

11261

le)
3



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

"REGULACION DE LA ATPasa MITOCONDRIAL POR LA PROTEINA
INHIBIDORA EN LEVADURAS CRECIDAS EN CONDICIONES DE
REPRESION Y DERREPRESION CATABOLICA".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(BIOLOGIA MOLECULAR)

P R E S E N T A

Angel Nava Ojeda

MEXICO, D. F.

1982

FALLA DE ORIGEN

11261



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.

INDICE

GENERALIDADES	pagina
Estructura mitocondrial.....	1
Distribución de enzimas mitocondriales.....	2
Componentes estructurales de la fosforilación oxidativa.....	3
Composición de la OSATPasa.....	8
Fosforilación oxidativa.....	9
Hipótesis química.....	9
Hipótesis quimiosmótica.....	10
Hipótesis conformacional.....	14
Mecanismo de síntesis de ATP.....	15
INTRODUCCION	
Biogénesis de las mitocondrias.....	16
Mecanismo de incorporación de proteínas a la mitocondria. ...	17
Represión catabólica.....	18
OBJETIVOS.....	21
MATERIALES Y METODOS	
Cultivo de levaduras.....	23
Aislamiento de mitocondrias.....	24
Obtención de partículas submitocondriales de Magnesio ATP... ..	28
Medida del consumo de oxígeno y control respiratorio por oximetría.....	28
Preparación de partículas submitocondriales de sefadex.....	29
Medida de la actividad de ATPasa.....	30

Determinación de proteína.....	31
Obtención de anticuerpos anti-proteína inhibidora y anti-F ₁ de mitocondrias de levadura.....	31
Detección de anticuerpos por doble inmunodifusión.....	32
Marcaje de anticuerpos con ¹²⁵ I.....	32
Extracción de ATPasa de mitocondrias de levadura a hexano e incorporación a liposomas.....	34
RESULTADOS	
Parámetros respiratorios en mitocondrias de levaduras crecidas en represión y derrepresión catabólica.....	38
Activación de la ATPasa mitocondrial por el establecimiento del gradiente electroquímico.....	43
Estimulación de la actividad de ATPasa de PSM MgATP por calor.....	44
Estimulación de la actividad de ATPasa de PSM MgATP por la columna de sefadex.....	49
Estimulación de la actividad de ATPasa de PSM MgATP por tripsina... 49	
Extracción de la ATPasa de mitocondrias de levadura a hexano e incorporación a liposomas.....	53
Inactivación de la ATPasa de PSM MgATP por frío.....	56
Fijación de anticuerpos marcados con ¹²⁵ I a PSM MgATP de levaduras reprimidas y derreprimidas.....	58
Titulación de partículas de sefadex con inhibidor exógeno.....	60
DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	73

GENERALIDADES

Estructura mitocondrial.

La mitocondria es un organelo subcelular, que ha sido llamado "la planta motriz de la célula" debido a que es el generador principal de ATP en las células eucariotas. Sin embargo, existen organismos como las levaduras que bajo ciertas condiciones pueden prescindir de esta fuente de ATP y crecer solo a expensas de la energía generada por la glucólisis. Esta característica es la que ha hecho a las levaduras un sistema biológico útil en el estudio de la biogénesis de la mitocondria, aunado a que son fácilmente cultivables y que es posible inducirles mutaciones en el sistema mitocondrial sin que éstas sean letales(1-3).

La mitocondria es un organelo de tamaño y forma variable, formado por dos membranas: una externa, que es permeable a moléculas de peso molecular hasta de varios miles(4) y tiene una composición de fosfolípidos y una relación fosfolípido/proteína muy semejante a las otras membranas del citosol. Una interna, que tiene permeabilidad selectiva y una composición de fosfolípidos diferente de la externa, enriquecida en proteínas, ya que contiene un 75% de proteínas y un 25% de lípidos(5). La membrana externa separa a la mitocondria del citosol, entre ambas membranas se encuentra el espacio intermembranal, y la membrana interna delimita otro espacio denominado matriz mitocondrial.

La tabla 1 contiene una lista de las principales enzimas marcadas localizadas en las diferentes membranas y compartimientos de la mitocondria.

Tabla 1. Distribución de Enzimas Mitocondriales

MEMBRANA MITOCONDRIAL EXTERNA

Acil CoA Sintetasa
Amino Oxidasa
NADH-Citocromo b₅ Reductasa
Glicerofosfato Acil Transferasa
Kinurenina 3 Monooxigenasa

MEMBRANA MITOCONDRIAL INTERNA

NADH-CoQ Reductasa, sensible a rotenona
Succinato-CoQ Reductasa
CoQH₂-Citocromo c Reductasa
Citocromo c Oxidasa
OS-ATPasa
Carnitina Acil Transferasa
Translocasa ATP/ADP

ESPACIO INTERMEMBRANAL

Adenilato cinasa
Nucleósido difosfo cinasa

MATRIZ MITOCONDRIAL

Enzimas del Ciclo de Krebs excepto deshidrogenasa succínica
Enzimas de la Beta Oxidación
Enzimas de la Síntesis Proteica Mitocondrial
Enzimas del Ciclo de la Urea

La estructura de la membrana interna mitocondrial merece un estudio más cuidadoso, debido a la importancia que tiene en los procesos de transducción de energía, ya que contiene entre otros componentes, a los integrantes de la cadena respiratoria y a la ATPasa. Tiene una superficie mayor que la externa, debido a que se pliega sobre sí misma, emitiendo proyecciones hacia el interior de la matriz que han sido llamadas crestas mitocondriales, cuando las mitocondrias se someten a sonicación las crestas se rompen y sellan nuevamente formándose pequeñas vesículas de polaridad invertida a las que se les ha llamado partículas submitocondriales (PMS). Por medio de microscopía electrónica y mediante tinción negativa, se ha observado en estas membranas, la presencia de partículas de 90 \AA que sobresalen de la misma, denominadas inicialmente partículas elementales por Fernández-Morán (6) e identificadas posteriormente como H^+ -ATPasas que en la mitocondria intacta catalizan la síntesis del ATP (7).

Componentes Estructurales de la Fosforilación Oxidativa

La cadena respiratoria está formada por una serie de complejos que tienen como características común la de ser oxidorreducibles y estar formados por la asociación de un grupo prostético que realiza la acción oxidorreductora y una proteína específica. Los siguientes componentes forman parte de la cadena respiratoria:

Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD^+/NADH), Flavina Mononucleótido (FMN/FMNH_2), Flavina Adenina Dinucleótido (FAD/FADH_2),

Centros de Hierro Azufre (Fe-S), Ubiquinona, Citocromo b(b_T y b_K), Citocromo c₁ y Citocromo c, Citocromo a-a₃. Ordenados por su potencial redox abarcan de -0.32V para el NAD⁺/NADH hasta 0.82V para O/H₂O en la citocromo oxidasa. Aunque todos los integrantes se encuentran localizados en la membrana interna mitocondrial, investigaciones recientes (8-10) parecen indicar que no se encuentran uniformemente distribuidos en la membrana, sino que están asociados formando complejos, los cuales resisten varios pasos de purificación, permitiendo su aislamiento y caracterización. Utilizando detergentes como el desoxicolato para solubilizar la membrana interna mitocondrial, se han aislado y caracterizado cinco complejos proteicos, cuatro de los cuales constituyen la cadena respiratoria denominados I, II, III y IV y el último o complejo V es el que acopla el transporte electrónico a la síntesis de ATP y corresponde a la OSATPasa.

Complejo I. También llamado NADH-CoQ reductasa que presenta las actividades de deshidrogenasa del NADH y de transhidrogenasa, contiene: FMN, Ubiquinona, 5-6 centros de Hierro- Azufre (Fe-S), 16 polipéptidos y tiene un peso molecular aproximado de 850 000 daltones (11, 12).

Complejo II. Denominado Succinato-CoQ reductasa, presenta la actividad de deshidrogenasa del succinato y contiene: FAD, Ubiquinona, 3 centros Fe-S, 2 polipéptidos y tiene un peso molecular aproximado de 97 000 daltones (11).

Complejo III, o CoQH₂- citocromo c reductasa, contiene: citocromo b(b_T y b_K), citocromo c₁, ubiquinona y 3 centros de Fe-S; en

geles de acrilamida se han observado 8 bandas y se calcula su peso molecular en 310 000 daltones (13).

Complejo IV o Citocromo oxidasa. Contiene: citocromo a, citocromo a₃, Fe⁺⁺, Cu⁺⁺ y 7 polipéptidos con un pesos molecular aproximado de 325 000 para la forma dimérica (13).

Complejo V identificado como ATPasa sensible a oligomicina (OS-ATPasa). Este complejo multienzimático es muy abundante en la membrana interna mitocondrial y se calcula que más de un 10% de la proteína de esta membrana se debe a este componente (14). Está formada de tres segmentos: membranal o Fo, catalítico o F₁ y segmento de unión o cuello en mitocondrias y por dos segmentos en cloroplastos y bacterias ya que el que corresponde al cuello forma parte del segmento Fo.

El segmento membranal o Fo (CFo y BFo en cloroplastos y bacterias respectivamente) es muy hidrofóbico, contiene 4 polipéptidos (15) y funciona como un canal que permite el paso de los protones hasta la porción catalítica. En experimentos utilizando Fo en liposomas (16) el paso de protones a través de este canal ha sido posible bloquearlo por DCCD, oligomicina, OSCP y ATPasa, lo cual ha sugerido que este canal es bloqueado por las proteínas a las que se encuentra asociado normalmente o por reactivos como el DCCD y la oligomicina. La interacción del DCCD ha sido estudiada con más detalle (17) y se ha encontrado que su sitio de fijación es principalmente a un polipéptido de 8 000 daltones de peso molecular, en el que se encuentra específicamente unido al grupo carboxilo del glutámico número 59,

por esta razón a este polipéptido se le conoce como "proteína fijadora de DCCD"; esta proteína conserva una composición de aminoácidos y una secuencia muy constante en varias especies que han sido estudiadas (18).

El segmento del cuello tiene una función estructural y es la de fijar la F_1 a la F_0 , está compuesto por dos proteínas, OSCP o "proteína que confiere sensibilidad a la oligomicina" y F_0 .

El segmento catalítico o F_1 , ha sido aislado de muchas fuentes (19 - 21) y su participación en la síntesis del ATP fue descrita por Racker y col. (22). Posibles modelos de su compleja estructura se han obtenido con base en estudios utilizando accesibilidad a anticuerpos (23) y a la digestión con tripsina (24), con reactivos de entrecruzamiento (25) y por microscopía electrónica (26), sin embargo, hasta la fecha no se tiene un modelo definitivo que satisfaga todos los datos experimentales existentes.

La F_1 está formada de 5 polipéptidos diferentes (27) denominados α , β , γ , δ y ϵ en orden decreciente de peso molecular determinado en electroforesis en SDS y 1,2,3,4 y 5 en levaduras, con una estequiometría probable de 3 α : 3 β : 1 γ : 1 δ : 1 ϵ . La subunidad β contiene el sitio catalítico y al parecer un residuo de tirosina es importante para la acción catalítica (28, 29). La F_1 contiene 6 sitios de fijación para nucleótidos, 3 de fijación fuerte con recambio lento y dos o tres de

fijación débil con recambio rápido posiblemente correspondientes a los sitios catalíticos, además contiene sitios de fijación para aniones(30,31).

Una proteína que inhibe la hidrólisis del ATP en la F_1 fue aislada de mitocondrias de corazón de res por Pullman y Monroy en 1963(32), y posteriormente ha sido aislada de mitocondrias de otras fuentes(33-35). Sin embargo no ha sido posible aislarla de cloroplastos ni de Escherichia coli, en donde al parecer esta función la desempeña la subunidad E de la misma F_1 . Este polipéptido es muy sensible a la digestión por tripsina(32,36) es estable al calor(5 minutos a 70°C) y al ácido, características que han sido usadas para aislarlo y purificarlo. Su asociación con la F_1 se realiza a través de la subunidad β (37) y estudios cinéticos de esta asociación parecen indicar que se requiere la hidrólisis de ATP para que se lleve a cabo.

Los inhibidores de corazón de res y de levadura han sido secuenciados y contienen zonas semejantes de aminoácidos básicos e hidrofóbicos(38,39).

En la tabla 2 se ilustra la composición de la OS-ATPasa de corazón de res y de levadura.

Tabla 2. Composición de la OS-ATPasa (Complejo V)

Corazón de res(106)			Levadura(107)		
Segmento	P.M	Subunidad	Segmento	P.M.	Subunidad
F ₁	53 000	α	F ₁	58 500	1
"	50 000	β	"	54 000	2
"	33 000	γ	"	38 500	3
"	17 000	δ	"	31 000	4
"	7 500	ε	"	12 000	5
"	10 000	F ₁ Inhibidor	"	7 400	F ₁ Inhibidor
Cuello	18 500	OSCP	Cuello	18 500	OSCP
"	8 000	F ₆	-	-	-
F _o	29 000		F _o	29 000	
"	22 000		"	22 000	
"	12 000		"	12 000	
"	7 800	Proteína fijadora de DCCD	"	7 500	Proteína fijadora de DCCD

Fosforilación Oxidativa

El mecanismo por el cual la energía procedente de la oxidación de los substratos es capturada para sintetizar el ATP ha sido una preocupación de los bioenergéticos, a pesar de ello, no existe un mecanismo con el cual todos los datos experimentales estén de acuerdo, lo cual por otra parte es benéfico, ya que estimula la realización de investigaciones posteriores, que eventualmente podrán producir evidencias más concretas acerca de él. Actualmente existen varias teorías propuestas para el mecanismo de la fosforilación oxidativa, algunas de las cuales han caído en desuso y serán tratadas someramente.

Hipótesis química. En 1953 (40) Slater, propuso un mecanismo para explicar la fosforilación oxidativa tomando como modelo las reacciones de síntesis de ATP a nivel de substrato que se producen en la glucólisis. Propuso que en 3 sitios de la cadena respiratoria, en los que la diferencia de potencial redox es suficientemente grande, se hallaría la energía suficiente como para producir la síntesis de ATP.

Esta energía sería captada en forma de un intermediario de alta energía (~~1- μ X~~, μ MP), que posteriormente transferiría esta energía al ADP para dar ATP. Sin embargo por más esfuerzos que se hicieron para encontrar este intermediario no se tuvo éxito por lo que la hipótesis fue perdiendo adeptos. A pesar de esto, recientemente (41) algunos investigadores están tratando de explicar el mecanismo de síntesis de ATP en otras cation ATPasas si--

guiendo los postulados de la hipótesis química.

Hipótesis quimiosmótica. En 1961 Peter Mitchel (42) propuso un mecanismo para la fosforilación oxidativa que a diferencia del de Slater no requería de un compuesto de alta energía intermediario entre las reacciones de oxidorreducción y la síntesis de ATP. En esta hipótesis el intermediario se visualiza como un gradiente electroquímico de H^+ . Actualmente esta hipótesis cuenta con bastantes evidencias experimentales (43 - 45). Está basada en los siguientes postulados.

1.- La ATP sintetasa es una enzima de localización membranar, quimiosmótica, dirigida reversiblemente por H^+ y que tiene características estequiométricas de H^+/Pi .

2.- Las cadenas respiratoria y fotoredox son sistemas de localización membranar, quimiosmótica y protonmotrices, que tienen características estequiométricas de $H^+/2e$, y la misma polaridad para translocar protones a través de la membrana que la ATPasa cuando hidroliza ATP.

3.- Existen sistemas transportadores de solutos ligados a protones (o a iones hidroxilo) para estabilización osmótica o transporte de metabolitos.

4.- Los sistemas anteriores se encuentran localizados en una membrana con baja permeabilidad a los solutos en general y a H^+ y $-OH$ en particular.

Las reacciones que implica esta hipótesis se muestran en la figura 1. El esquema está elaborado básicamente con las mismas reacciones de oxidorreducción de la hipótesis química, exceptuando en donde intervienen los centros de FeS o ferro-sulfoproteínas y la CoQ, pero con la diferencia de que en el mecanismo quimiosmótico existe la translocación de H^+ como consecuencia de la asimetría de los componentes de la cadena entre sitios de la misma, estos sitios son; entre NADH y FeS, entre $CoQH_2$ y citocromo c_1 y entre $CoQH$ y citocromo b, estos dos últimos formando parte del ciclo de la CoQ (46). Los protones así translocados generan un gradiente electroquímico a través de la membrana, el cual puede ser utilizado: a) para sintetizar ATP cuando éstos regresan por el canal (Fo) al sitio activo de la ATPasa (mecanismo directo) o producen cambios conformacionales en ella (mecanismo indirecto), b) para el transporte de metabolitos y iones a través de la membrana (47).

El gradiente electroquímico está formado por dos componentes: una diferencia de potencial eléctrico $\Delta\psi$, (positivo afuera y negativo adentro) y una diferencia de potencial químico (H^+ elevados afuera y $-OH$ elevados adentro de la membrana mitocondrial), medido como una diferencia de pH. El gradiente electroquímico de protones se expresa matemáticamente con la siguiente ecuación:

$$\Delta\mu_{H^+} = F\Delta\psi - 2.3 RT\Delta pH$$

matríz mitocondrial

membrana mitocondrial
interna

espacio inter-
membranal

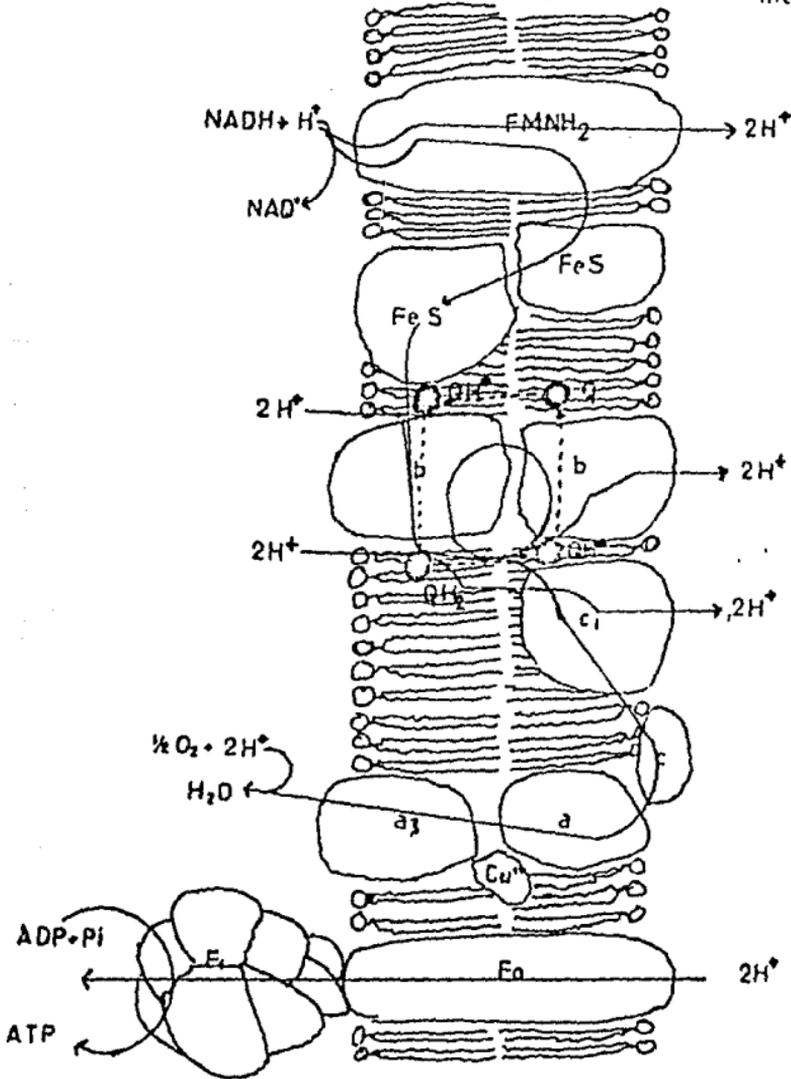


Fig.1 FOSFORILACION OXIDATIVA
HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA

la cual se puede transformar a fuerza protonmotriz (48) dividiendo entre la constante de Faraday. $\Delta P = \frac{\Delta \mu H^+}{F} = \Delta \psi - z \Delta pH$ en donde $\Delta \mu H^+$ diferencia de potencial electroquímico de protones

$\Delta \psi$ = diferencia de potencial eléctrico

ΔpH = diferencia de potencial de protones

ΔP = fuerza protonmotriz

F, R, T = constantes de Faraday, de los gases y temperatura absoluta respectivamente.

$$z = \frac{2.3 RT}{F}$$

El ΔP representa en el mecanismo quimiosmótico la energía que impulsa la síntesis de ATP o el transporte de metabolitos y iones en la mitocondria.

El $\Delta \psi$ puede ser medido indirectamente, mediante la distribución de iones permeantes tal como tetrafenilfosfonio y haciendo uso de la ecuación de Nernst (108), midiendo el cambio del caroteno en bacterias fotosintéticas o directamente mediante la implantación de microelectrodos, esto ha sido posible en bacterias (50) pero en mitocondrias gigantes (51) no se ha observado un $\Delta \psi$ medible.

El ΔpH ha sido medido por medio de la distribución a través de la membrana de un ácido débil como el lactato (49) o median

te 31p RMN (49).

El valor calculado para el $\Delta\psi$ es aproximadamente de 170 mV y para $-Z\Delta pH$ es de aproximadamente 30 mV, por lo que el ΔP en una mitocondria que está respirando pero no sintetizando ATP será de 200 mV. (49).

Con respecto a las estequiometrías de protones bombeados por sitio hay mucha controversia y se han reportado valores hasta de 4 (52). Recientemente existen experimentos que parecen sugerir la existencia de 3 bombas de protones, una en cada sitio de fosforilación de la cadena respiratoria, en los complejos I, III y IV anteriormente señalados, sin embargo, esta idea todavía es motivo de fuertes discusiones (53 - 55).

Una variante de la hipótesis quimiosmótica es la propuesta por Williams (56), en la que los protones no se equilibran con el medio fuera de la membrana sino que permanecen en ésta; en apoyo a esta hipótesis, están los experimentos que demuestran, que la fosforilación se inicia casi inmediatamente después de la iluminación y mucho antes de que se pueda medir cualquier cambio de pH (57), o los experimentos reportados por H. Tedeschi, quien reportó haber encontrado un $\Delta\psi$ muy pequeño y de signo contrario el cual por lo tanto es insuficiente para explicar la síntesis ATP.

Hipótesis conformacional. Se han propuesto otras hipótesis para explicar la fosforilación oxidativa, una de ellas es la del cambio conformacional sugerida por Boyer (58), en la cual

el intermediario que transfiere la energía de las reacciones de oxidorreducción a la síntesis de ATP equivale a un cambio conformacional en la ATPasa, en la actualidad, existen numerosas evidencias experimentales a favor de esta hipótesis (59 - 60).

Mecanismo de síntesis de ATP.

Con respecto al mecanismo de síntesis de ATP, existen dos propuestos, uno denominado directo porque en él intervienen directamente en la reacción de síntesis los protones generados en la cadena respiratoria (61), y otro indirecto en el que el potencial electroquímico generado se usa para liberar el ATP formado y fijar a la enzima ADP y P_i , es decir que de acuerdo a este mecanismo la unión del P_i y del ADP para formar ATP no requiere energía y es la fijación de los substratos y la liberación del producto el paso que la requiere (62).

INTRODUCCION

Biogénesis de las mitocondrias.

Un número reducido de las proteínas mitocondriales es sintetizado en las mitocondrias pero la mayor parte de éstas son sintetizadas en el citoplasma (63) y posteriormente incorporadas a la mitocondrias. Existen en ella complejos proteicos cuyos componentes son de origen bigenómico, es decir parte son codificados por el DNA mitocondrial y parte por el DNA nuclear. No se ha dado el caso en el cual un mensajero transcrito en el núcleo sea traducido en la mitocondria ni viceversa (64).

La disección del origen de síntesis mitocondrial y citoplásmico de los diferentes complejos, se ha logrado mediante dos enfoques: inhibiendo la síntesis proteica mediante antibióticos específicos de cada sistema de síntesis o usando mutantes nucleares y extracromosómicas (citoplásmicas), obteniéndose resultados semejantes.

En levaduras, mediante el uso de cloranfenicol, que inhibe la síntesis proteica mitocondrial, se ha logrado demostrar que la F_1 (65), la OSCP (66) y la proteína inhibidora (35) se sintetizan lo que indica que su síntesis se lleva a cabo en el citosol, - - mientras que las 4 subunidades de la F_0 no son sintetizadas, lo que indica que su sitio de síntesis es mitocondrial. Por otra parte si se usa cicloheximida, que inhibe la síntesis proteica del citosol, las 4 subunidades de F_0 se sintetizan, lo que quiere decir que su síntesis se realiza en la mitocondria, mientras que en

estas condiciones la síntesis de la F_1 , la OSCP y la proteína inhibidora no se lleva a cabo (67). No obstante los resultados anteriores, parece ser que con respecto el sitio de síntesis de algunos componentes de la OSATPasa no se puede generalizar, ya que se ha demostrado que la proteína fijadora de DCCD que forma parte de la F_0 , en mitocondrias de hígado de rata y Neurospora se sintetiza en el citosol y no en la mitocondria (68).

Utilizando la misma metodología mencionada anteriormente se ha demostrado que las 3 subunidades mayores (I, II y III) del complejo Citocromo oxidasa son de origen mitocondrial y las 4 menores (IV, V, VI y VII) de origen citoplasmático (69).

Con respecto al complejo b-c, parece ser que la subunidad mayor es de origen mitocondrial y el resto citoplasmático (70).

Mecanismo de importancia de las proteínas a la mitocondria.

Para explicar la manera como las proteínas sintetizadas en el citosol se incorporan a la mitocondria se han propuesto los siguientes mecanismos:

- 1.- Por difusión
- 2.- Por existencia de un péptido señal hidrofóbico que le permita atravesar la membrana.
- 3.- Por agregación de las proteínas con lípidos lo que les permitiría atravesar la membrana.
- 4.- Por incorporación de RNAm nuclear y su traducción posterior por el sistema de síntesis mitocondrial

5.- Por un mecanismo de descarga vectorial de polipéptidos al interior de la mitocondria mediante la continuidad entre el retículo endoplásmico rugoso y la mitocondria o por ribosomas directamente asociados a mitocondrias.

Actualmente el mecanismo más aceptado es el del péptido señal con algunas modificaciones, que sugieren la posible fusión de las membranas interna y externa durante dicho proceso que es además dependiente del potencial electroquímico (71 - 72). Sin embargo, existen muchos datos experimentales que apoyan la síntesis a través de ribosomas asociados a las mitocondrias (73 - 75).

Represión catabólica.

En los primeros estudios sobre la regulación metabólica, J. Monod y col. observó que cuando crecía E. coli en presencia de dos substratos tales como glucosa y lactosa, las enzimas requeridas para metabolizar la lactosa solo aparecían hasta que se consumía la glucosa en el medio; puesto que la glucosa como tal no era el factor causante de este fenómeno, se supuso que alguno de sus catabolitos era el que ocasionaba la represión de la síntesis de las enzimas para catabolizar la lactosa y por esta razón a este fenómeno se le dió el nombre de "represión catabólica" (76).

Actualmente, la represión catabólica observada en los experimentos originales de J. Monod y col. ha sido ampliamente estudiada y se conoce que la represión de la síntesis de proteínas

es debida a los niveles bajos de AMPc que existen en las células crecidas en glucosa como fuente de carbono. El AMPc es requerido, junto con una proteína llamada CAP (proteína activada por catabolito), para que la RNA polimerasa se una a los promotores específicos de los operones y de esa manera transcriba los genes que codifican para las enzimas de vías metabólicas para la utilización de lactosa, galactosa, maltosa, etc.

Cuando las levaduras son crecidas en presencia de glucosa y se les agrega AMPc, se incrementan los niveles de consumo de oxígeno y de algunas enzimas de la cadena respiratoria (77), esto se podría interpretar como que la glucosa reprime la síntesis de enzimas respiratorias por un proceso semejante al mencionado anteriormente. Sin embargo, recientemente se ha encontrado la existencia de una serie de proteasas, las cuales parecen estar sujetas a través de sus inhibidores específicos a la regulación por glucosa; esto significaría que la glucosa puede regular los niveles de algunas enzimas respiratorias a través de un mecanismo de hidrólisis por proteasas (78). Por otra parte, también se ha visto que las levaduras crecidas en glucosa y sujetas por lo tanto a represión, una vez que se termina la glucosa en el medio de crecimiento (cultivo) y después de un periodo de adaptación en la cual no crecen, empiezan a consumir el etanol formado en la primera etapa, entrando en una fase de franca derrepresión en la cual la síntesis de todas las enzimas reprimidas en la primera fase son derreprimidas.

Antecedentes

El estudio de la regulación del sistema fosforilante está sujeto a numerosos factores uno de los cuales lo constituye la proteína inhibidora, cuyo papel modulador a pesar de los numerosos estudios realizados no está completamente claro. La utilización del arma genética de inducción y represión sobre las modificaciones de los niveles de este componente en el sistema fosforilante nos parecieron un enfoque promisorio para estudiar su papel regulador.

Basados en algunos antecedentes (65) que mostraban que en levaduras crecidas en condiciones de represión por glucosa, la activación por el paso en una columna de sefadex, índice de contenido de inhibidor, no se obtenía, se supuso que en estas condiciones de crecimiento el contenido de proteína inhibidora era el resultado de una menor síntesis. En consecuencia, si durante la represión por glucosa la síntesis de algunas enzimas mitocondriales se veía disminuida era posible que la proteína inhibidora estuviera sujeta a la represión, al igual que la F_1 que es la proteína a la cual regula, pudiendo tener dos situaciones: una en que la represión afectara la síntesis de la ATPasa y la proteína inhibidora en forma paralela, lo cual indicaría que están en el mismo operón, como sucede en E coli en que la subunidad ϵ , supuestamente la proteína inhibidora de ese sistema, se encuentra en el mismo operón de las otras subunidades de la ATPasa y se sintetizan en forma coordinada (79), o un segundo caso en el que estuviera en diferente

localización del genoma pero con promotor de afinidad igual para la RNA polimerasa que el de las otras subunidades de la ATPasa. La otra situación sería la que contemplara el hecho de que la represión afectara de manera diferente la síntesis de F_1 y de proteína inhibidora que resultara en una producción no coordinada de ellas, indicando que están localizadas en diferentes operones y además que responden a diferentes promotores.

Existen en la literatura numerosas observaciones sobre el comportamiento del complejo F_1 -Inhibidor soluble o particulado que podrían ser tomados como criterios de contenido de proteína inhibidora, todos ellos indirectos, ya que la medida directa por extracción y purificación ha dado resultados erráticos y la medida de la actividad y de la activación no siempre puede deberse a remoción del inhibidor.

Objetivos.

En este trabajo intentamos evaluar la modificación en el -- contenido de proteína inhibidora así como la forma como regula ésta a la ATPasa en levaduras crecidas en represión catabólica comparandola con aquellas que son crecidas en derrepresión. Para realizar lo anterior utilizaremos diferentes tratamientos que nos permitirán inferir el contenido de inhibidor en ambos esta--dos metabólicos. Las pruebas comparativas a las cuales sometimos nuestras dos preparaciones de mitocondrias fueron: la respuesta a la temperatura, al tratamiento con tripsina y al paso a través de una columna de sefadex G-50, sumados con las propiedades que tiene el complejo F_1 -Inhibidor de responder al establecimiento

del gradiente electroquímico o de ser extraído en fases apolares. Todos estos complementados con una evaluación más cuantitativa del contenido de proteína inhibidora y de F_1 en partículas submitocondriales, utilizando la fijación de anticuerpos anti ambas proteínas marcadas con ^{125}I .

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de levaduras.

Se usó la cepa haploide de levadura *Saccharomyces cerevisiae*: D311-3A:a, *lis2*, *trp2*, *his1* que fue crecida primero en viales, conteniendo el siguiente medio: extracto de levadura al 1%, peptona de gelatina al 1%, glucosa al 1% y agar al 2%, se dejaron crecer por 48 horas a 30 °C y se mantuvieron en refrigeración a 4 °C; se realizaron resiembras cada tres meses y se probaron sus marcadores de auxotrofia para comprobar su estado de pureza. En condiciones estériles se tomó un asada de levaduras del vial original y se inoculó en medio líquido en un matraz Erlenmeyer de 300 ml de capacidad conteniendo 50 ml de medio de cultivo previamente esterilizado, conteniendo glucosa al 1%, extracto de levadura al 1% y peptona de gelatina al 1% si la semilla así obtenida va a ser crecida posteriormente en medio de represión, o en glicerol al 4%, extracto de levadura al 1% y peptona de gelatina al 2% si la semilla así obtenida va a ser crecida posteriormente en medio de derrepresión. Los matraces inoculados se colocaron en un agitador giratorio (Gyrotory Shaker New Brunswick Company) a 30 °C y 210 RPM y se dejaron crecer por 16 horas aproximadamente. Transcurrido este tiempo se tomó una muestra en condiciones estériles y se observó al microscopio para descartar posibles contaminaciones. Posteriormente se contaron en una cámara de Neubauer para calcular el número de células. Con la semilla

anterior se sembraron matraces de 2 litros conteniendo 500 ml de medio de cultivo previamente esterilizado al cual se le adicionó un inóculo de 10^6 células por ml de medio de cultivo, que contenía en condiciones de represión: glucosa al 8%, extracto de levadura al 1% y peptona de gelatina al 1% o bien glicerol al 4%, etanol al 3%, extracto de levadura al 1% y peptona de gelatina al 2% como medio de derrepresión. Se dejaron crecer las levaduras en el agitador giratorio a 30°C hasta la fase logarítmica media para las crecidas en medio de represión y fase estacionaria para las crecidas en medio de derrepresión, lo cual se logró a las 16 horas para las primeras y después de 48 horas para las segundas, como se ilustra en las curvas de crecimiento de la fig. 2.

Alcanzada la fase deseada, se tomó una muestra de cada matraz y se observó al microscopio para descartar posibles contaminaciones, los matraces con indicios mínimos de contaminación fueron desechados. Las células se separaron del medio cultivo -- por centrifugación a 3000 RPM (centrífuga CRU 5000 Diamon/IEC Division) durante 10 minutos. Las células sedimentadas se resuspendieron en medio volumen de agua bidestilada fría y se recentrifugaron a 3000 RPM por 10 minutos, este proceso se repitió 2 veces más. El paquete final que contenía las células se mantuvo en refrigeración a 4 °C por un periodo no mayor de una semana.

Aislamiento de mitocondrias.

La obtención de las mitocondrias se efectuó siguiendo el método de B. Guerin y cols. (80) con ligeras modificaciones.

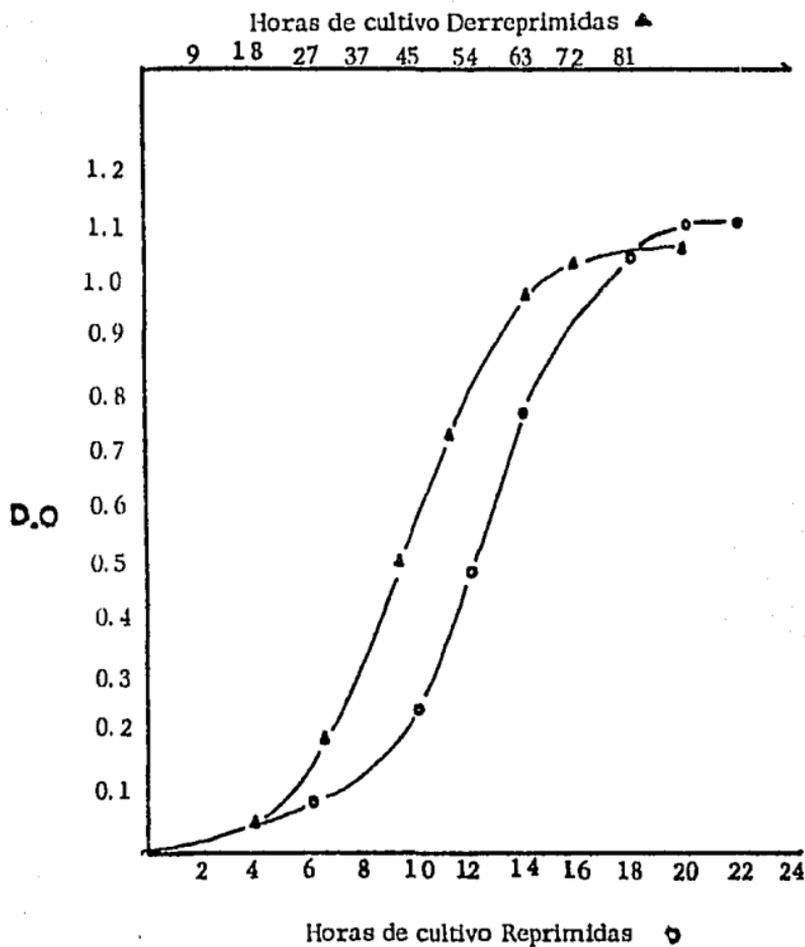


Fig. 2. Curvas de crecimiento de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* cepa D311-3A, cultivadas en condiciones de represión y derrepresión como se describe en material y métodos.

Todos los pasos siguientes se llevaron a cabo a 4 °C.

Ruptura de las células. Las levaduras se resuspendieron en un volumen igual de medio de ruptura(sorbitol 0.65M, EDTA 0.1mM, albúmina al 0.1%, pH 6.5 ajustado con NaOH); 25 ml de la suspensión de levaduras (15 gm de levaduras aproximadamente) se colocaron en un frasco de 75 ml de capacidad del Homogenizador Braun MSK al que se le añadió un volumen igual de perlas de vidrio de 0.45-0.50 mm de diametro, se agitó por 1 minuto en el homogenizador a 3450 RPM aproximadamente, con lo que se obtuvo un 76% de células rotas. El homogeneizado se decantó y las perlas se lavaron 2 veces con 5 ml de medio de ruptura los cuales se adicionaron al homogeneizado. La mezcla se colocó en tubos de centrífuga de 40 ml de capacidad y se centrifugaron a 800 g durante 10 minutos en un rotor SS-34 de la centrífuga Sorvall R C 5B. El paquete que contenía las células no rotas, núcleos y fracciones celulares se descartó y el sobrenadante se recentrifugó por 15 minutos a 6660g. La capa de lípidos que se forma en la superficie se retiró mediante aspiración con bomba de vacío o mediante una servilleta y se descartó el sobrenadante; el paquete que contenía a las mitocondrias se resuspendió en 20 ml de medio de resuspensión(que es igual al medio de ruptura adicionado de Tris-HCl 10 mM pH 6.5). La suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 830g; el paquete se descartó y el sobrenadante se recentrifugó durante 15 minutos a 7500g; el sobrenadante se descartó y el paquete resultante se resuspendió con 20 ml de medio de resuspensión y se centrifugó a 7500g por 15 minutos, el sobrenadante se descartó y el paquete fi

nal que contiene las mitocondrias, se resuspendió en los diferentes medios, dependiendo del experimento a realizarse con las mitocondrias.

Esquema para la obtención de mitocondrias de levadura

células reprimidas o derreprimidas resuspendidas en medio de ruptura más un volumen igual de perlas de vidrio.

agitación 1 minuto a 3450 RPM

homogeneizado colocar en tubos de 40 ml y centrifugar a 800g por 10 minutos.

descartar paquete que contiene células no rotas, núcleos y fracciones celulares.

sobrenadante centrifugar a 6660g por 15 minutos.

paquete contiene mitocondrias resuspender en medio de resuspensión y centrifugar 10 minutos a 830 g.

descartar el sobrenadante

descartar paquete.

sobrenadante centrifugar 15 minutos a 7500g.

paquete contiene mitocondrias resuspender en medio de resuspensión y centrifugar 15 minutos a 7500g.

descartar sobrenadante

paquete contiene mitocondrias puras resuspender en medio apropiado según experimento.

descartar sobrenadante

Obtención de partículas submitocondriales de Magnesio ATP (FSM-MgATP).

Se obtuvieron siguiendo el método de Tzagoloff(65) con pequeñas modificaciones. El paquete de mitocondrias se resuspendió a una concentración de 5 mg de proteína mitocondrial por ml del siguiente medio: sacarosa 0.25M, ATP 3 mM, $MgSO_4$ 3mM y albúmina al 0.1%, pH 7.4 (con NaOH), las mitocondrias así resuspendidas se sonicaron por 30 segundos en un sonicador MSE a la máxima capacidad. El sonicado se centrifugó a 7500g durante 10 minutos, el paquete resultante que contiene mitocondrias no rotas se descartó y el sobrenadante se colocó en tubos de 10 ml de capacidad y se centrifugó por 30 minutos a 105 000g empleando el rotor 50Ti en una Ultracentrifuga Beckman L5-50B; el sobrenadante se descartó y el paquete que contiene las partículas submitocondriales de MgATP se resuspendió en sacarosa 0.25M y acetato de Mg 10 mM a una concentración de 20 mg de proteína por ml.

Medida del consumo de oxígeno y control respiratorio por oximetría.

Se llevó a cabo utilizando un oxímetro YSI modelo 53 provisto de un electrodo tipo Clark y conectado a un registrador HEATH modelo EU-20B.

Para efectuar la medida del consumo de oxígeno las mitocondrias se resuspendieron a una concentración de 50 mg de proteína por ml en el mismo medio de resuspensión. La cubeta del oxímetro contenía 3 ml de medio de respiración (sorbitol 0.65M

EDTA 0.36mM. KH_2PO_4 10mM, Tris-HCl 10mM, KCl 10mM, albúmina sérica sin lípidos al 0.3% y succinato 10mM ajustado a pH 6.5).

La respiración se inició con la adición de 60 μl de la suspensión de mitocondrias (3 mg de proteína mitocondrial) y se registró durante 2 a 3 minutos el consumo de oxígeno correspondiente al estado 4; a continuación se le añadió 10 μl de ADP (100 nmoles) y se registró el estado 3 hasta que se agotó el ADP y regresó nuevamente al estado 4. A los registros obtenidos se les realizaron los siguientes cálculos: control respiratorio, relación P/O y consumo de oxígeno (QO_2).

La cantidad de oxígeno que existe en 3 ml de medio de respiración a 30°C y que es necesario conocer para realizar los cálculos, fue tomada de los datos reportados por R. Estabrpck (81) y equivalen a 400 nanoátomos de O por ml de medio de respiración.

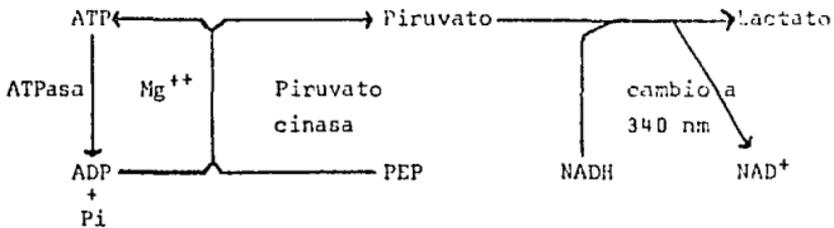
Preparación de partículas submitocondriales de sefadex.

Se prepararon siguiendo el método de Horstman y Racker (82). Se utilizó una columna de sefadex G-50 tipo "coarse" (40 cm X 2.5 cm) equilibrada con el siguiente medio: KCl 250mM, sacarosa 75mM Tris- SO_4 30mM y EDTA 2 mM, ajustado a pH 8. Se colocaron 20 mg de proteína de partículas submitocondriales de MgATP (PSM-MgATP) a los cuales previamente se les determinó actividad de ATPasa. Se eluyó con el medio arriba señalado y el flujo se reguló a 12 gotas por minuto, se colectaron las fracciones que presentaban el color característico de las partículas. El paso de las partículas por la columna tomó aproximadamente 2 horas. Se juntaron las fracciones deseadas y se centrifugaron a 36 000 RPM por 30

minutos en la Ultracentrifuga empleando el rotor 50Ti, el paquete resultante se resuspendió en sacarosa 0.25M y se le determinó proteína y actividad de ATPasa.

Medida de la actividad de ATPasa.

La actividad de ATPasa fue ensayada por dos métodos: colorimétrico midiendo el Pi liberado por la hidrólisis de ATP siguiendo el método de Sumner (83) y espectrofotométricamente siguiendo el método descrito por Pullman y cols.(19), este último se lleva a cabo con un sistema enzimático regenerador de ATP acoplado a la oxidación de NADH medido a 340 nm. La secuencia de reacciones en que se basa este método se esquematiza a continuación:



Se midió utilizando un espectrofotómetro Beckman modelo 35 provisto de registrador en la forma siguiente: en una cubeta de 3 ml se colocaron 2.9 ml de medio de ATPasa(Tris-acetato 25 mM pH 7.4, acetato de potasio 30 mM y acetato de magnesio 3 mM) y se le añadió NADH 0.3mM, fosfoenolpiruvato(PEP) 0.3mM, piruvato cinasa 20 µg, deshidrogenasa láctica 20µg y una cantidad de-

terminada de partículas submitocondriales. La reacción se inició con la adición 30ul de ATP 300mM pH 7.4 (concentración final de 3 mM).

La actividad se calcula como sigue:

$$\text{Actividad Específica} = \frac{\Delta D.0 \times 3}{6.22 \times \text{mg de proteína}}$$

donde: $\Delta D.0$ = cambio de densidad óptica registrado en un minuto

3 = volumen de la cubeta

6.22 = coeficiente de extinción molar del NADH

Determinación de proteína.

La proteína fue determinada por tres métodos: en mitocondrias por diferencia de absorción a 315-325(84), en partículas submitocondriales usando reactivo de Biuret(85) y en otras determinaciones como proteína de anticuerpos siguiendo el método de Lowry(85), en todos los casos el estándar fue albúmina sérica bo vina fracción V.

Obtención de anticuerpos anti-proteína Inhibidora y anti-F₁ de mitocondrias de levadura.

Fueron obtenidos en conejos a los cuales se les inyectó en el dorso 1 mg de antígeno (F₁ purificada de acuerdo a (87) y proteína inhibidora purificada de acuerdo a (35))mezclado con un ml de adyuvante completo de Freund, seguido de 3 inyecciones intravenosas cada 15 días con 100 µg de antígeno en 100µl de solución salina estéril. Una semana después de la última inyección, se obtuvo la sangre por punción cardiaca y se dejó a tem-

peratura ambiente por 30 minutos para que se forme el coágulo, posteriormente se centrifugó a 800g por 10 minutos y el suero resultante (sobrenadante) en el que se encuentran las gamma globulinas se precipitó en frío con sulfato de amonio saturado pH 7.4 a una concentración final de 33%. Las gamma globulinas se separaron por centrifugación a 800g por 10 minutos, el precipitado se resuspendió en solución salina 0.9% y se le determinó proteína. La suspensión se guardó en un congelador REVCO a -40°C en alícuotas de 1 ml hasta ser usadas.

Detección de anticuerpos por doble inmunodifusión.

Se utilizó la técnica de doble inmunodifusión de Ouchterlony (88) en placas de agar-agar al 1% y NaCl al 0.9%. Se colocaron los anticuerpos en el pozo central y en los pozos periféricos se colocaron diferentes concentraciones de antígeno. Una vez observada la inmunoprecipitación aproximadamente en 48 horas, las placas se secaron con un papel filtro Whatman No.5 y posteriormente fueron teñidas con azul de Coomassie al 0.25% en metanol al 30% y ácido acético al 7% durante 30 minutos, se destiñeron con la misma solución pero sin el colorante. La fig. 3 muestra una doble inmuno difusión utilizando anticuerpos anti-Inhibidor de levadura.

Marcaje de anticuerpos con ^{125}I .

Fue realizado siguiendo la técnica del IODOGEN reportada por Philip R.P. Salasinski y cols. (89) y Mary Ann K. Markwell y cols. (90). En un tubo de ensaye se disolvió 1 mg de Iodogen (1,3,4,6 tetracloro 3,6, difenil glicoluril) en 25 ml de cloroformo

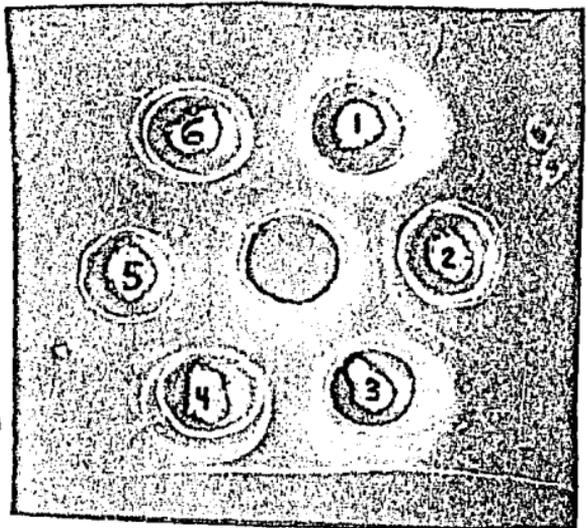
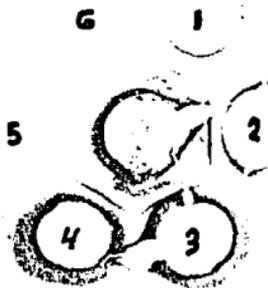


Fig. 3. Inmunodifusión de Gamma Globulinas contra Inhibidor de Levadura. A) el pozo central contenía - 400 μ g de Ac contra inhibidor, los pozos 1 y 2 contenían 50 μ g de inhibidor de levadura, los pozos 3 y 4 contenían partículas submitocondriales (1 mg) de células crecidas en derrepresión y represión respectivamente, solubilizadas con tritón X 100 al 1%. B) el pozo central contenía 1 mg de partículas submitocondriales (solubilizadas) derreprimidas, los pozos 1, 3 y 5 contenían; partículas submitocondriales derreprimidas solubilizadas (1 mg), partículas submitocondriales reprimidas solubilizadas (1 mg) e inhibidor (25 μ g) respectivamente. Los pozos 2, 4 y 6 contenían gamma globulinas contra inhibidor de levadura (400 μ g).

o diclorometano y se distribuyó en alícuotas de 50 μ l en tubos o viales en los que se va a llevar a cabo la yodinación; se evaporó el solvente con nitrógeno gaseoso tratando de que se formara una capa delgada (película) en las paredes del tubo, para que la mezcla de reacción siempre esté en contacto con esta película.

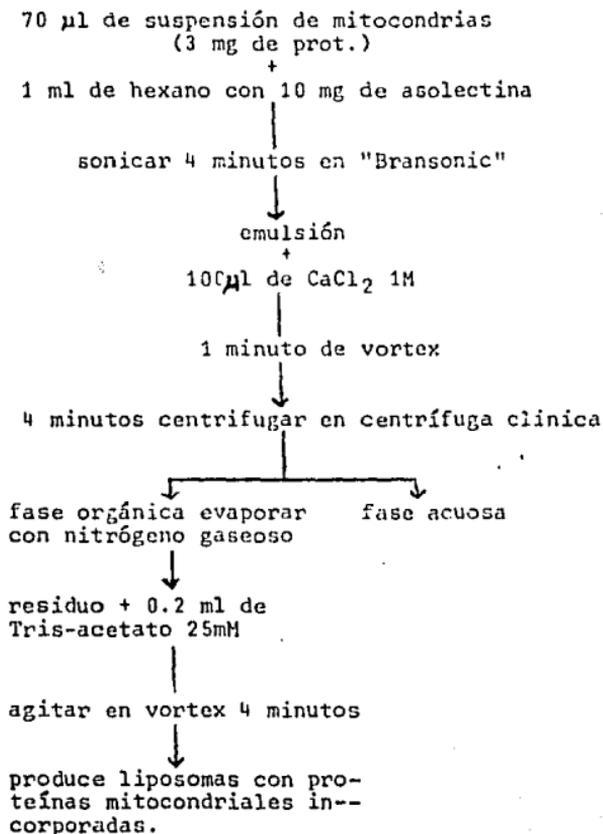
En un tubo preparado con Iodogen se colocaron 5 μ l de --- ^{125}I (0.5 μCi) y se le añadió 5 μ l de HCl 0.1N para neutralizar el NaOH en que se encuentra el ^{125}I , se le añadieron 5 mg de anticuerpos en 300 μ l de solución salina, se agitó para mezclar y se dejó reaccionar por 10 minutos en un baño de hielo bajo una campana de extracción; transcurridos los 10 minutos se pasó la mezcla de reacción por una columna de sefadex G-10 ó G-15 equilibrada con buffer de fosfatos (NaCl 150 mM, Na_2PO_4 15mM a pH 7.4), los anticuerpos marcados se excluyen de las partículas de sefadex y salen en el volumen de exclusión; el ^{125}I salió posteriormente. El proceso de elución se siguió mediante un contador Geiger con el que se pudieron observar dos zonas de radioactividad en la columna, una que sale primero y que corresponde a los anticuerpos marcados y otra retrasada que corresponde al ^{125}I libre. Se recogieron en fracciones de 1 ml y se les determinó proteína; se guardaron congelados en un congelados REVC0 a -40°C .

Extracción de ATPasa de mitocondrias de levadura a hexano e incorporación a liposomas.

Se siguió el método reportado por A. Darzon y A. Gómez-

Puyou(91). Las mitocondrias se resuspendieron en sacarosa 0.25M a una concentración de proteína de 3 mg en 70 μ l. Todos los pasos se llevaron a cabo a 4°C, se colocaron los 70 μ l de la suspensión mitocondrial en el fondo de un tubo de 40 ml de capacidad y se le añadió 1 ml de hexano conteniendo 10 mg de asolectina, se mezclaron y sonicaron por 4 minutos en un sonicador Branson, inmediatamente después se le añadió 0.1ml de CaCl_2 1M y se agitó en el vortex por un minuto. La emulsión se centrifugó por 4 minutos en una centrifuga clinica a la máxima velocidad para separar las dos fases; se obtuvo la fase orgánica y se colocó en otro tubo, el solvente se evaporó con nitrógeno gaseoso tratando de dejar una película en las paredes del fondo del tubo; a este residuo se le añadieron 0.2 ml de Tris-acetato 25mM pH 7.4 y se agitó en el vortex por 4 minutos para formar los liposomas. la fig.4 es un esquema de los pasos seguidos para obtener los liposomas con la ATPasa incluida.

Fig. 4. Pasos seguidos para la obtención de liposomas con la ATPasa incluida.



RESULTADOS

Durante el crecimiento en glucosa se reprime la síntesis de enzimas necesarias para utilizar otras fuentes de carbono diferentes de ésta(92), las causas de esta represión son atribuidas a la presencia de niveles bajos de AMPc, el cual es necesario junto con la proteína CAP para que la RNA polimerasa se una a los sitios pro motores específicos en el DNA(76). Además de la represión de la síntesis de este tipo de enzimas, también hay represión en la síntesis de enzimas implicadas en otras vías metabólicas, incluyendo algunas de la transducción de energía como son: la citocromo oxidasa y la ATPasa(2,93).

Como el objetivo principal de este trabajo es el de estudiar la regulación de la ATPasa por la proteína inhibidora en con diciones de crecimiento de represión y derrepresión catabólica, se consideró conveniente caracterizar algunos parámetros de las mitocondrias que sirvieran de criterio para asegurar que se en encuentran en el estado metabólico requerido.

Ya que durante la represión por glucosa se inhibe la sínte sis de enzimas mitocondriales de la cadena respiratoria, es de es perarse una inhibición en el consumo de oxígeno, control respira torio y ADP/O, como se ilustra en la tabla 3, con datos comparati vos de células crecidas en derrepresión. Se observa en forma sobre saliente el menor consumo de oxígeno en mitocondrias reprimidas, lo cual es indicio de un menor contenido de cadenas respiratorias y sugiere que las levaduras crecidas en glucosa estaban al ser co

Tabla 3. Parámetros Respiratorios en Mitocondrias de levaduras Crecidas en Represión y Derrepresión Catabólica.

Condiciones de de Crecimiento	Control Respiratorio	ADP/O	QO ₂ nanoátomos/mg/hora
Derreprimidas	2	1.5	2280-4680
Reprimidas	1.2	-	720-860

A la cámara de respiración la cual contenía 3 ml de medio de respiración(ver material y métodos) se le agregaron 3 mg de proteína mitocondrial y se registró el consumo de oxígeno(estado 4) durante 3 minutos, posteriormente se le añadió ADP a una concentración final de 0.33mM y se registró el estado 3 hasta que se agotó y regresó nuevamente el estado 4.

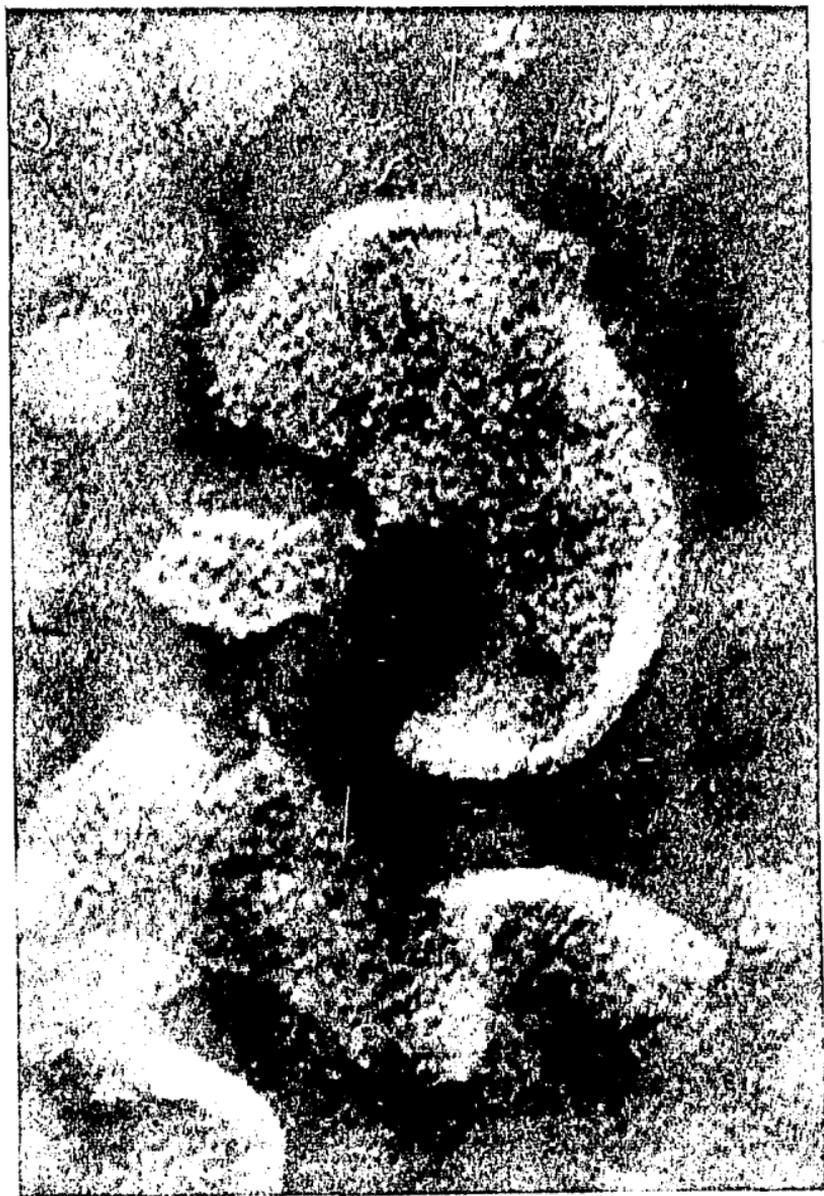
El control respiratorio se calculó midiendo la velocidad de consumo de oxígeno en el estado 4 inicial y el estado 3 inmediato. La relación ADP/O se calculó suponiendo que todo el O₂ consumido mientras se agotó el ADP representa ATP esterificado, este valor no pudo ser calculado para las reprimidas debido a su bajo control respiratorio.

El QO₂ se calculó suponiendo que en los 3 ml de medio de respiración existen 1200 nanoátomos de oxígeno, como fué reportado por R. Estabrook (81).

sechadas en la fase de represión, ya que se ha visto que durante el crecimiento de levaduras en glucosa éstas presentan una curva de crecimiento diaúxico(2), con una fase de crecimiento rápido (tiempo de generación de 2 horas) que es propiamente la fase de represión y es cuando se consume la glucosa, seguida por una fase de adaptación en la que no hay crecimiento y luego una fase de crecimiento lento (tiempo de generación de 6 horas aproximadamente) en la que se consume el etanol producido en la primera fase y que es realmente de derrepresión, ya que se sintetizan la mayoría de las enzimas reprimidas en la primera fase, siendo indistinguible desde este punto de vista de aquellas levaduras crecidas directamente con un substrato no fermentable.

Una característica importante observada en mitocondrias reprimidas, previamente reportada por Tzagoloff(65), es la observación mediante microscopio electrónico con el proceso de tinción negativa, de que las membranas internas de las mitocondrias de levaduras crecidas en represión contienen menos partículas de ATPasa que aquellas crecidas en derrepresión. La fig. 5 muestra micrografías electrónicas de mitocondrias de levaduras crecidas en represión y derrepresión, en las que se puede observar la diferencia de contenido de ATPasa (esferas de 90 Å de Fernández-Morón) en mitocondrias de ambas condiciones, de acuerdo con lo observado por Tzagoloff.

Cuando se inhibe la síntesis proteica mitocondrial con cloranfenicol (100) se ha observado que la F_1 es recuperada en el sobrenadante post-ribosomal, lo que indica que al no ser --



A



B

sintetizado el componente membranal (F_0) del complejo OS-ATPasa, la F_1 no se incorpora a la membrana interna mitocondrial, este fenómeno se observó también durante la represión catabólica. La fig. 6 muestra los resultados de la electroforesis en geles de acrilamida con SDS del sobrenadante post-ribosomal de levaduras crecidas en represión y derrepresión catabólica. Se observa que algunas subunidades de la F_1 se encuentran en mayor abundancia en el sobrenadante post-ribosomal de levaduras reprimidas, si se comparan con el de levaduras derreprimidas. Esto podría indicar que durante la represión se ve más afectada la síntesis de F_0 en las mitocondrias que la F_1 en el citosol, o que se encuentra alterado el mecanismo de incorporación de proteínas a través de las membranas mitocondriales(72).

Los datos anteriores: bajo consumo de oxígeno, control respiratorio y ADF/O, pocas ATPasas en tinción negativa y abundancia de segmentos de F_1 en el sobrenadante post-ribosomal; parecen indicar que las mitocondrias obtenidas durante la represión catabólica tienen las características esperadas si se comparan con las de levaduras crecidas en derrepresión.

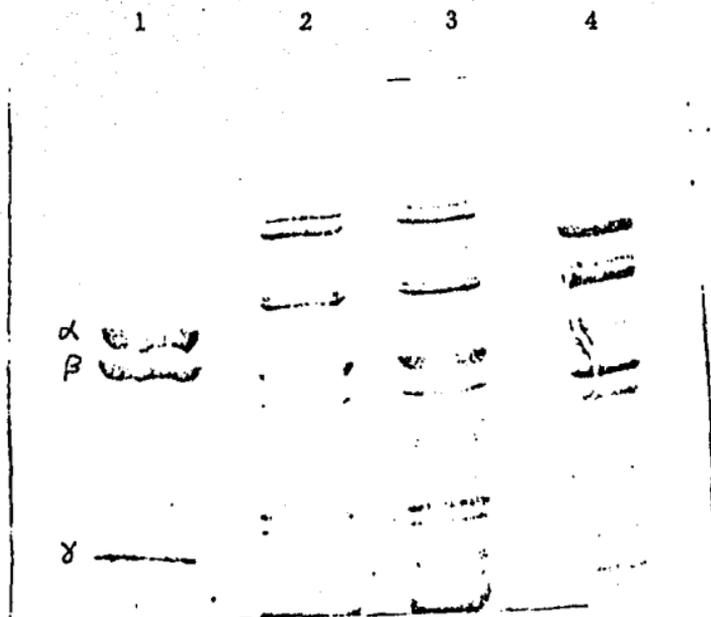


Fig. 6. Electroforesis en Gel de Acrilamida al 10% con SDS. carril 1; 30 μ g de F₁ purificada de levadura, carriles 2 y 3; 50 μ g de sobrenadante post-ribosomal de células reprimidas, carril 4; 50 μ g de sobrenadante postribosomal de células dereprimidas.

Activación de la ATPasa Mitocondrial por el Establecimiento del Gradiente Electroquímico.

Desde que Pullman y Monroy(32) aislaron una proteína de mitocondrias de corazón de res con actividad inhibitoria sobre la actividad de ATPasa, ésta ha sido sujeta de multiples estudios que han sugerido una posible función regulatoria sobre la la ATPasa(94). Entre los muchos enfoques experimentales a que ha sido sometido el inhibidor asociado a la ATPasa, algunos de ellos han producido resultados interesantes: A. Gómez-Fuyou y cols.(95) reportaron que las partículas submitocondriales de MgATP que parecen tener el inhibidor en el sitio inhibitorio, presentaban un retraso en la fase inicial de la síntesis de ATP y que estas mismas partículas, si eran preincubadas con succinato y medida la síntesis de ATP, el retraso desaparecía. Por otra parte si se medía la reacción inversa o de hidrólisis de ATP, presentaban un incremento de la actividad comparadas con aquellas que no eran preincubadas con succinato. Si por otra parte, partículas de estado 3 ó de sefadex a las que se les ha removido el inhibidor de su sitio inhibitorio eran sometidas a un tratamiento idéntico no presentaban la activación. Resultados semejantes fueron obtenidos por D. Harris y A. Crofts en cloroplastos(96). Los resultados anteriores fueron interpretados como debidos al movimiento del inhibidor de su sitio inhibitorio por el establecimiento del potencial electroquímico.

Con base en los resultados anteriormente citados es posible utilizar la activación de la ATPasa por el establecimiento

del potencial electroquímico como un criterio de la presencia de inhibidor en partículas submitocondriales de levaduras crecidas en represión y derrepresión catabólica.

Los resultados de la tabla 4 ilustran el efecto de la generación del gradiente electroquímico sobre la actividad de ATPasa de partículas submitocondriales reprimidas y derreprimidas. Las partículas de células reprimidas presentan una actividad específica menor de ATPasa, debido a la represión catabólica y ésta no es estimulada por la preincubación con succinato en contraste con las partículas de células derreprimidas que se estimularon un 46%.

La posibilidad de que la falta de activación de la ATPasa por el gradiente en las partículas de células reprimidas, se pudiera deber a una menor o nula capacidad de la cadena respiratoria para generarlo, es parcialmente descartada por los trazos mostrados en la fig. 7, en la que se nota que ambas mitocondrias generan un gradiente semejante medido por el método de la safranina(104). Por lo anterior, es posible suponer que el contenido de inhibidor de las partículas de células reprimidas sea menor que en las partículas de células derreprimidas siguiendo este criterio.

Estimulación de la Actividad de ATPasa de PSM MgATP por Calor.

Como la asociación de la proteína inhibidora con la F_1 es fundamentalmente de tipo no covalente, es posible remover el inhibidor del complejo F_1 -inhibidor mediante diferentes tratamientos entre los cuales se encuentra la disociación a temperaturas

Tabla 4. Efecto del Potencial Electroquímico sobre la Actividad de ATPasa en PSM MgATP

Condiciones de Crecimiento	Adición de Succinato	Actividad de ATPasa nmoles Pi $\text{mg}^{-1}\text{min}^{-1}$	Estimulación (%)
Derreprimidas	-	460	46
Derreprimidas	+	670	
Reprimidas	-	126	0
Reprimidas	+	126	

Las partículas fueron preincubadas durante 5 minutos a 30 °C con agitación, a una concentración de 1 mg por ml de sacarosa 0.25 M + succinato 5 mM; al final de los 5 minutos de preincubación se tomó una alícuota de 0.1 ml y se midió actividad de ATPasa espectrofotométricamente siguiendo el procedimiento especificado en -- métodos.

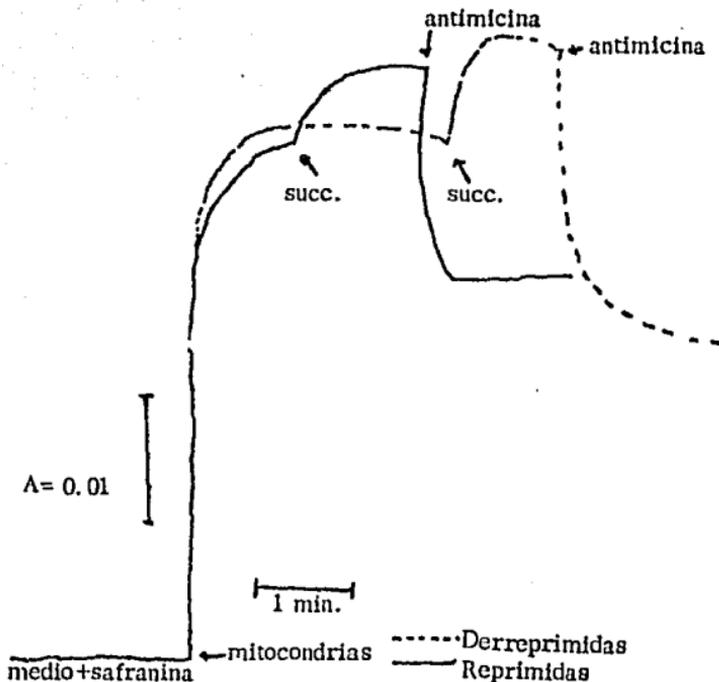


Fig. 7. Medida de la Generación del Gradiente Electroquímico en Mitochondrias de Levaduras Reprimidas y Derreprimidas por el Método de la Safranina. 1 mg de mitochondrias reprimidas o derreprimadas fue añadido a una cubeta de 3 ml la cual contenía 2.9 ml de sacarosa 0.65 M y safranina 16 μ M. El cambio de absorbencia de la safranina a 511/533 fue registrado con un espectrofotómetro de doble haz. En donde se indica se hicieron adiciones de 10 μ l de succinato 0.5 M ó 1 μ g de antimicina.

no desnaturalizantes. Las temperaturas más elevadas desnaturalizan a la F_1 y siendo el inhibidor resistente a ellas(33) este procedimiento ha sido utilizado como un paso en su purificación. Por otro lado se ha reportado (36) que las partículas submitocondriales incubadas a 40°C presentan un incremento de la actividad de ATPasa observada a partir de los 10 minutos de incubación, esto ha sido interpretado como debido a la disociación del inhibidor de la ATPasa con la consecuente activación de ésta.

Las partículas de MgATP de células crecidas en represión y derrepresión fueron sometidas al tratamiento con calor, los resultados obtenidos se ilustran en la fig. 8. Se puede observar que la actividad de ATPasa de partículas de MgATP de células crecidas en derrepresión se estimuló un 100% en los primeros 30 minutos de incubación a 40°C no incrementándose después de este tiempo. Por otra parte, en PSM MgATP de células reprimidas no fué posible observar dicha estimulación de la actividad.

Aparentemente siguiendo este criterio, las partículas de células reprimidas no parecen contener una cantidad importante de proteína inhibidora que contrasta con la notable activación observada en las partículas de células derreprimidas. Después de la activación, la actividad de ambas partículas permanece estable al calor a los tiempos más largos empleados en el experimento.

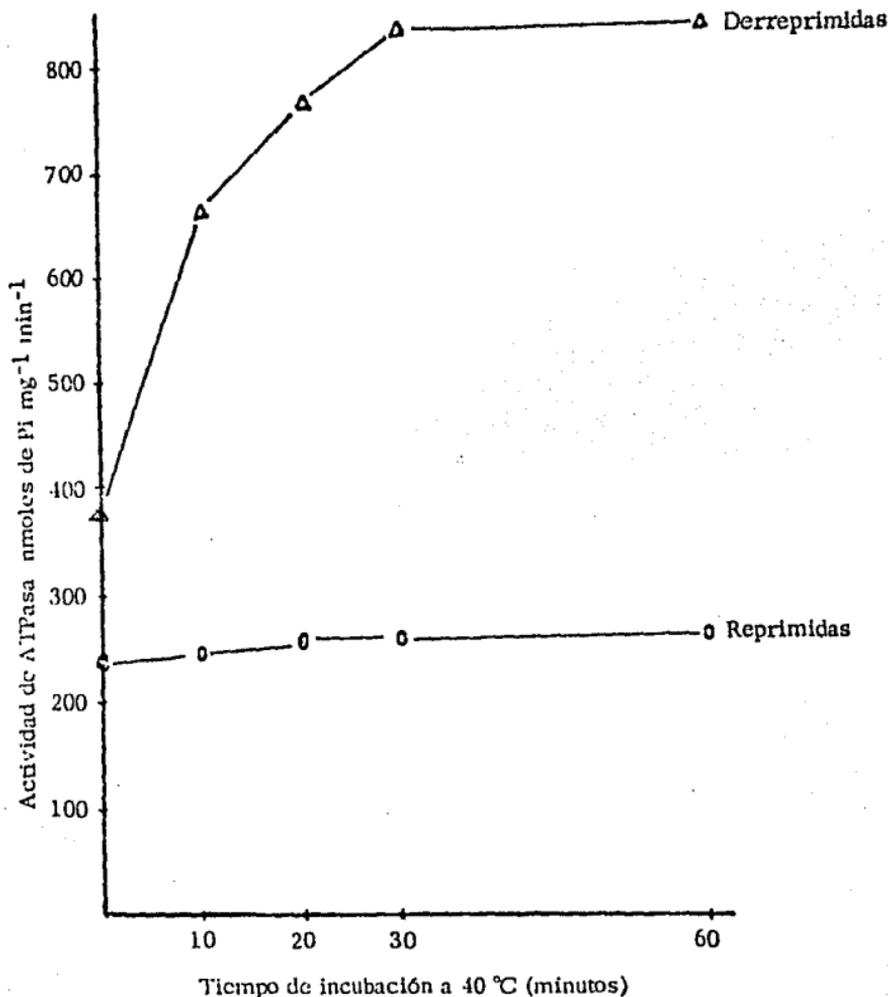


Fig. 8. Estimulación de la Actividad de ATPasa por Calor en PSM MgATP de Células Reprimidas y Derreprimidas. 2 mg de PSM MgATP fueron incubadas en 1 ml de la siguiente solución: tris-acetato 35 mM, ATP 2 mM y EDTA 1 mM, a los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 0.1 ml y se les midió actividad de ATPasa espectrofotométricamente.

Estimulación de la Actividad de ATPasa en PSM MgATP por la Columna de Sefadex.

Ha sido reportado que las partículas de MgATP pasadas a través de una columna de sefadex G-50 presentan una actividad mayor(7) debido a la remoción del inhibidor de la F_1 durante dicho proceso. Tzagoloff(65) encontró que las partículas submitocondriales de levaduras crecidas en represión no presentaban estimulación de la actividad después de ser pasadas por la columna de sefadex. Siguiendo estos criterios se realizaron los experimentos ilustrados en la tabla 5 para inferir si existía diferente contenido de inhibidor en las dos clases de partículas empleadas. Los resultados de la tabla 5 muestran claramente una mayor estimulación de la actividad(10 veces) en las partículas, derreprimidas que en las reprimidas(2.5 veces). La menor, pero existente activación observada en partículas de sefadex de levaduras reprimidas, podría indicar, que en éstas, existe inhibidor en menor cantidad que no ha sido detectado por los otros métodos previamente citados, como la activación por gradiente o por calor y que el método del sefadex, mucho más drástico, sí logra detectar.

Estimulación de la Actividad de ATPasa por Tripsina en PSM MgATP de Levaduras Crecidas en Represión y Derrepresión.

La tripsina es una enzima proteolítica que rompe uniones peptídicas primordialmente donde el grupo carboxilo de la unión es de la lisina o arginina. Esta característica ha sido empleada como una arma para detectar accesibilidad de proteínas en complejos enzimáticos(24).

Tabla 5. Estimulación de la Actividad de ATPasa por el Paso de Partículas de Levaduras Reprimidas y Derreprimidas a Través de una Columna de Sefadex.

Condiciones de Crecimiento	Tratamiento con Sefadex	Actividad de ATPasa nmoles $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$	Estimulación # de veces
Derreprimidas	-	650	10
Derreprimidas	+	6410	
Reprimidas	-	500	2.5
Reprimidas	+	1220	

20 mg de partículas con actividad basal registrada en la tabla fueron pasadas por una columna de Sefadex (como se especifica en material y métodos) y colectadas por centrifugación. La actividad de ATPasa fue medida espectrofotométricamente.

El inhibidor, un polipéptido pequeño, es muy susceptible a la acción hidrolítica de la tripsina (32, 33) y esta susceptibilidad es conservada aún cuando se encuentra unido a la F_1 soluble o particulada (36). Al parecer en estas últimas existe mayor ataque proteolítico del inhibidor que de la F_1 , lo que ocasiona cierta estimulación de la actividad de ATPasa en rangos muy estrechos de concentración de tripsina. Cuando las partículas de MgATP de células crecidas en represión y derrepresión se incubaron con una cantidad fija de tripsina, determinada como adecuada en un experimento anterior, se obtuvieron los resultados ilustrados en la figura 9. En las partículas de células derreprimidas hay un incremento de la actividad que comienza a los 5 minutos y llega a su máximo a los 15 minutos. Durante este mismo tiempo, la actividad de ATPasa de las partículas de células reprimidas no muestra ninguna variación notable y posteriormente decae bruscamente, indicando la hidrólisis de la ATPasa. Es significativa la diferencia de activación en los primeros 15 minutos de incubación, que indicaría la presencia del inhibidor en las partículas derreprimidas. Sin embargo, la resistencia de la F_1 , supuestamente sin inhibidor en las reprimidas, al ataque proteolítico, podría también indicar una menor accesibilidad de ésta en las partículas de células reprimidas que paradójicamente debería ser más atacada debido a su menor concentración ya que la proporción tripsina/ F_1 es mayor, por lo que es posible suponer que en estas condiciones la F_1 se encuentra embebida en la fase hidrofóbica de la membrana y defendida del ataque proteolítico. La proteólisis a tiempos largos procede paralelamente en

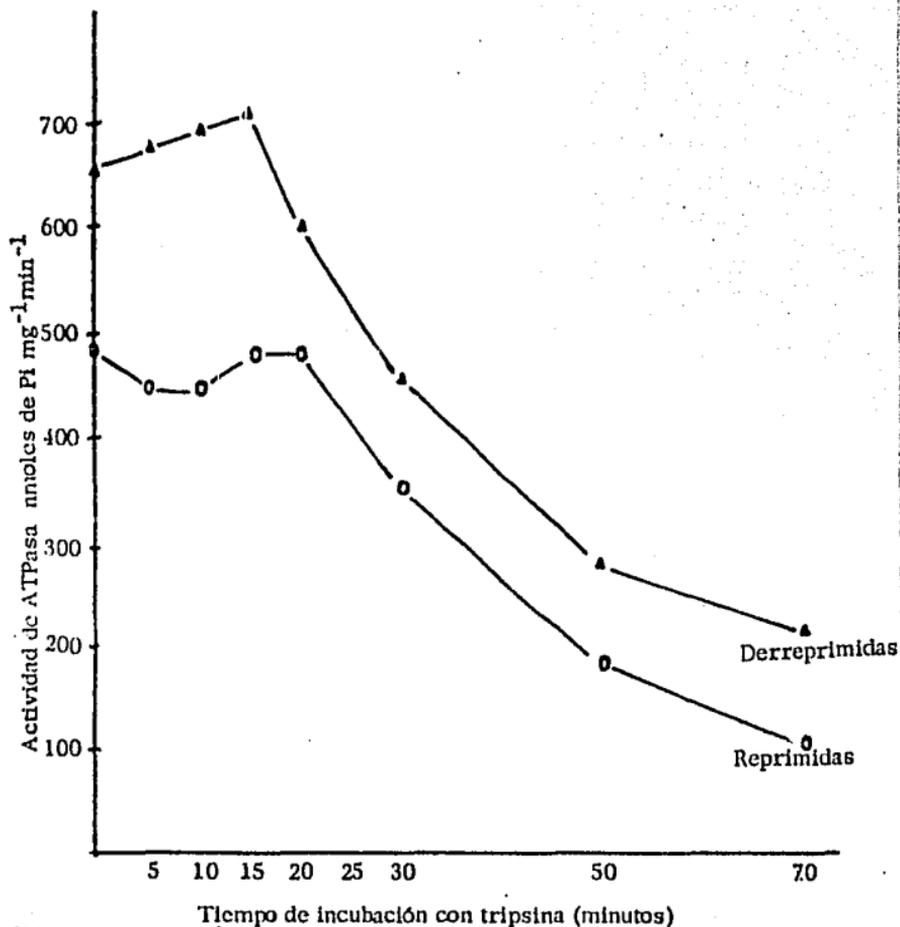


Fig. 9. Estimulación de la Actividad de ATPasa por Tripsina en PSM MgATP de Levaduras Crecidas en Represión y Derrepresión.

2 mg de PSM MgATP se incubaron a 22 °C en un ml del medio siguiente: tris-acetato 35 mM, ATP 2 mM, EDTA 1 mM y 80 µg de tripsina. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 0.1 ml y se les añadió 30 µg de inhibidor de tripsina, inmediatamente después se determinó la actividad de ATPasa colorimétricamente como se especifica en métodos.

ambas partículas mostrando que una vez que ambas han sido expuestas, la actividad degradativa sobre la F_1 es rápida.

Extracción de la ATPasa de Mitocondrias de Levadura a Hexano e Incorporación a Liposomas.

Transferir moléculas proteicas a solventes orgánicos (Ejem. éter) es un método que en bioenergética ha tenido mucha aceptación, principalmente porque algunos de los componentes de los complejos implicados en la transducción de energía tanto en mitocondrias como en cloroplastos y levaduras, son de tipo hidrofóbico y por consiguiente solubles en solventes no polares, siendo relativamente fáciles de extraer y posteriormente incorporar a liposomas para su estudio (97).

Recientemente ha sido reportada la extracción a hexano y éter de la ATPasa de mitocondrias de corazón de res (91), encontrándose que la cantidad de ATPasa que se extrae y posteriormente se incorpora a liposomas, está de alguna manera relacionada con el contenido de proteína inhibidora en su sitio inhibitorio, ya que una vez en el liposoma, la ATPasa presenta una activación en el transcurso del tiempo que sugiere una anictivación del inhibidor (91).

Las mitocondrias de células reprimidas y derreprimidas fueron sometidas a este método de extracción, los resultados se pueden apreciar en la figura 10. Puede verse que hubo una mayor incorporación de ATPasa a liposomas cuando se usaron mitocondrias

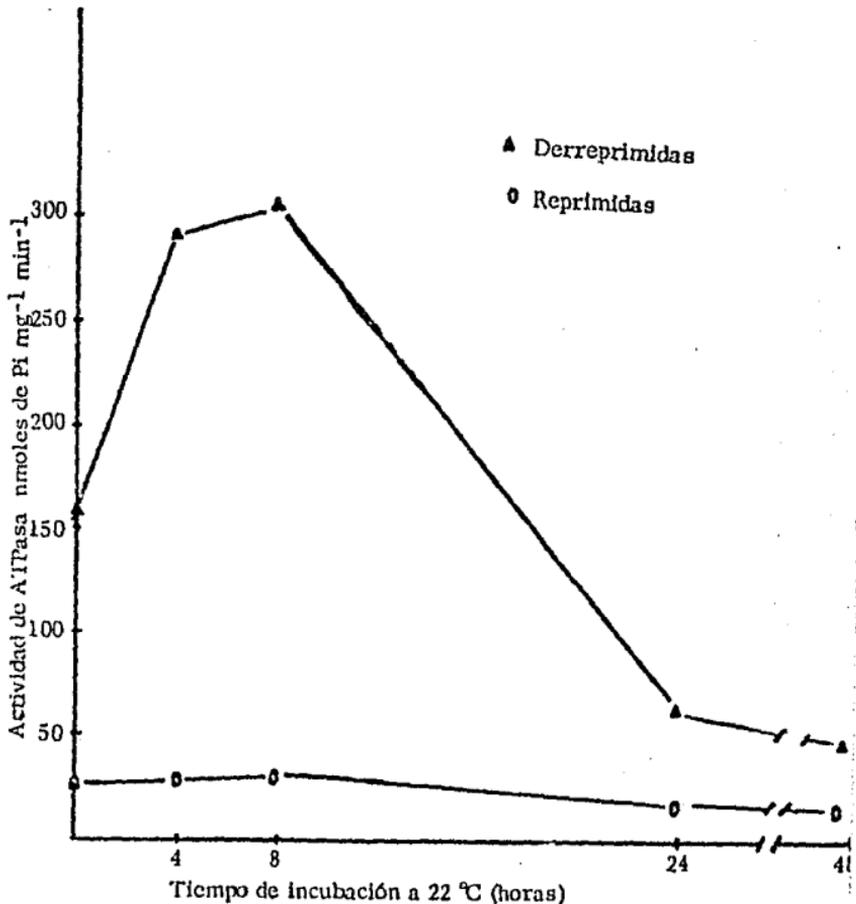


Fig. 10. Extracción de la ATPasa Mitocondrial de Levaduras Reprimidas y Derreprimidas a Hexano e Incorporación a Liposomas. 3 mg de mitocondrias reprimidas y derreprimidas con actividad de 0.26 y 0.42 $\mu\text{moles mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ respectivamente, fueron sometidas al proceso de extracción como se especifica en métodos, los liposomas resultantes fueron incubados a 22 °C por los tiempos indicados en los que se tomaron alícuotas de 30 μl y determinada su actividad espectrofotométricamente.

de células derreprimidas que cuando se usaron reprimidas. Por otra parte, la activación en el transcurso del tiempo fue máxi ma a las 8 horas en las derreprimidas decayendo posteriormente a niveles más bajos que los iniciales, mientras que las reprimidas presentan este efecto apenas perceptible.

No es posible afirmar si en la extracción con solventes orgánicos existe preferencialmente una extracción de ATPasa con teniendo inhibidor sobre las ATPasa libres de éste, sin embargo, los resultados de la figura 10 muestran que a pesar de que la actividad específica de ambas preparaciones de mitocondrias difiere en algún grado; en la extracción a liposomas la diferencia es bastante notable, sugiriendo que la extracción es específica para las ATPasas en complejo con la proteína inhibidora, aunando esto a los experimentos anteriores, éste podría ser el caso.

También debe tomarse en cuenta que en las células reprimidas el contenido de ATPasas en las mitocondrias es menor (microscopía electrónica y curva de titulación de partículas de sefadex con inhibidor exógeno en la figura 12) lo cual explicaría una menor extracción pero no una menor activación, lo cual pudiera probablemente ser debida a un menor contenido de proteína inhibidora en las mitocondrias de células reprimidas.

El hecho de que el complejo F_1 -inhibidor sea más soluble en solventes orgánicos está de acuerdo con la observación de que el complejo es más estable al frío (32); ambos criterios, la extracción a solventes orgánicos y la estabilidad al frío del

complejo podría explicarse aduciendo que el complejo Enzima-Inhibidor tiene mayor hidrofobicidad que la F_1 sin éste.

Inactivación de la ATPasa por Frío.

Cuando la proteína inhibidora fue aislada por Pullman y Monroy (32) además de encontrar que inhibía la actividad de ATPasa se observó que le confería cierta protección a la inactivación por frío. Posteriormente Bruni y col. demostraron este mismo efecto en la F_1 particulada (98) usando diferentes partículas con contenido variable de inhibidor como las de MgATP, sefadex -amonio y EDTA, encontrándose que la inactivación por frío era mayor mientras menos inhibidor tenían las ATPasas de las partículas anteriormente señaladas.

Apoiados en estos experimentos que indicaban que la ATPasa era protegida de la inactivación por el frío, dependiendo del contenido de inhibidor que éstas tuvieran, se diseñaron los experimentos de la tabla 6 utilizando PSM MgATP de levaduras crecidas en represión y derrepresión. Los datos de la tabla 6, confirman en las PSM de levaduras derreprimidadas lo observado en la figura 8, mostrando una activación del 100% por el calor. Y además estables al frío, ya que después del tratamiento a 4°C el calentamiento a 40°C manifiesta la máxima actividad. Por otro lado, si analizamos el comportamiento de las ATPasas de PSMs de levaduras reprimidadas, su sensibilidad al calor es congruente con los resultados de la figura 8 ya que no son activables por calor (0.92-0.96) y son parcialmente sensibles al frío, ya que después del tratamiento a 40°C no se recupera la máxima actividad (0.92-0.57) mostrando que hay heterogeneidad en las enzimas ya

Tabla 6. Inactivación de la ATPasa por Frío

4 mg de PSM en 2 ml del medio siguiente: tris-acetato 35 mM, ATP 2 mM y EDTA 1 mM se le midió la actividad inicial y posteriormente fueron divididas en dos lotes uno de los cuales se incubó a 40 °C por una hora y el otro a 4 °C por 12 horas, al final de cada tiempo se tomó una alícuota y se midió la actividad de ATPasa (columnas 2 y 3 respectivamente), posteriormente se reincubaron en la forma siguiente: las incubadas primero a 40 °C por una hora se reincubaron a 4 °C por 12 horas y las que fueron incubadas a 4 °C ahora se reincubaron a 40 °C por una hora, al final de este tiempo se les midió la actividad de ATPasa (columnas 4 y 5 respectivamente) por el procedimiento espectrofotométrico. $\mu\text{moles de Pi mg}^{-1}\text{min}^{-1}$.

Condiciones de Crecimiento	Actividad Inicial	1 hora a 40 °C	12 horas a 4 °C	1 hora a 40 °C luego 12 hrs. a 4 °C	12 horas a 4 °C luego 1 hr. 40 °C
Derreprimidas	1.2	2.12	1.01	1.10	2.21
Reprimidas	0.92	0.96	0.45	0.19	0.57

que no son como se esperaría totalmente inactivadas por las bajas temperaturas.

Fijación de Anticuerpos Marcados con ^{125}I a PSM MgATP de Levaduras Reprimidas y Derreprimidas.

Los anticuerpos han sido ampliamente utilizados en bioenergética con diferentes enfoques: topología en la membrana o en la enzima soluble de subunidades de la ATPasa (99) o de la citocromo oxidasa, localización del sitio de síntesis de las subunidades de la ATPasa o de la citocromo oxidasa (67, 69), desplazamiento del inhibidor en la ATPasa (101), estequiometría de las subunidades de la ATPasa (102) y otros (103); ésto se debe a la particularidad que tienen los anticuerpos de reaccionar en forma específica con el antígeno que produjo su síntesis. Basados en estos antecedentes decidimos evaluar el contenido de proteína inhibidora y de F_1 en las partículas de células reprimidas y derreprimidas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11, en la que se observa que existe inhibidor en las partículas de las levaduras reprimidas que no pudo ser detectado con los criterios más burdos, en los que solamente la activación con sefadex mostró que existía.

Sin embargo, si se compara el contenido de éste en las levaduras reprimidas tomando en cuenta la fijación de anticuerpos marcados a saturación, el contenido es aproximadamente un 60% del de las partículas derreprimidas, este 60% detectable solo por sefadex y fijación de anticuerpos marcados sugeriría que la proteína inhibidora en las partículas de levaduras reprimidas no se manifiesta funcionalmente, ya que existe pero no parece estar ejerciendo un efecto inhibitorio total, sino parcial, solamente demos

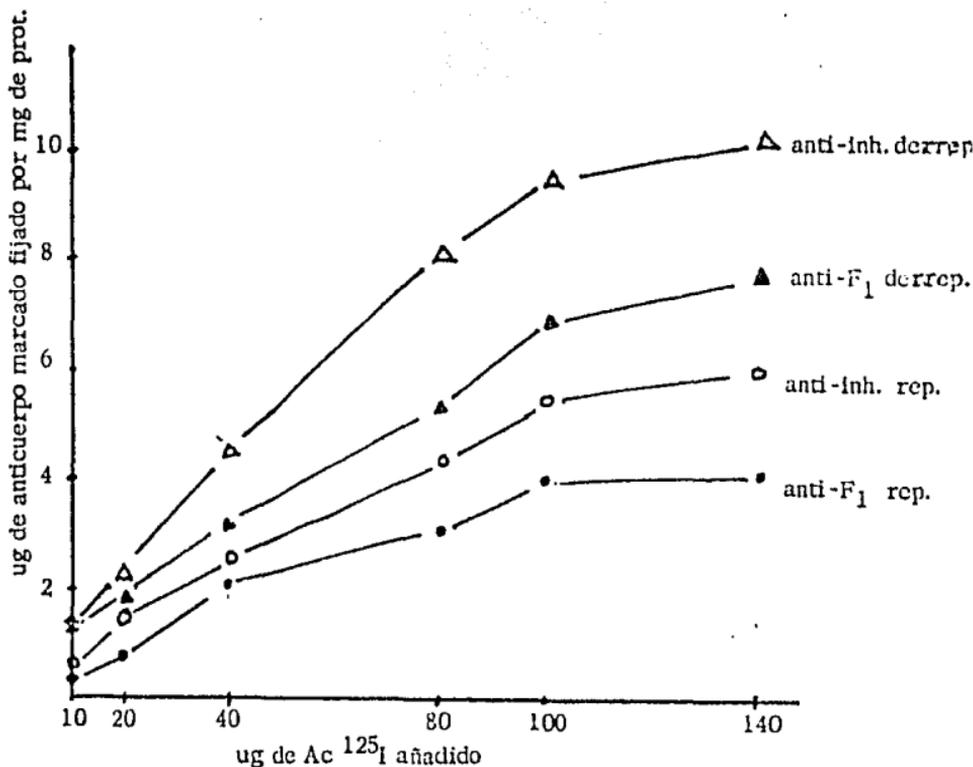


Fig. 11. Fijación de Anticuerpos Anti-F₁ y Anti-Inhibidor Marcados con ^{125}I a Partículas de MgATP de Levaduras Reprimidas y Derreprimidas. La reacción de fijación se llevó a cabo con 1 mg de PSM reprimidas o derreprimidas y la cantidad de anticuerpos señalada en la fig. La fijación inespecífica fue restada con un control con gamma globulinas marcadas o preincubando por 12 horas con gamma globulinas, ambos resultados fueron semejantes.

trable con un tratamiento drástico como es el paso por la columna de sefadex.

Por otro lado el contenido de F_1 en las reprimidas es aproximadamente un 50% del de las derreprimidas, sin embargo las actividades específicas no muestran diferencias del 50% cuando la actividad se midió en condiciones normales; pero cuando la actividad fue medida al máximo (experimento de temperatura) los resultados son congruentes con una disminución de entre el 40% al 70% en condiciones de activación. La variabilidad en el contenido de F_1 puede deberse a diferentes grados de represión, o a que la F_1 medida en las partículas es un promedio de las activas y de las activables en ambos casos.

De cualquier manera los datos parecen indicar que en las condiciones del experimento y tomando en cuenta la posible diferente afinidad de los anticuerpos empleados, la represión catabólica produce represión de ambas proteínas, la F_1 y la proteína inhibidora, lo cual podría indicar que se sintetizan y reprimen coordinadamente como es acorde con una proteína que pertenece al complejo y actúa como un regulador de su actividad.

Titulación de Partículas de Sefadex con Inhibidor Exógeno.

Cuando las partículas de sefadex de ambas condiciones (reprimidas y derreprimidas) fueron tituladas con inhibidor exógeno para medir su efecto inhibitorio, se observaron los resultados que se muestran en la figura 12 en la que vemos que mientras en las derreprimidas se logra inhibir como máximo un 80% con 7 μ g de inhibidor añadido, en las reprimidas con concentraciones tan bajas

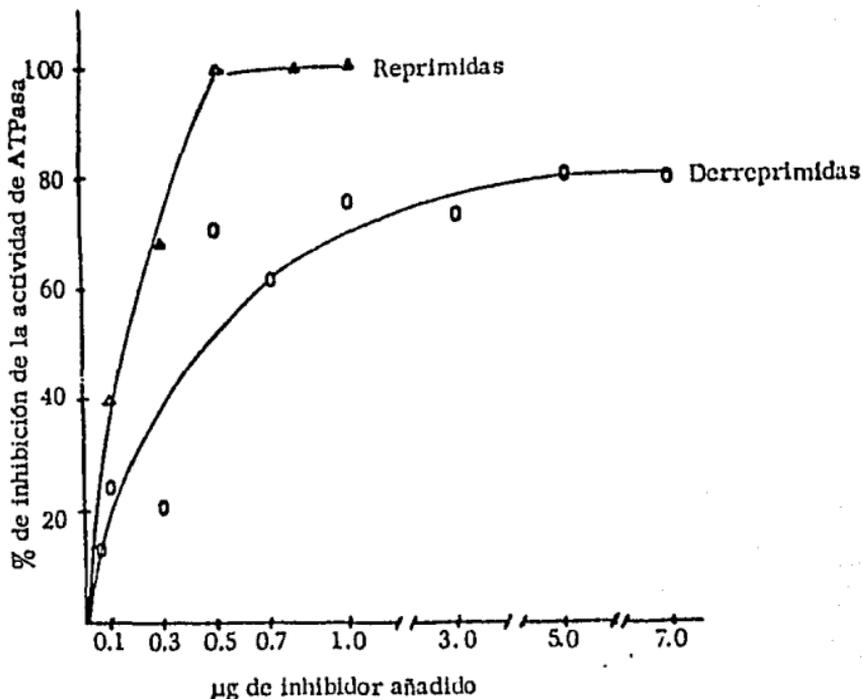


Fig. 12. Titulación con Protefna Inhibidora Exógena de la Actividad de ATPasa en Partículas de Sefadex de Levaduras Reprimidas y Derreprimidas.

La acción de la protefna inhibidora fue determinada incubando las cantidades señaladas de protefna con 50 μg ó 100 μg de partículas submitocondriales de sefadex de levaduras reprimidas y derreprimidas respectivamente, - en 10 μl de tris-MES 10 mM y ATP-Mg 250 μM a pH 6.6 por 10 minutos a 30 $^{\circ}\text{C}$, al cabo de los cuales se tomaron alícuotas para estimar la hidrólisis de ATP por el método colorimétrico.

como 0.5 μg se alcanza el 100% de inhibición. Estos resultados indican que en las partículas de sefadex, consideradas como desprovistas de inhibidor, procedentes de mitocondrias de levaduras reprimidas, tienen un contenido bajo de sitios receptores de proteína inhibidora si se comparan con las partículas de levaduras derreprimidas. Esto está de acuerdo con la observación de un menor contenido de actividad específica de ATPasa y de complejos de Fernández-Morán en la tinción negativa de partículas de levaduras reprimidas, y con el menor contenido de ATPasa detectada por los anticuerpos anti-F₁ marcados en las mismas partículas.

DISCUSION GENERAL Y CONCLUSIONES

Consideramos que en la discusión general es necesario evaluar los diferentes criterios utilizados para deducir el contenido de proteína inhibidora en las preparaciones empleadas, lo que nos permitirá llegar a conclusiones que estén de acuerdo con la mayoría de los resultados obtenidos.

Estimulación de la actividad de ATPasa por el establecimiento de un potencial electroquímico: como mencionamos anteriormente, la estimulación de la actividad de ATPasa de PSM MgATP que han sido preincubadas con un substrato oxidable para generar potencial electroquímico, ha sido interpretado como el resultado de una movilización de la proteína inhibidora de su sitio inhibitorio, por lo que cualquier incremento de la actividad de ATPasa podría significar que ha habido movilización de la proteína inhibidora, mientras que la observación de un resultado negativo podría deberse a varios factores: 1) Las partículas submitocondriales por desacoplamiento o por pérdida de parte de los componentes de la cadena respiratoria son incapaces de generar un potencial electroquímico necesario para que este criterio sea útil como medida de contenido de inhibidor. 2) La proteína inhibidora permanece en el sitio inhibitorio de la ATPasa aún después de aplicado el potencial. 3) Las ATPasas contienen a la proteína inhibidora en un sitio no inhibitorio como lo observado por nosotros en las partículas de estado 3, por lo que aunque exista potencial, éste sea capaz de remover al inhibidor solamente del sitio inhibitorio y esta sea la causa de que no se observe estimulación de la

actividad. 4) Las ATPasas no contienen proteína inhibidora o existe una proporción de las ATPasas que contiene el inhibidor en el sitio no inhibitorio y otras carecen de él.

Los resultados obtenidos siguiendo el criterio de estimulación de la actividad de ATPasa por el establecimiento del potencial electroquímico, mostraron que las PSM MgATP de Levaduras crecidas en represión no se estimularon, mientras que las crecidas en derrepresión se estimularon un 46%. Este hecho interpretado en base a lo anteriormente expuesto, podría sugerir que solamente un porcentaje de las PSM MgATP de células derrepresadas tienen inhibidor en su sitio inhibitorio activable por potencial electroquímico y otro porcentaje lo tiene en el sitio no inhibitorio, ya que observamos una actividad inicial alta debido probablemente a la oxidación de substratos endógenos o a la metodología empleada. Sin embargo, las PSM MgATP de Levaduras reprimidas no presentaron estimulación, a pesar de que las mitocondrias de ambos tipos de células fueron capaces de generar un potencial medido por el método de la safranina. Sin embargo, las posibilidades mencionadas en los incisos 2, 3, 4 y 5 referentes a otras causas por las cuales pudo no haber habido estimulación de la actividad en las PSM MgATP de Levaduras reprimidas, tendrán que ser evaluadas con los criterios posteriores los que nos permitirán discernir cuál de éstas es la verdadera.

Estimulación de la actividad de ATPasa por calor. Los resultados obtenidos con este tratamiento muestran una diferencia clara entre las levaduras reprimidas y derreprimidas lo cual nos permite deducir que las reprimidas parecen no contener inhibidor por lo menos en el sitio inhibitorio. Cabe hacer notar al respecto que Y. Landry y A. Goffeau en PSM de levaduras crecidas en represión por glucosa (36) de Schizosaccharomyces pombe encontraron resultados semejantes a los observados por nosotros, en las que PSM de levaduras crecidas en represión (glucosa 2%) tenían una menor estimulación por calor que aquellas crecidas en derrepresión, pero que si las partículas eran solubilizadas con tritón la diferencia en cuanto al porcentaje de estimulación desaparecía. Los autores explican estos resultados diciendo que la actividad inhibidora del inhibidor es expresada en forma diferente en las membranas de levaduras reprimidas que en aquellas derreprimidas, aunque posiblemente la estimulación por calor que ellos observaron se deba a que usaron glucosa al 2% y las levaduras fueron crecidas por 20 horas, tiempo que pudo ser suficiente para que las levaduras agotaran la glucosa del medio y por consiguiente pudieran haber pasado a una etapa intermedia entre represión y derrepresión, en la que existe síntesis de enzimas reprimidas durante la fase de represión, que algunos autores llaman etapa fermentativa de la derrepresión (2).

Estimulación de la actividad por el paso de las PSM MgATP a través de una columna de sefadex. Los resultados muestran nuevamente una clara diferencia en cuanto al grado de estimulación entre

derreprimidas y reprimidas, aunque en este caso se observa que también las reprimidas se estimulan en menor grado. Si tratamos de interpretar estos resultados de acuerdo con los antecedentes observados en partículas de corazón (datos no publicados) que el tratamiento de las partículas con la columna de sefadex remueve al inhibidor de la ATPasa, estamos obligados a admitir que existe inhibidor en las reprimidas, en menor cantidad a juzgar por el bajo porcentaje de estimulación. Sin embargo, es necesario discutir las razones por las cuales ésto no fue observado con los criterios anteriores, lo cual sugiere que no todos los criterios utilizados aquí, ocasionan el mismo grado de remoción del inhibidor, por lo que también es probable que en el caso de la columna de sefadex no solo se remueva el inhibidor del sitio inhibitorio, sino que éste sea completamente desprendido de la ATPasa. Si el inhibidor aún fuera del sitio inhibitorio es capaz de disminuir la reacción de hidrólisis del ATP, al quitarlo completamente habrá una mayor estimulación de la actividad, esto además explicaría por qué es tan grande la estimulación en las derreprimidas y por qué se estimularon con este tratamiento las reprimidas, las cuales al parecer contienen inhibidor fuera del sitio inhibitorio, ejerciendo aún control parcial sobre la ATPasa que con los otros tratamientos menos drásticos no fue posible detectar.

Estimulación de la actividad por el tratamiento con tripsina.

Los resultados obtenidos con este tratamiento parecer ser los menos demostrativos para defender la hipótesis de un menor contenido de inhibidor en las reprimidas. Sin embargo, si se tiene

en cuenta que la tripsina hidroliza tanto el inhibidor como la ATPasa y por consiguiente la actividad presente en cada tiempo medido es un promedio de aquellas ATPasas que han sido activadas por remoción del inhibidor menos aquellas ATPasas que han sido inactivadas por hidrólisis de la misma, el ligero incremento que se observa en las derreprimidas adquiere entonces cierta importancia, pues indica que hay predominancia de aquellas ATPasas que se están activando por remoción del inhibidor sobre aquellas que se están inactivando por hidrólisis; mientras que en las reprimidas en los primeros 20 minutos hay un equilibrio entre las que se activan y las que se inactivan, ya que la actividad permanece estable y es después de este tiempo en el que hay predominio de las que se están inactivando.

Nuevamente la hidrólisis con tripsina nos muestra la existencia de inhibidor en las reprimidas, que posiblemente esté en un sitio no inhibitorio pero aún ejerciendo cierto efecto sobre la ATPasa, como conferirle protección de la inactivación por tripsina, ya que resultados obtenidos en nuestro laboratorio con partículas de corazón de res pasadas por una columna de sefadex y tratadas con tripsina, se observó una inactivación del 50% en los primeros minutos.

Extracción a solventes orgánicos. Confirmando lo reportado por A. Gómez-Puyou y A. Darzon (91) si la cantidad de ATPasa que se extrae a solventes orgánicos refleja una medida de contenido de inhibidor en el sitio inhibitorio, los resultados obtenidos con este tratamiento en mitocondrias de levaduras reprimidas y

derreprimidas nos indican nuevamente que existe un mayor contenido de inhibidor en las derreprimidas que en las reprimidas. Con respecto a la activación que se observa durante la incubación a 22°C aún es difícil interpretarla solamente en términos de remoción del inhibidor por proteasas, ya que tendrían que ser muy específicas para lograr esta activación, que como se observó con anterioridad el tratamiento con tripsina produjo una activación menor.

Inactivación de la ATPasa por frío. El criterio de inactivación por frío es indudablemente ambiguo ya que existen diferentes factores (Fo, OSCP, inhibidor, metanol, actilguanidina, etc.) que probablemente por un mecanismo común confieren estabilidad de la ATPasa al frío.

Ha sido demostrado (105) que el frío ocasiona en la F₁ soluble disociación de la subunidad α y como consecuencia produce pérdida de la actividad, esta disociación es reversible si el tiempo que se mantiene en frío a la enzima no es mayor de 30 minutos.

Los resultados obtenidos por el tratamiento con frío de FGM de levaduras reprimidas y derreprimidas mostrados en la tabla 6 no tienen una interpretación sencilla ya que es necesario aceptar que, independientemente de la posición del inhibidor (inhibitorio o no inhibitorio) éste parece conferir cierta estabilidad de la ATPasa al frío que impide que se disocie la enzima. Por otra parte es claro que solo aquellas ATPasas que carecen de inhibidor parecen ser desnaturalizadas por el frío y las que

tienen el inhibidor en el sitio inhibitorio parecen ser activadas por el calor.

Si analizamos los resultados de la tabla 6 basados en lo discutido anteriormente, el hecho de que exista una actividad inicial en ambos tipos de partículas, derreprimidas o reprimidas, podría indicar que esta actividad puede deberse a enzimas sin inhibidor o a enzimas con inhibidor en un sitio en el cual aún ejerce acción regulatoria pero ésta no es máxima, como lo observado por nosotros en partículas de estado 3 de mitocondrias de corazón de res.

Las partículas de levadura derreprimidas presentan una actividad inicial que es incrementada un 100% por el calor, mientras que en las reprimidas no existe este incremento, confirmando lo observado en la figura 8, estos resultados sugieren que solo las ATPasas con inhibidor en el sitio inhibitorio son activables por calor. Si las activadas por calor de las levaduras derreprimidas se someten inmediatamente al frío, solamente un 50% de la actividad se pierde. En este caso no es posible saber si la disminución de la actividad se debe a que se re-inhibieron en el frío o se desnaturalizaron, ya que no se hizo la reactivación por calor que hubiera descartado la desnaturalización. Sin embargo el mismo tratamiento en las reprimidas produjo una disminución de la actividad de 80% que de acuerdo con los resultados de los otros criterios podría indicar que se trata de desnaturalización por frío de ATPasa sin inhibidor.

La actividad inicial de las derreprimidas no es afectada por el frío ya que si se someten inmediatamente después al ca--

lor se obtiene una actividad semejante a la obtenida por calor directamente, indicando que la disminución de la actividad por el tratamiento por frío después de haber sido calentadas, se debe a reinhibición y no a desnaturalización, lo cual no sucede con las reprimidas en las que el 50% de ellas son desnaturadas por el frío y no se recupera la actividad inicial por el calor posterior.

En conclusión, es posible con los experimentos de la tabla 6 y los otros criterios, sugerir que el inhibidor en el sitio no inhibitorio puede conferir resistencia al frío y que este tratamiento puede producir reinhibición. Por otro lado, las enzimas sin inhibidor son desnaturalizadas por frío.

Fijación de anticuerpos marcados con ^{125}I anti- F_1 y anti-Inhibidor en partículas de MgATP de levaduras crecidas en represión y derrepresión.

Partiendo de la base de que los anticuerpos contra inhibidor reaccionarán con éste independientemente del sitio que ocupe en la enzima, los resultados obtenidos con estos experimentos demuestran la existencia de inhibidor en las reprimidas, el cual solo había sido inferido por los métodos indirectos de activación por sefadex e inactivación por frío. Sin embargo, es notable la diferencia de anticuerpo anti- F_1 y anti-Inhibidor que se fijó en las reprimidas con respecto a las derrepresadas siendo un 40% menor en el caso del anti-inhibidor y un 50% en el caso de anti- F_1 . Este hecho muestra que en las partículas de levaduras reprimidas existe inhibidor que no se com

porta produciendo la inhibición esperada, sino que las ATPasas de levaduras reprimidas parecen tener el inhibidor fuera del sitio inhibitorio y posiblemente sean por esto más accesibles a los anticuerpos, como ha sido demostrado(101) en las partículas de estado 3 de mitocondrias de corazón de res que tienen el inhibidor en un sitio no inhibitorio y fijan más anticuerpos que aquellas partículas de MgATP que tienen el inhibidor en el sitio inhibitorio.

Por otro lado estos datos nos permiten sugerir basados en que el contenido de inhibidor y de F_1 en las levaduras reprimidas son porcentualmente semejantes, que es posible que ambas proteínas sean sintetizadas en forma coordinada y por lo tanto sujetas a un mismo operón.

Conclusiones.

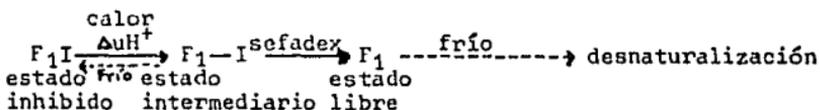
Los resultados discutidos anteriormente nos permiten hacer las siguientes conclusiones:

- 1) La glucosa reprime la síntesis de F_1 y de inhibidor en forma semejante lo que podría indicar que se sintetizan en forma coordinada y sugerirían que forman parte del mismo operón inferido de la fijación de anticuerpos marcados anti- F_1 y anti-Inhibidor.
- 2) La asociación del inhibidor con la F_1 durante la represión es diferente de aquella existente durante la derrepresión, inferido esto, de los resultados obtenidos mediante el tratamiento con calor, columna de sefadex y tratamiento con frío. Esta interacción F_1 -Inhibidor, no se modifica por el calor ni por el gradiente electroquímico, le confiere estabilidad a la

ATPasa al frío y a la digestión por tripsina y es accesible a los anticuerpos.

- 3) En las derreprimidas el inhibidor está en su mayor parte en el estado inhibido ya que son activables por calor y gradiente electroquímico, estos factores llevan al estado intermedio que tiene mayor actividad de ATPasa pero no la máxima, en este estado probablemente estén una parte de las ATPasas de las reprimidas ya que no son activables por calor, por $\Delta \mu H^+$ y no se activan después de la extracción a solventes orgánicos. Del estado intermedio que es accesible a los anticuerpos es posible pasar al estado libre de inhibidor por tratamiento con sefadex, en este estado probablemente estén el resto de las ATPasas de las células reprimidas ya que son inactivadas por el frío.

Nuestros datos podrían resumirse en el siguiente esquema:



Aunque con los resultados obtenidos es posible hacer otras conclusiones sobre todo acerca de los mismos criterios utilizados, creemos que es necesario realizar más experimentos tendientes a clarificar los mecanismos por los cuales se producen los efectos observados. De hecho experimentos que reforzarán las conclusiones arriba anotadas se están planeando para realizarse en un futuro próximo.

BIBLIOGRAFIA

1. Jayaraman, J., Dharnalingam, K. y Muruges, N. (1974) en -
Biomembranes(ed. Packer, L.)75-86, Academic Press, New York
2. Mahler, H. R., Bastos, R. N., Feldman, F., Flur, V., Lin, Ch.
Ch., Perlman, P. S. y Phan, S. H. (1975) en Membrane Biogene -
sis(ed. Tzagoloff, A.) 15-62, Plenum Press, New York.
3. Goffeau, A., Landry, Y., Foury, F. y Briquet, M. (1973) J. Biol.
Chem. 248:7097-7105.
4. Ernster, L. y Kuylenskierna, B. (1970) en Membranes of Mito --
chondria and Chloroplasts (ed. Racker, E.) 172-212, Van Nos --
trand Reinhold, New York.
5. Crane, F. C. y Sun, F. F. (1972) en Electron and Coupled Ener -
gy Transfer in Biological Systems(ed. King, T. E. y Klingenberg
M.) 1B:447-587, Delker, New York.
6. Fernández-Moran, H., Oda, T., Blair, P. V. y Green, D. E. --
(1964) J. Cell. Biol. . . 22:63-100.
7. Racker, E. y Horstman, L. L. (1967) J. Biol. Chem. 242:2547 -
2551.
8. Papa, S., Loruso, M. y Gerrieri, F. (1976) en The Structural -
Basis of Membrane Function (ed. Hatefi, Y. y Ohaniance, L. D.)
215-226, Academic Press, New york.
9. Hatefi, Y., Galante, Y. M., Stiggall, D. L. y Ohaniance, L. D. -
(1976) en The Structural Basis of Membrane Function (ed. Hatefi
Y. y Ohaniance, L. D.) 169-188, Academic Press, New York.

10. Chance, B. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46:967-980.
11. Depierre, W. y Ernster, L. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46:210-262.
12. Hatefi, Y. y Galante, Y.M. (1977) en *The Molecular Biology of Membranes* (ed. Fleischer, S., Hatefi, Y., MacLennan, D.H y Tzagoloff, A.) 163-168, Plenum Press, New York.
13. Capaldi, R.A. (1977) en *The Molecular Biology of Membranes -* (ed. Fleischer, S., Hatefi, Y., MacLennan, D.H. y Tzagoloff, A.) 103-119, Plenum Press, New York.
14. Kagawa, Y. y Racker, E. (1966) *J. Biol. Chem.* 241:2475-2482.
15. Senior, A.E. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 301:249-277.
16. Racker, E., Chien, T.F. y Kandrach, A. (1975) *FEBS. Lett.* 57: 14-18.
17. Sebald, W., Machleidt, W. y Wachter, E. (1980) *Proc. Natl. — Acad. Sci. USA.* 77:785-789.
18. Sebald, W. y Hoppe, J. (1981) *Curr. Top. Bioenerg.* 12:1-64.
19. Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. y Racker, E. (1960) *J. Biol. Chem.* 235:3322-3329.
20. Tzagoloff, A. (1969) *J. Biol. Chem.* 244:5020-5026.
21. Penefsky, H.S. (1979) *Methods in Enzymology*, 55F:304-308.
22. Penefsky, H.S., Pullman, M.E., Datta, A. y Racker, E. (1960) *J. Biol. Chem.* 235:3330-3336.
23. Robbins, A., Wong, S., Hatefi, Y. y Galante, Y.M. (1981) *Arch Biochem. Biophys.* 210:489-497.

24. Todd, R.D. y Douglas, M.G. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:6990-6994
25. Todd, R.D. y Douglas, M. G. (1981) *J. Biol. Chem.* 256:6984-6989
26. Amzel, L.M. y Pedersen, P.L. (1919) *J. Biol. Chem.* 253:2067-2069.
27. Kagawa, Y., Sone, N., Hirata, H. y Yoshida, M. (1979) *J. Bio - energ. Biomemb.* 11:39-78.
28. Wagenvoord, R. J., Vander Kraan, I. y Kenn, A. (1977) *Biochim Biophys. Acta*, 460:17-24.
29. Esch, F. S. y Allison, W. S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253:6100-6106
30. Penefsky, H.S. (1979) *Adv. in Prot. Chem.* 49:223-276.
31. Penefsky, H.S., Garret, N.E. y Chan, T. (1976) en *The Struc - tural Basis of Membrane Function*(ed. Hatefi, Y. y Ohaniance, L. D.)69-79, Academic Press, New York.
32. Pullman, M. E. y Monroy, G. (1963) *J. Biol. Chem.* 238:3762-3769
33. Satre, M., Jerphanion, M. B., Huet, J. y Vignais, P.V. (1975) - *Biochim. Biophys. Acta*, 387:241-255.
34. Citron, N.M. y Pedersen, P.L. (1979) *J. Biol. Chem.* 254:3439-3443.
35. Ebner, E. y Maier, K.L. (1977) *J. Biol. Chem.* 252:671-676.
36. Landry, Y. y Goffeau, A. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 376: 470-484.
37. Klein, G., Satre, M., Dianoux, A.C. y Vignais, P.V. (1980) *Biochemistry*, 19:2919-2925.
38. Matsubara, H., Hase, T., Hashimoto, T. y Tagawa, K. (1981) *J. Biochem.* 90:1159-1165.

39. Fraglione, B., Rosenwasser, E., Penefsky, H.S. y Pullman, M. E. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:7403-7407.
40. Slater, E. C. (1953) Nature, 172:975-978.
41. Racker, E. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46:1006-1014.
42. Mitchell, P. (1961) Nature, 191:144-148.
43. Jadendorf, A.T. y Uribe, E. (1966) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55:170-177.
44. Racker, E. y Stoeckenius, W. (1974) J. Biol. Chem. 249:662-663.
45. Godnot, C., Blanchy, B., Coulet, R.R. y Gautheron, D. C. - (1978) en Frontiers of Biological Energetics(ed. Dutton, P. L., Leigh, J.S. y Scarpa, A.) 1:459-466, Academic Press, New York
46. Mitchell, P. (1976) J. Theor. Biol. 62:327-367.
47. Tuena de Gómez-Puyou, M., Gavilanes, M., Gómez-Puyou, A. y Ernster, L. (1980) Biochim. Biophys. Acta. 592:396-405.
48. Mitchell, P. (1972) J. Bioenerg. 3:5-24.
49. Ferguson, S. J. y Sorgato, M.C. (1982) Ann. Rev. Biochem. 51: 185-217.
50. Felle, H., Porter, J.S., Slayman, C. L. y Kaback, H. R. (1980) Biochemistry, 19:3585-3590.
51. Tedeschi, H. (1980) Biol. Rev. 55:171-206.
52. Azzone, G. F., Poza, T., Virgilio, F. Di. y Micon, V. (1978) en Frontiers of Biological Energetics(ed. Dutton, P. L., Leigh, J. S. y Scarpa, A.) 1:375-383, Academic Press, New York.
53. Mitchel, P. y Moyle, J. (1978) en Frontiers of Biological Energetics

- (ed. Dutton, P. L., Leigh, J.S. y Scarpa, A.) 1:342-350, Academic Press, New York.
54. Wikstrom, M. y Krab, K. (1978) en *Frontiers of Biological Energetics*(ed. Dutton, P. L., Leigh, J.S. y Scarpa, A.) 1:351-358 Academic Press, New York.
 55. Papa, S., Guerrieri, F., Lorusso, M., Capuano, F., Izzo, G. y Boffoli, D. (1978) en *Frontiers of Biological Energetics*(ed. Dutton, P. L., Leigh, J.S. y Scarpa, A.) 1:367-374, Academic Press, - New York.
 56. Williams, R. J. P. (1961) *J. Theor. Biol.* 1: 1-17.
 57. Ort, D. R., Dilley, R. A. y Good, N. E. (1976) *Biochim. Biophys. Acta.* 449:108-124.
 58. Boyer, P. D. (1965) en *Oxidases and related Redox Systems*(ed. King, T.E., Mason, H. S. y Morrison, M.) 2:994-1008, Wiley, New York.
 59. Hutton, R. L., Hackney, D. D. y Boyer, P. D. (1978) en *Frontiers of Biological Energetics* (ed. Dutton, P. L., Leigh, J. S. y Scarpa, A.) 1:494-503, Academic Press, New York.
 60. Rosing, J., Kayalar, C. y Boyer, P.D. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 2478-2485.
 61. Mitchell, P. (1974) *FEBS. Lett.* 43:189-194.
 62. Boyer, P. D. (1977) *Ann. Rev. Biochem.* 46:957-966.
 63. Schatz, G. y Mason, T. L. (1974) *Ann. Rev. Biochem.* 43:51-87.
 64. Borst, P. (1972) *Ann. Rev. Biochem.* 41:333-
 65. Tzagoloff, A. (1969) *J. Biol. Chem.* 244:5027-5033.

66. Tzagoloff, A. (1970) *J. Biol. Chem.* 245:1545-1551.
67. Tzagoloff, A. y Meagher, P. (1972) *J. Biol. Chem.* 247:594-603.
68. Jong, L. D., Holtrop, M. y Kroon, A. M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta.* 606:331-337.
69. Mason, T. L. y Schatz, G. (1973) *J. Biol. Chem.* 248:1355-1368.
70. Weis, H., Schward, A. D. y Werner, S. (1975) en *Membrane Biogenesis*(ed. Tzagoloff, A.) 125-153, Plenum Press, New York.
71. Schleyer, M., Schmidt, B. y Neupert, W. (1982) *Eur. J. Biochem.* 125:109-116.
72. Gasser, S. M., Ohashi, A., Daum, G., Bohni, P. C., Gibson, J., Reid, G. A., Yonctani, T. y Schatz, G. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:267-271.
73. Adcs, I. Z. y Butow, R. A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:9925-9935.
74. Adcs, I. Z. y Butow, R. A. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:9918-9924.
75. Butow, R. A., Bennet, W.F., Finkelstein, D. R. y Kellems, R.E. (1975) en *Membrane Biogenesis*(ed. Tzagoloff, A.) 155-199, Plenum Press, New York.
76. Stent, S. G. y Calendar, R. (1978) en *Molecular Genetics* 2a. ed. 684-686, W. H. Freeman, San Francisco.
77. Somasundaram, T., Chandrasekaran, K., Jayaraman, J. y Rajamannickan, C. (1980) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 92:655-661.
78. Takeda, M. (1981) *Biochem. J.* 198:281-287.
79. Kanazawa, H. y Futai, M. (1982) en *Conference on Transport ATP-ases ABSTRACTS* pag. 5.
80. Guerin, B., Labbe, P. y Somlo, M. (1979) en *Methods in Enzymol.*

- (ed. Fleischer, S. y Packer, L.) 55F:149-160, Academic Press, New York.
81. Estabrook, R. W. (1967) en *Methods in Enzymol.* (ed. Estabrook, R. W. y Pullman, M. E.) 10:41-47, Academic Press, New York.
 82. Racker, E. y Horstman, L. L. (1967) *J. Biol. Chem.* 242:2547-2551.
 83. Summner, J. B. (1944) *Science*, 100:413-415.
 84. Murphy, J. B. y Kles, M. W. (1960) *Biochim. Biophys. Acta.* 45:382-
 85. Jacobs, E. E., Jacob, M., Sanadi, D. R. y Bradley, L. B. (1956) *J. Biol. Chem.* 223:147-
 86. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
 87. Takeshige, K., Hess, B., Bohm, M., Zimmermann, N. Telschow, H. (1976) *Z. Physiol. Chem.* 357:1605-1622.
 88. Ludwig, B. y Capaldi, R. A. (1979) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 87:1159-1167.
 89. Salacinski, P. R. P., Mclean, Ch., Sykes, J. E. C., Clement-Jones V. V. y Lowey, P. S. (1981) *Anal. Biochem.* 117:136-146.
 90. Markwell, M. A. K. y Fox, C. F. (1978) *Biochemistry*, 17:4807-4817.
 91. Darzon, A. y Gómez-Puyou, A. (1981) *Eur. J. Biochem.* 121:427-433.

92. Goldberger, R. F. (1979) en Biological Regulation and Development 1:13-14, Plenum Press, New York.
93. Schatz, G. (1968) J. Biol. Chem. 243:2192-
94. Asami, K., Juntti, K. y Ernster, L. (1980) Biochim. Biophys. - Acta. 205:307-311.
95. Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puoyu, M. y Ernster, L. - (1979) Biochim. Biophys. Acta. 547:252-257.
96. Harris, D. A. y Crofts, A. R. (1978) Biochim. Biophys. Acta. - 502:87-102.
97. Célis, H. (1980) Biochim. Biophys. Res. Commun. 92:26-31.
98. Brunl, A., Frigeri, L. y Bigon, E. (1977) Biochim. Biophys. Acta 462:323-333.
99. Todd, R. D., Buck, M. A. y Douglas, M. G. (1981) J. Biol Chem. 256:9037-9043.
100. Tzagoloff, A., Akai, A. y Sierra, M. F. (1972) J. Biol. Chem. 247:6511-6516.
101. Dreyfus, G., Gómez-Puyou, A. y Tuena de Gómez-Puyou, M. - (1981) Biochim. Biophys. Res. Commun. 100:400-406.
102. Todd, R. D., Griesenbeck, T. A. y Douglas, M. G. (1980) - J. Biol. Chem. 255:5461-5467.
103. Somasundaram, T. y Jayaraman, J. (1981) Biochemistry, 20:5373-5380.
104. Harris, E. J. y Baum, H. (1980) Blochem. J. 192:551-557.
105. Begusch, H. y Hess, B. (1979) FEBS. Lett. 108:249-256.

106. Senior, A. E. (1973) Biochim. Biophys. Acta, 301:249-277.
107. Tzagoloff, A. y Meagher, P. (1971) J. Biol. Chem. 246:
7328-7336.
- 108 Rottenber, H. (1979) en Methods in Enzymology
55:F 547-586