32}P_i$ liberado como se detalló en material y métodos.

durante la hidrólisis de ATP en un medio con 10 mM de Mg^{2+} , donde la velocidad de la enzima con ATP es siempre mayor.

Estos resultados parecerían contradecir los resultados descritos en la figura 5; sin embargo, al analizar el contenido de ATP unido en estas condiciones se observó que el ATP sintetizado desaparece desde los primeros ciclos catalíticos (figura 8).

Estos resultados confirman lo observado en cuanto al efecto del ATP unido en la enzima y sugieren a su vez un efecto del Mg^{2+} sobre las propiedades del ATP sintetizado. Se consideró que si el ATP sintetizado se puede salir del sitio al medio en presencia de concentraciones bajas de Mg^{2+} , también sería posible introducirlo a la enzima por medio de una incubación con ATP y Mg^{2+} 1mM.

Si esto fuera así, la enzima preincubada con ATP debería tener las mismas características cinéticas que aquella que posee ATP sintetizado a partir de Pi del medio, al medir la actividad en presencia de Mg^{2+} 10 mM. En la figura 9 se muestra un experimento en el que se incubó una enzima en un medio con ATP y 1 mM Mg^{2+} y otra en un medio igual pero sin ATP, después se pasaron ambas a un medio con 10 mM Mg^{2+} y 1 μ l $-^{32}P$ ATP; se midió la hidrólisis del ATP añadido contra tiempo como en los experimentos anteriores. En este experimento se muestra que la enzima que se preincubó con ATP en un medio con bajo Mg^{2+} , tiene los mismos efectos sobre la hidrólisis al ser transferida a un medio con alto Mg^{2+} , que la enzima que sintetizó ATP en un medio con alto Mg^{2+} .

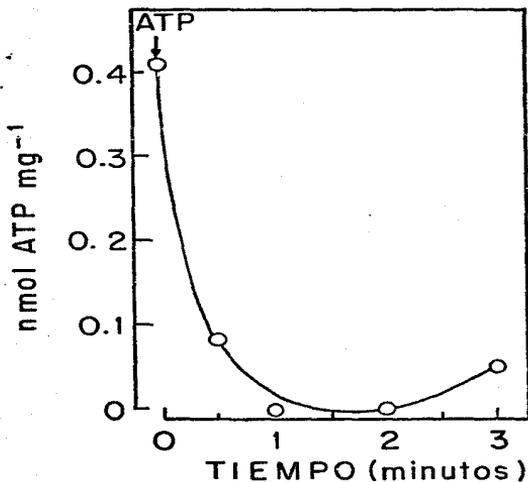


Figura 8. Efecto de la hidrólisis de ATP externo en bajas concentraciones de Mg^{2+} sobre el ATP sintetizado. Se preincubó la F_1 (2.7 mg/ml) en un medio con MOPS 50mM pH7.4, $MgCl_2$ 10mM, $^{32}P_i$ 1mM y Me_2SO 40% por 60 minutos. Se tomó una alícuota y se midió el [γ - ^{32}P] ATP formado (tiempo cero). En ese momento se agregó un medio con ATP 3mM diluyendo el Mg^{2+} a 1 mM libre final, y se tomaron muestras en los tiempos señalados para seguir el [γ - ^{32}P] ATP que permaneció unido a la enzima.

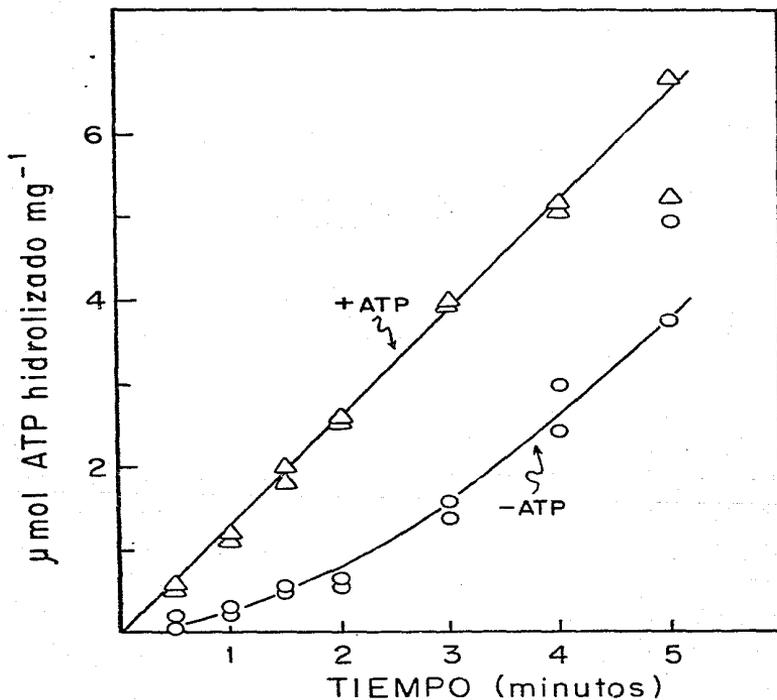


Figura 9. Efecto de ATP "atrapado" en 10mM $MgCl_2$ sobre la hidrólisis de ATP del medio.

La F_1 (0.1 mg/ml) en un medio con MOPS 50mM pH 7.4, Me_2SO 40% y $MgCl_2$ 2mM, ATP 1mM por 5 minutos. En este tiempo se agregó $[^32P]ATP$ en un medio con 10mM $MgCl_2$ y se tomaron alícuotas en los tiempos indicados para cuantificar el $^{32}P_i$ formado.

Estos resultados sugieren que un ATP atrapado en un sitio catalítico por la alta concentración de Mg^{2+} , puede regular la hidrólisis de ATP del medio, sin importar si es sintetizado en el sitio o si se une directamente a él como ATP.

B. Cambios en Conformación.

Los cambios funcionales pueden estar acompañados por un cambio de conformación. De esta forma, utilizamos la sensibilidad a la inhibición por Nbf-CI como monitor de un cambio conformacional dado por una diferente reactividad del residuo de tirosina al cual se une, en una enzima que previamente sintetizó ATP comparada con una enzima en que la síntesis fue prevenida.

Se incubó una enzima con Mg^{2+} , Pi y Me_2SO y otra como control sin Pi en la misma concentración de Me_2SO por 60 minutos; se agregó Nbf-CI a una concentración final de $100 \mu M$ y posteriormente, se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se midió la actividad hidrolítica en un medio totalmente acuoso, en presencia de un sistema regenerador de ATP como se describe en material y métodos. En la figura 10 se muestran los resultados de este experimento. La enzima que previamente sintetizó ATP es mucho menos sensible a la inhibición por Nbf-CI. En este caso no se puede suponer una diferente partición del reactivo como causa de la diferencia entre ambas enzimas, puesto que ambas están en Me_2SO .

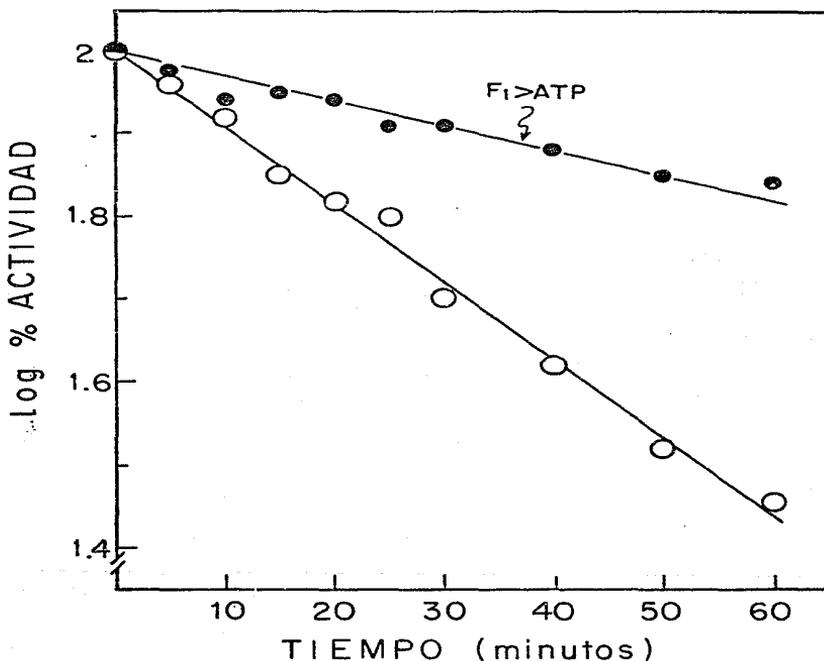


Figura 10. Efecto del ATP sintetizado en la inhibición de la actividad hidrolítica por NbF-Cl .

Se preincubó la F_1 (0.02 mg/ml) en un medio con MOPS 50mM pH 7.2, MgCl_2 5mM, Na_2SO_4 40% con ● o sin ○ KH_2PO_4 2mM por 60 minutos. En ese momento se tomó una alícuota y se midió la actividad hidrolítica en el espectroscopio (ver material y métodos) 47.6 y 36.2 μmol de ATP hidrolizado $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ para la enzima que fue preincubada con y sin KH_2PO_4 respectivamente. Estos valores se tomaron como 100%. Al restante se le agregó NbF-Cl a una concentración final de 100 μM y se tomaron muestras de la actividad en los tiempos indicados.

Por otro lado, si se mide la cantidad de ATP sintetizado en la F_1 modificada con Nbf-Cl que tiene un 97% de inhibición de la actividad hidrolítica, ésta es la misma que la sintetizada en la F_1 nativa, lo que confirma datos reportados (102,103); pero se observó, además, que la velocidad de síntesis es prácticamente igual en las 2 enzimas (figura 11).

Estos datos sugieren que a pesar de que el ATP sintetizado disminuye la sensibilidad de la enzima al Nbf-Cl, debido probablemente a un cambio conformacional, el Nbf-Cl no influye en la síntesis de ATP fuertemente unido, ni en su valor final ni en su velocidad.

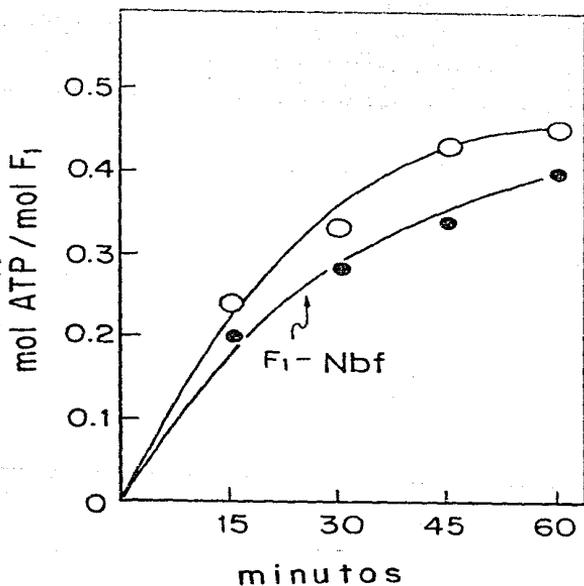


Figura 11. Síntesis de ATP en la enzima modificada con Nbf-Cl y en la enzima nativa.

Se preincubó una enzima en un medio con MOPS 50mM pH 7.4, con ● y sin ○ Nbf-Cl por 60 minutos. (La enzima incubada con Nbf-Cl estaba 97% inhibida). En este momento se transfirió a un medio con MOPS 50mM pH 7.4, Me₂SO 40%, MgCl₂ 10mM, y ³²Pi 1mM (tiempo cero). Se tomaron muestras en los tiempos indicados y se cuantificó el [δ -³²P]ATP formado.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En condiciones similares a las del citosol esto es en un medio acuoso, la hidrólisis del acilfosfato, ATP o pirofosfato está acompañada de un gran cambio de energía libre (106), es por esto que estos compuestos se han considerado como de alta energía. El grupo de George y el grupo de Haynes (106,107 respectivamente) han propuesto que las interacciones de los reactantes y los productos con el solvente, juegan un papel muy importante en los cambios de energía libre de hidrólisis; de tal forma que la energía de hidrólisis de éstos y otros compuestos está determinada por la diferencia en energía de solvatación entre reactantes y productos (98,106,107). Por otra parte, se ha demostrado que durante el ciclo catalítico de las enzimas involucradas en la transducción de energía, hay pasos en que la hidrólisis de estos compuestos se ve acompañada sólo de un pequeño cambio de energía libre. Esto incluye a la Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarcoplásmico, la F_1 -ATPasa mitocondrial y de cloroplastos, la miosina y las pirofosfatasa (107-110). En el sitio activo de estas ATPasas el acilfosfato y el ATP se forman espontáneamente sin necesidad de energía derivada de gradientes (110,111). Se ha propuesto que la energía derivada del gradiente se puede utilizar como energía de unión asociada a un cambio conformacional en la enzima. Lo cual a su vez disminuiría la K_{eq} de hidrólisis en el sitio catalítico y favorecería la síntesis (59,112). Por su parte, el grupo de de Meis sugiere que la energía del gradiente se utiliza para crear un medio con una composición y estructura particular del solvente (98). En un medio

con baja actividad de agua, como el sitio catalítico la molécula de ATP sería de baja energía y se podría formar espontáneamente, mientras que en un medio con alta actividad de agua, la molécula de ATP sería de alta energía.

El agua tiene la estructura más cooperativa de todos los solventes comunes. Los solventes orgánicos destruyen esta estructura, y es por esto que las reacciones que dependen de la estructura del solvente se modifican por la presencia de ciertos cosolventes. Un ejemplo claro de los efectos de los solventes sobre las características catalíticas de las enzimas es la disminución de la K_{obs} para la hidrólisis del pirofosfato (98) y la capacidad del factor de acoplamiento F_1 mitocondrial soluble en Me_2SO para sintetizar ATP debido a un aumento en la afinidad del sitio catalítico por el Pi sin que la afinidad por ADP varíe importantemente (60). En el trabajo presentado hemos confirmado y ampliado estos datos (figura 1); sin embargo, nuestra preparación de F_1 no requiere de la adición de ADP del medio para sintetizar ATP unido a la enzima. Esto nos indica que el ATP se sintetiza a partir de un ADP previamente unido a la enzima. Esto no quiere decir que el ATP se sintetiza en un sitio no catalítico, puesto que es un sitio capaz de realizar el recambio de Pi del medio con el ATP sintetizado, y de ser hidrolizado al disminuir la concentración de Mg^{2+} presente en el medio o la del Me_2SO . Sin embargo, tampoco es un recambio $ATP \rightleftharpoons ^{32}P$ con un ATP previamente unido a la enzima. El grupo de Gómez-Puyou y de Meis en un trabajo reciente (101) ha demostrado que la incorporación de ^{32}P en una enzima que ya sintetizó ATP se lleva a cabo a una velocidad menor que la que se observa en una enzima que no ha incorporado Pi. Estos datos sugieren la existencia de un recambio de ATP unido a la enzima con ^{32}P del medio.

Es importante recalcar que la enzima soluble alcanza un máximo de 0.4 moles de ATP sintetizado por mol de F_1 . Este valor sugiere que la constante de equilibrio de la reacción de hidrólisis y síntesis en el sitio activo, es cercana a 1. Este valor se podría también explicar por una heterogeneidad de la enzima o por una desnaturalización parcial en el solvente orgánico. Sin embargo, los experimentos en los que se diluye el solvente 60 veces y se mide la actividad hidrolítica de la enzima, descartan un efecto desnaturalizante de éste. (tabla 2). Además demuestran que el Me_2SO a las concentraciones que se utilizaron confiere propiedades catalíticas y estructurales (ver más adelante) especiales a la enzima en una manera reversible.

De la misma forma, la diferente actividad del agua en el medio que permite la síntesis de ATP en la enzima soluble, también cambia las características hidrolíticas de ésta. El efecto del Me_2SO en la hidrólisis de ATP es también mixto y complejo. Por un lado, a concentraciones bajas de solvente, hay una estimulación de la actividad; sin embargo, a la concentración en que la síntesis es máxima, la hidrólisis se ve importantemente inhibida (figuras 1 y 2). Esto se puede deber al cambio de afinidad del sitio por el P_i demostrado para la síntesis (60) y el recambio (117), aunque no hay evidencia directa que lo demuestre en condiciones de hidrólisis neta.

Por otro lado, la velocidad de hidrólisis de ATP por la enzima en Me_2SO es menor pero lineal, cuando menos hasta los 5 minutos, tiempo en el cual

la enzima en un medio totalmente acuoso ha sufrido ya una disminución importante en la velocidad de hidrólisis. Este último efecto se ha atribuido a una inhibición por producto, en este caso ADP, en solventes orgánicos ya se ha observado una menor sensibilidad de la enzima a concentraciones inhibitorias de ADP (113).

Los cambios funcionales en una enzima frecuentemente están acompañados de cambios en la estructura de la proteína. Nuestras observaciones señalan que los cambios en la actividad y estructura del agua pueden inducir también modificaciones de la estructura en la enzima. Utilizando el inhibidor covalente Nbf-Cl como monitor, se demostró la existencia de este cambio conformacional. El Nbf-Cl se une a la tirosina 311 de la subunidad β de la F_1 (102); la localización de esta tirosina con respecto al sitio activo, está todavía en debate (102,84). Sin embargo es un reactivo que responde a cambios en el sitio activo, como la unión de ADP (85). En un medio acuoso si se incuba con luz o con un pH alcalino (13,14) este reactivo se transfiere de la tirosina a una lisina cercana (68,69). La unión con la tirosina es una unión Oxígeno-Nbf y puede ser reversible por la adición de DTT (68). Sin embargo, la unión con la lisina es del tipo Nitrógeno-Nbf y no es reversible por DTT (68).

De esta forma, haciendo una comparación entre la sensibilidad a Nbf-Cl y su reversibilidad por DTT en un medio totalmente acuoso y en otro con diferentes concentraciones de Me_2SO podemos observar que en Me_2SO hay una diferente accesibilidad relativa tirosina/lisina. En el medio totalmente acuoso el Nbf-Cl reacciona covalentemente con la tirosina (es 80% reversible por DTT) y tiene un tiempo medio (τ_1) de inhibición de 10

minutos. En 40% Me_2SO hay una proporción importante que se fija posiblemente a la lisina, puesto que hay una reversibilidad de menos del 50% y el $t_{1/2}$ de inhibición máxima es mucho mayor. En 50% Me_2SO el Nbf-C1 se une con un $t_{1/2}$ de inhibición similar al de la enzima en un medio totalmente acuoso, pero preferencialmente a la lisina, en vista de que prácticamente no es reversible por DTT.

Estos resultados sugieren un cambio conformacional de la enzima en el solvente, que puede ocasionar (dada la localización de la tirosina a la que se une el Nbf) alteraciones en el sitio activo de la enzima. Estos cambios pueden a su vez ser, en parte, responsables de la capacidad de síntesis, de la no liberación del ATP sintetizado y de la inhibición de la hidrólisis.

La transformación catalítica de un ADP en ATP en un sitio catalítico de la enzima hace posible el estudio de la participación de este ATP en el ciclo catalítico en condiciones definidas. Es importante recalcar que el ATP está en un sitio catalítico puesto que es sintetizado catalíticamente; puede intercambiar su [γ -P] con P_i del medio, y en condiciones determinadas puede hidrolizarse. Esto hace válido su estudio como participante en el ciclo catalítico.

En el presente trabajo se observó que en condiciones experimentales definidas, el ATP sintetizado tiene efectos directos sobre la catálisis y la conformación de la enzima, sin participar directamente en el ciclo catalítico.

La hidrólisis del ATP exógeno se ve estimulada por la presencia del ATP previamente sintetizado (figura 5 partes A y B). Para explicar este resultado, el modelo de los 3 sitios equivalentes acutando en secuencia proponía que el ATP sintetizado adelanta "un paso" en el ciclo catalítico y es por eso que estimula la hidrólisis debiendo ser el primero en hidrolizarse. El modelo de un sitio catalítico tendría que proponer un recarreglo de las subunidades de tal forma que el ATP se sintetice en una subunidad catalítica que luego pasa a ser reguladora estimulando la hidrólisis en la subunidad catalítica. Al analizar el contenido de ATP sintetizado durante esta reacción (figura 6), se observa que éste no es hidrolizado totalmente, lo cual no estaría de acuerdo con el modelo de los sitios alternantes y sin embargo tampoco estaría totalmente de acuerdo con el modelo de un solo sitio catalítico de Wang. Un modelo en el que una parte de las subunidades sean "atrapadas" como reguladoras y otras sean catalíticas explicaría este tipo de resultados.

Por otra parte, el Mg^{2+} tiene un papel importante en la estabilidad del ATP sintetizado en la enzima. La velocidad de hidrólisis de ATP exógeno a concentraciones bajas de Mg^{2+} (1 mM) en una enzima con ATP sintetizado comparada con la de una enzima sin ATP sintetizado, se hace igual después de un cierto tiempo (figura 7). Esto se debe, muy probablemente, a la hidrólisis del ATP previamente sintetizado en estas condiciones (figura 8). Sin embargo, en concentraciones más altas de Mg^{2+} (10 mM) la velocidad de hidrólisis de la enzima que previamente sintetizó ATP es siempre lineal y mayor a la de la enzima sin ATP sintetizado (figuras 5 y 6).

Con la enzima en Me_2SO y en condiciones de hidrólisis a concentraciones bajas de Mg^{2+} , el ATP del medio puede introducirse a un sitio catalítico (hidrólisis normal). Se pensó que este ATP se podría atrapar en ese sitio, al incrementar la concentración de Mg^{2+} , en el medio. Los resultados del experimento de la figura 9 son congruentes con esta idea. Sin embargo, la evidencia es indirecta, y para probar su validez sería necesario demostrar directamente que el ATP ha sido realmente atrapado, y que éste no se hidroliza durante hidrólisis constante a 10mM Mg^{2+} y $40\% \text{Me}_2\text{SO}$.

De cualquier forma se propone la existencia de un sitio que contiene ATP (que fue sintetizado en el sitio o que se unió por la vía hidrofílica), y que es capaz de regular la actividad catalítica de los otros sitios catalíticos sin directamente participar en el ciclo catalítico. Estos resultados parecen sugerir una diferente participación de las subunidades catalíticas al variar las condiciones del medio, lo cual apoyaría la sugerencia de subunidades heterogéneas.

El ATP sintetizado en la enzima provoca además de estos cambios en la catálisis, cambios conformacionales vistos por la diferente sensibilidad al inhibidor Nbf-Cl. La enzima con ATP unido, es menos sensible a la inhibición por este reactivo, lo cual sugiere que este ATP unido induce un rearrreglo en la proteína.

Se ha descrito que la inhibición por Nbf-Cl se ve disminuida al incubar la enzima con ATP en condiciones de hidrólisis (68,69). Sin embargo, la

enzima modificada con el reactivo hasta un 98% de inhibición de la hidrólisis, es capaz de sintetizar ATP al ser reconstituida en partículas sub-mitocondriales (82,83). Más aún, la enzima soluble igualmente modificada por Nbf-Cl tiene una velocidad de síntesis de ATP fuertemente unido muy similar a la de una enzima nativa.

Estos datos sugieren, por un lado, que el ATP en el sitio catalítico modifica la estructura de la proteína haciendo menos accesible la tirosina a la cual se une el Nbf-Cl, sin que éste, como ya dijimos, interfiera con su síntesis. Por otro lado, los datos también sugieren que la actividad hidrolítica tiene un diferente requerimiento estructural de la enzima ya que ésta es muy sensible al Nbf-Cl mientras que la actividad sintética es muy poco sensible a Nbf-Cl.

La F_1 -ATP sintetasa es una enzima estructural y funcionalmente muy compleja. Está compuesta de cinco subunidades diferentes, se asocia con el sector membranal acoplado la catálisis al gradiente electroquímico de protones. Tiene múltiples sitios de unión para adenín nucleótidos, de alta y de baja afinidad en una constante interacción; también tiene sitio(s) de unión de nucleótidos que modulan la actividad de la enzima y que pueden o no entrar en la clasificación de alguno de los anteriores.

Es una enzima que parece estar en constante cambio, sufre cambios conformacionales que pueden alterar sus propiedades cinéticas o modificar sus sitios de unión a sustratos y productos; estos cambios que pueden ser pe-

queños, son continuos, y se ha propuesto que son sensibles a cambios iónicos en la composición del medio (114,115).

Dentro de su mecanismo de acción no están involucrados intermediarios fosforilados, sino una transferencia directa del Pi al ADP en el sitio activo, durante la formación de ATP, y un acoplamiento todavía no bien entendido entre la energía del gradiente electroquímico de protones, la entrada de Pi y ADP y la salida de ATP del sitio activo durante la síntesis de ATP.

Se han descrito cambios en un sitio que afectan la actividad del complejo entero y que la actividad del complejo afecta el contenido de cada uno de los sitios de unión; esto sugiere la existencia de una gran interacción recíproca entre los sitios de unión de nucleótidos. Los datos del presente trabajo sugieren que puede haber un sitio catalítico que a su vez puede actuar como regulador o modulador de la actividad de la enzima. En esta última condición el sitio no parece participar directamente en el ciclo catalítico.

Estas observaciones significarían una mayor versatilidad y dinamismo de la enzima que puede así modular el número de sitios que participan directamente en la catálisis. Así, la enzima en determinadas condiciones puede tener tres sitios catalíticos. Pero en otras condiciones como sería el cambio en contenido del sitio catalítico o en el medio externo, uno o dos sitios puede dejar de ser catalítico y convertirse en regulador.

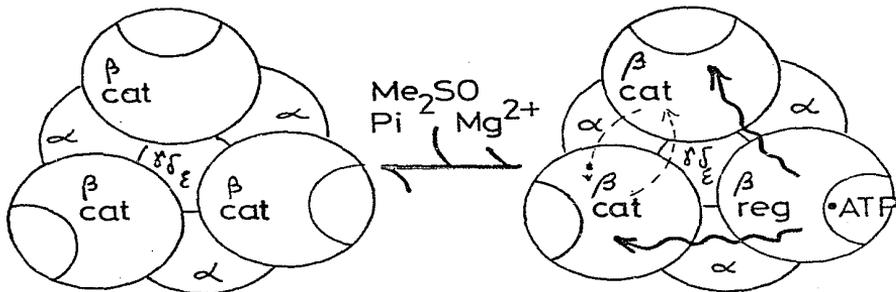
Nos parece importante recalcar que la concentración de Mg^{2+} en el medio parece modular la accesibilidad de los sitios con el medio exterior. En concentraciones altas de Mg^{2+} no se libera el ATP sintetizado y existe una mayor velocidad de síntesis, que se podría explicar también por una mayor retención del producto (ATP) en el sitio. También hay una inhibición de la hidrólisis de ATP, que a su vez se podría explicar por una disminución en la velocidad de liberación del producto (ADP y Pi) del sitio catalítico. En cambio a bajas concentraciones de Mg^{2+} , la hidrólisis del ATP sintetizado como el del medio ocurre a mayor velocidad. Estos datos sugieren que el Mg^{2+} ejerce un efecto regulador muy interesante sobre las interacciones y propiedades de los tres sitios catalíticos de la enzima.

Se ha propuesto que el Mg^{2+} ejerce un efecto regulador sobre la H^+ -ATP sintetasa (114,115). Se ha observado que el Mg^{2+} cambia las características cinéticas de la enzima; por lo que se ha propuesto que tiene un segundo papel además del de ser co-sustrato de la H^+ -ATP sintetasa, y que éste puede corresponder al de un segundo sitio de unión, aunque no ha sido identificado. También se ha visto que diferentes concentraciones de Mg^{2+} en el medio afectan la unión de los ligandos a sitios específicos en la ATPsintetasa. Se sabe que los adenín nucleótidos se unen a un sitio en la subunidad α en ausencia de Mg^{2+} . Por otro lado, el grupo de Di Pietro ha propuesto un sitio regulador (ver introducción, modelo de dos sitios catalíticos) cuya unión de nucleótido se estabiliza con Mg^{2+} y que sólo así un ADP unido ejercería un efecto inhibitorio. El grupo

de Pougeois (116) ha propuesto un sitio regulador para el Pi, cuya unión requiere también de altas concentraciones de Mg^{2+} . También, la reconstitución de F_1 a partir de subunidades aisladas se lleva a cabo en un medio con alta concentración de Mg^{2+} (82,84).

Por todo lo expuesto anteriormente creemos que la concentración de Mg^{2+} en el medio juega un papel determinante en la accesibilidad de los sitios de unión en la ATP sintetasa. Una posible explicación para este efecto del Mg^{2+} es que una interacción de los iones positivos con toda la proteína le induzca una conformación especial, que sea la responsable de los efectos en la unión de adenín nucleótidos a los distintos sitios. Este sería un efecto inespecífico del Mg^{2+} y podría ser reemplazado por otros cationes. El grupo de Gómez-Puyou (115) observó que parte del efecto del Mg^{2+} sobre la hidrólisis puede ser reemplazado por Ca^{2+} . Otra posible explicación para los efectos observados con Mg^{2+} sería a través de un sitio de unión para Mg^{2+} , diferente al sitio catalítico, pero con la capacidad de modularlo. Este sería un sitio con baja afinidad para el Mg^{2+} , lo cual permitiría diferenciar al " Mg^{2+} co-sustrato" del Mg^{2+} "modulador", de la misma forma que existe un sitio no catalítico para Pi (116).

De esta forma, proponemos el modelo explicado en el esquema 6.



Esquema 6. Modelo en que una subunidad catalítica se transforma en reguladora. ATP=ATP fuertemente unido. No tenemos ningún resultado que nos indique el número real de las subunidades catalíticas interactuando.

En este trabajo se cambiaron drásticamente las condiciones del medio en que generalmente se estudia a la enzima. En estas condiciones la enzima adquiere la capacidad de sintetizar ATP; es difícil decir si este ATP sintetizado se forma en los mismos sitios en la enzima soluble que en la enzima unida a membrana utilizando la energía del gradiente de H^+ y más aún si en determinadas condiciones fisiológicas tendría efectos similares a los aquí descritos. Sin embargo, en el campo de la transducción energética se está de acuerdo en que el mecanismo catalítico de la enzima soluble y la membranal es el mismo. El utilizar la enzima soluble se debe principalmente a tener un sistema mucho más limpio y sencillo que permita, dentro de lo que cabe, interpretaciones más directas. Por lo tanto sería interesante tratar de repetir este tipo de experimentos en el sistema acoplado a membrana, tratando de encontrar un cambio en la par-

ticipación directa de los sitios catalíticos o reguladores en diferentes condiciones.

Con los resultados expuestos en el presente trabajo se puede pensar que la F_1 -ATP sintetasa es una enzima membranal que se puede regular por las condiciones del medio. Lo cual puede ser una característica muy importante del mecanismo de regulación de la catálisis de una enzima que in vivo es la fuente de energía química para todos los procesos de la célula, y se tiene que enfrentar a muy diferentes condiciones y requerimientos como cambios en las concentraciones de iones y metabolitos así como diferentes demandas energéticas de la célula.

BIBLIOGRAFIA

1. Mitchell, P., (1969) Nature 19: 144-148
2. Hatefi, Y., (1985) Ann. Rev. Biochem. 54: 1015-1069
3. Forman, N.G., Wilson, D.F., (1982) J. Biol. Chem. 245: 6468-6472
4. Wikström, M., Krab, K., Saraste, M., (1981) Ann. Rev. Biochem. 50: 623-655
5. Racker, E., Kandrach, A., (1973) J. Biol. Chem. 248: 5841-5847
6. Di Virgilio, F., Azzone, G.F., (1982) Biochim. Biophys. Acta 683: 70-84
7. Wikström, M., y Saraste, M., (1984) The Mitochondrial Respiratory Chain, en Bioenergetics, Ernster, L. ed.
8. De Pierre, J.M., y Ernster, L., (1977) Ann. Rev. Biochem. 46: 201-262
9. Knowles, A.F., y Penefsky, H.S., (1972) J. Biol. Chem. 245: 6468-6472
10. Lamberth, D.O., Lardy, H.A., Senior, A.E., y Brooks, J.C., (1971) FEBS Letts 17: 330-337
11. Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H., Kagawa, Y., Ui, N., (1979) J. Biochem. 254: 9575-9535
12. Esch, F.S., y Allison, W.S., (1979) J. Biol. Chem. 254: 10740-10746
13. Yoshida, M., Poser, J.W., Allison, W.S., Esch, F.S., (1981) J. Biol. Chem. 256: 148-153
14. Esch, F.S., Bohlen, P., Otsuka, A.S., Yoshida, M., Allison, W.S., (1981) J. Biol. Chem. 256: 9084-9086
15. Esch, F.S., y Allison, W.S., (1978) J. Biol. Chem. 253: 6100-6106
16. Budker, V.G., Kozlov, I.A., Kurbanov, V.A., Milgrom, Y.M., (1977) FEBS Letts 83: 11-14
17. Kasahara, M., y Penefsky, H.S., (1978) J. Biol. Chem. 253: 4180-4187
18. Kohlbrener, W.E., y Cross, R.L., (1978) J. Biol. Chem. 253: 7609-7611
19. Nalin, C.M., y Cross, R.L., (1980) Fed. Proc. 39: 1843-1848

20. Pougeois,R., Satre,M., y Vignais,P.V., (1979) *Biochemistry* 18: 1408-1413
21. Harris,D.A., Brook,J., y Baltscheffsky, (1985) *Biochemistry* 24: 3876-3883
22. Gromet-Elhanan,Z., y Khanashvili,D., (1984) *Biochemistry* 23: 1022-1025
23. Sloothaak,M., Berden,J.A., Herweifer,M.A., Kemp,A., (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 809: 27-38
24. Boulay,T., Dalbon,P., Vignais,P.V., (1985) *Biochemistry* 24: 7372-7379
25. Senior,A.E., (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 11319-11322
26. Gresser,M., Gordon,J., Rosen,G., Boyer,P.D., (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 10649-10653
27. Rosen,G., Gresser,M., Vinkler,G., y Boyer,P.D., (1979) *J. Biol. Chem.* 254: 10654-10661
28. Kozlov,I., y Milgrom,Y.M., (1980) *Eur. J. Biochem.* 106: 457-462
29. Lunardi,J., Satre,M., y Vignais,P.V., (1981) *Biochemistry* 20: 473-480
30. Senior,A.E., Wise,J.C., (1983) *J. Membrane Biol.* 73: 105-124
31. Erns,K., y Criddle,R.S., (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 183: 742-752
32. Dunn,D., y Heppel,L.A., (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 210: 421-486
33. Tuena de Gómez-Puyou,M., Gómez-Puyou,A., Nordenbrand,K., y Ernster,L., (1979) en *Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport* eds. Quagliarielo,E., et.al.
34. Yoshida,M., Okamoto,H., Sone,N., Hirata,H., y Kagawa,Y.,(1977) *P.N.A.S.* 74: 936-940
35. Van de Stadt,R.J., Boer,B.L., y Van Dam,K., (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 548: 72-84

36. Harris, D.A., Tschärner, V., y Radda, G.K., (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 548: 72-84
37. Dreyfus, G., Gómez-Puyou, A., y Gómez-Puyou, M.T., (1981) *B.B. Res Commun.* 100: 400-486
38. Satre, M., de Jerphanion, M.B., Huet, J., y Vignais, P.V., (1975) *Biochim. Biophys. Acta.* 387: 241-255
39. Hortsman, L.L., y Racker, E., (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 1336-1344
40. Gómez-Fernández, J.C., y Harris, D.A., (1978) *Biochemical J.* 176: 967-975
41. Klein, G., Satre, M., Dianoux, A-C., y Vignais, P.V., (1980) *Biochemistry* 19: 2919-2925
42. Galante, Y.M., Wing, S., Y., y Hatéfi, Y., (1982) *Biochemistry* 12: 680-687
43. Tzagoloff, A., (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 1545-1551
44. Van de Stadt, R.J., Kraapoel, R.J., y Van Dam, K., (1972) *Biochim. Biophys. Acta.* 267: 25-36
45. Criddle, R.S., Packer, L., y Schich, P., (1977) *P.N.A.S.* 74: 4306-4310
46. Tzagoloff, A., MacLeanan, D.H., y Byington, K.H. (1968) *Biochemistry* 7: 1596-1602
47. Sanadi, D.R., (1982) *Biochim. Biophys. Acta.* 683: 39-56
48. Liang, A.M. y Fisher, R.L., (1983) *J. Biol. Chem.* 258: 4784-4788
49. Vadineau, A., Berden, J.A., y Slater, E.C., (1976) *Biochem. Biophys. Acta.* 501: 424-436.
50. Russel, L.K., Kirkley, S.A., y Slater, E.C. (1976) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 73: 434-443.
51. Senior, A.E., (1979) en: "Membrane Proteins in Energy Transduction" Capaldi, R.A., ed., pp 233-278
52. Vadineau, A., Berden, J.A., y Slater, E.C., (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* 449: 468-479

53. Boyer, P.D., Kolhbrenner, W.E., McIntosh, D.B., Smith, L.T., y O'Neal, C.C., (1982) Ann. N.Y. Acad. Sci. 402: 65-81
54. Webb, M.R., Grubmeyer, C., Penefsky, H.S., Trentham, D.R., (1980) J. Biol. Chem. 255: 11637-11639
55. Boyer, P.D., (1957) en Proc. Int. Symp. Enzyme Chem. Tokyo-Kyoto pp 301-307, London Marzen
56. Grubmeyer, C., Cross, R.L., Penefsky, H.S., (1982) J. Biol. Chem 257: 12092-12100
57. Feldman, R.I., y Sigman, D.S., (1982) J. Biol. Chem. 257:1676-1683
58. Choate, G.L., Hutton, R.L., Boyer, P.D., (1979) J. Biol. Chem. 254:286-290
59. de Meis, L., Martins, O.B., y Alves, E.W., (1980) Biochemistry 19: 4252-4261
60. Sakamoto, J., y Tonomura, Y., (1983) J. Biol. Chem. 93: 1601-1614
61. Cross, R.L., Nalin, C.M., (1982) J. Biol. Chem. 257: 2874-2881
62. Grubmeyer, C., y Penefsky, H.S., (1981) J. Biol. Chem. 256: 3718-3727
63. Grubmeyer, C., y Penefsky, H.S., (1981) J. Biol. Chem. 256: 3728-3734
64. Kayalar, C., Rosin, J., y Boyer, P.D., (1977) J. Biol. Chem. 252:2486-2491
65. Hackney, D.D., y Boyer, P.D., (1978) J. Biol. Chem. 253: 3164-3170
66. Yagi, A.M., y Hatefi, Y., (1985) J. Biol. Chem. 260: 14424-14427
67. Stroop, S.D., y Boyer, P.D., (1985) Biochemistry 24: 2304-2310
68. Ferguson, S.J., Lloyd, W.J., y Radda, G.K., (1975) Eur. J. Biochem. 54:127-135
69. Ferguson, S.J., Lloyd, W.J., y Radda, G.K., (1974) FEBS Letts 38: 234-236
70. Pougeois, R., Satre, M., y Vignais, P.V., (1979) Biochemistry 17:3018-3023
71. Kohlbrenner, W.E., y Cross, R.L., (1978) J. Biol. Chem. 253: 7609-7613
72. Cross, R.L., Kohlbrenner, W.E., (1978) J. Biol. Chem. 253: 4865-4868
73. Mitchell, P., (1976) Biochem. Soc. Trans. 4: 399-430

74. Gresser, M.J., Myers, J.A., y Boyer, P.D., (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 12030-12038
75. Ebel, R.E., y Lardi, H.A., (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 191-196
76. Shuster, S.M., Rernhart, G.D., y Lardi, H.A., (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 427-432.
77. Rosing, J., Kayalar, C., y Boyer, P.D., (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 2478-2485
78. Hackney, D.D., y Boyer, P.D., (1978) *J. Biol. Chem.* 253: 3164-3170
79. Di Pietro, A., Godinot, C., Martin, J.C., y Gautheron, D.C., (1979) *Biochemistry* 18: 1738-1745
80. Di Pietro, A., Penin, F., Godinot, C., y Gautheron, D.C., (1980) *Biochemistry* 19: 5671-5678
81. Di Pietro, A., Godinot, C., y Gautheron, D.C., (1981) *Biochemistry* 20: 6312-6318
82. Wang, J.H., (1984) *Biochemistry*: 23: 6350-6354
83. Soong, K.S. y Wang, J.H., (1984) *Biochemistry* 23: 136-141
84. Wang, J.H., (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 1374-1377
85. Ting, L.P., y Wang, J.H., (1980) *J. Bioenerg. Biomemb.* 12: 79-93
86. Low, H., y Vallin, I., (1963) *Biochim. Biophys. Acta.* 69: 361-374
87. Klein, G., Satre, M., Zaccari, G., y Vignais, P.V., (1982) *Biochem. Biophys. Acta* 681: 226-232
88. Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 182: 82-86
89. Penefsky, H.S., (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 2891-2899
90. Glynn, I.M., Chappel, J.B., (1964) *Biochem J.* 90: 147-149
91. Tuena de Gómez-Puyou, M., Ayala, G., Darszon, A., y Gómez-Puyou, A., (1984) *J. Biol. Chem.* 259: 9472-9478

92. Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A., Racker, E., (1960) J. Biol. Chem. 235: 3322-3329
93. Mangusson, R.P., Portis, A.R. Jr., y McCarthy, R.E., (1976) Anal. Biochem. 72: 653-657
94. Strehler, B.J., (1963) en Methods in Ezymatic Analysis. Bergmeyer, H.V., ed., pp. 559-572. Academic Press, New York
95. Gornall, A.G., Bardawill, C.J., y David, M.M., (1949) J. Biol. Chem 177:751-756
96. Lowry, O.H., Rosbrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J., (1951) J. Biol. Chem. 193: 265-275
97. Cross, R.L., (1981) Ann. Rev. Biochem. 50: 681-714
98. de Meis, L., (1984) J. Biol. Chem. 259: 6090-6097
99. Feldman, R.J., y Sigman, D.S., (1983) J. Biol. Chem. 258: 12178-12183
100. Yoshida, M., (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 114:907-912
101. Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M., y de Meis, L., en prensa
102. Andrews, W.W., Hill, F. C., y Allison, W.S., (1984) J. Biol. Chem. 259: 8219-8225
103. Kendpal, R.J., Melese, T., Stroop, S.D., y Boyer, P.D., (1985) J. Biol. Chem., 260: 5542-5547
104. Cross, R.L., Cunningham, D., Tamura, J.K., (1984) Curr. Topics in Cellular Regulation 24: 335-344
105. Mitchell, P. (1976) Biochem. Soc. Trans. 4:399-430
106. George, P., Witonsky, R.J., Trachtman, M., Wu, C., Dorwart, W., Richman, L., Richman, W., Shurayh, F., y Lentz, B., (1970) Biochim. Biophys. Acta. 223: 1-15
107. Haynes, D.M., Kenyon, G.L., y Kollman, P.A., (1978) J. Am. Chem. Soc. 100: 4331-4340
108. de Meis, L., y Carvalho, M.G.C., (1974) Biochemistry 13:5032-5038

109. Knowles, C., y Boyer, P.D., (1979) J. Biol. Chem. 254: 10654-10661
110. Masuda, H., y de Meis, L., (1973) Biochemistry 12: 4581-4585
111. Boyer, P.D., Cross, R.L., y Momsen, W., (1973) P.N.A.S. 70: 2837-2839
112. Boyer, P.D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E., y Slater, E.C., (1977) Ann. Rev. Biochem. 46: 955-1026
113. Clark, D.D., y Schuster, S.M., (1980) J. Bioenerg. Biomemb. 12: 369-378
114. Senior, A.E., (1981) J. Biol. Chem. 256: 4763-4767
115. Gómez-Puyou, A., Ayala, G., Muller, U., y Tuena de Gómez-Puyou, M., (1983) J. Biol. Chem. 258: 13673-13679
116. Pougeois, R., y Lanquin, G. J-M, (1985) Biochemistry 24: 1070-1074
- 117.

A B R E V I A T U R A S

ADP	Adenosín 5'-difosfato
AMP	Adenosín 5'-monofosfato
AMP-PNP	5'-adenilil-imidodifosfato
ATP	Adenosín 5'-trifosfato
cit b	Citocromo b
cit c	Citocromo c
ΔH^+	Gradiente electroquímico de protones
DCCD	Diciclohexilcarbodiimida
DL	Deshidrogenasa láctica
E_m^i	Potencial medio
FAD	Flavín adenín nucleótido
FMN	Flavín mono nucleótido
fpm	Fuerza protón motriz
FSBA	5'- [p-(fluorosulfonil)benzoil] adenosina
F_o	Factor de acoplamiento _o - porción membranal de la H^+ -ATP sintetasa
F_1	Factor de acoplamiento ₁ - porción soluble de H^+ -ATP sintetasa
H^+	Protón
H^+ -ATP sintetasa	Adenosín-5'-Trifosfatasa de Protones (E.C. 3.6.1.3)
IBB	Isobutanol benceno
Ka	Constante de asociación
Kd	Constante de disociación

Km	Constante de Michaelis-Menten
Me ₂ SO	Dimetilsulfóxido
MOPS	Acido 3- [N-Morpholino] propanesulfónico
NADH	Nicotinamida adenindinucleótido reducido
Nbf-Cl	4-cloro-7-nitrobenzofurazano
NTP	Nucleótido 5'-trifosfato
OSCP	Proteína que confiere sensibilidad a Oligomicina
PEI-Celulosa	Poliétilen-imina celulosa
PEP	Fosfoenol piruvato
Pi	Fosfato inorgánico
PK	Piruvato Cinasa
psm	Partículas submitocondriales
Q	Ubiquinona
TCA	Acido Tricloroacético
TF ₁	Factor de acoplamiento ₁ de la bacteria Termofílica PS3

INDICE DE TABLAS, ESQUEMAS Y FIGURAS

		<u>PAG.</u>
Tabla 1:	Composición de los complejos del sistema de Fosforilación Oxidativa	3
Tabla 2.	Reversibilidad del efecto del Me_2SO	41
Esquema 1.	Interacción entre los complejos del sistema de Fosforilación Oxidativa.....	3
Esquema 2.	Participación de los tres sitios alternantes en el mecanismo de cambio de afinidad.....	17
Esquema 3.	Modelo de tres sitios idénticos y alternantes.....	21
Esquema 4.	Modelo de dos sitios catalíticos, alternantes y uno regulador.....	22
Esquema 5.	Modelo de subunidades heterogéneas.....	24
Esquema 6.	Modelo en que una subunidad catalítica se transforma en reguladora.....	70
Figura 1.	Efecto de diferentes concentraciones de Me_2SO en la síntesis de ATP.....	39
Figura 2.	Efecto del Me_2SO en la hidrólisis de ATP.....	40
Figura 3.	Hidrólisis de ATP en Me_2SO	43

Figura 4.	Efecto del Me_2SO en la inhibición de la actividad hidrolítica por Nbf-Cl.....	45
Figura 5.	Efecto de la concentración de Me_2SO en la hidrólisis de ATP del medio de una enzima que sintetizó ATP fuertemente unido y una enzima que no sintetizó ATP.....	47
Figura 6.	Efecto de la hidrólisis de ATP externo sobre el contenido de ATP fuertemente unido en distintas concentraciones de Me_2SO	49
Figura 7.	Efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la hidrólisis de ATP del medio de una enzima que sintetizó ATP fuertemente unido y una enzima que no sintetizó ATP.....	51
Figura 8.	Efecto de la hidrólisis de ATP externo en bajas concentraciones de Mg^{2+}	53
Figura 9.	Efecto del ATP "atrapado" en 10mM MgCl_2 sobre la hidrólisis de ATP del medio.....	54
Figura 10.	Efecto del ATP sintetizado en la inhibición de la actividad hidrolítica por Nbf-Cl.....	56
Figura 11.	Síntesis de ATP en la enzima modificada con Nbf-Cl y en la enzima nativa.....	58