

11261  
201  
3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

"UTILIZACION DE SOLVENTES ORGANICOS PARA LA EXTRACCION DE PROTEINAS DE  
MEMBRANA. ESTUDIO DE SU TERMOESTABILIDAD EN EL SOLVENTE".

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(Biología Molecular)

PRESENTA LA BIOLOGA:

GUADALUPE AYALA AGUILAR

---

México, D.F.

1987

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## RESUMEN

Es posible extraer a solventes orgánicos con bajo contenido de agua enzimas membranales a partir de membranas biológicas aisladas en un sistema que contiene fosfolípidos. Utilizando este sistema se estudiaron tres enzimas de la membrana interna mitocondrial: la ATPasa, la citocromo oxidasa y la succinato deshidrogenasa. Estas enzimas se extrajeron hacia hexano en un estado activo; las actividades extraídas dependieron cuantitativamente de la cantidad de proteína a partir de la cual se inició la extracción, la concentración de fosfolípidos y el catión empleado. En todas las condiciones la citocromo oxidasa se extrajo en mayor proporción y su actividad específica fue mayor en el extracto orgánico. Los valores de succinato deshidrogenasa y ATPasa fueron bajos, pero sus actividades específicas fueron similares a aquellas del material original. Lo anterior indica que algunas proteínas se extraen preferencialmente hacia el solvente orgánico en un estado funcional. Las enzimas fueron estables en el solvente orgánico; un mes después de estar en el hexano a 4°C algunas de ellas perdieron menos del 50% de su actividad inicial.

También se estudió la estabilidad de la ATPasa y citocromo oxidasa en tolueno a diferentes temperaturas y diferentes contenidos de agua, a 70°C y una concentración inicial de agua de 13 ul/ml de solvente orgánico, la vida media de la citocromo oxidasa fue aproximadamente de 100 segundos. La termoestabilidad de la citocromo oxidasa se pudo incrementar casi 100 veces disminuyendo la concentración de agua a 3 ul/ml de tolueno. A esta concentración de agua la vida media de la ATPasa a 90°, 80° y 70°C fue de 5, 48 y 96 hrs. respectivamente.

## SUMMARY

Organics apolar solvents with surfactants can be used to extract proteins from isolated biological membranes. Using this system, three enzymes of the inner mitochondrial membrane have been studied: succinate dehydrogenase, ATPase and cytochrome oxidase. These enzymes were transferred into hexane in a functional state, however, the activities extracted varied quantitatively depending on amount of protein in the starting preparation, the concentration of phospholipids and the cation employed, In all conditions cytochrome oxidase extracted with highest yield and specific activity, it was actually enriched in organic extract. The values for succinate dehydrogenase and ATPase were lower, but their specific activities were similar to those of starting material. This indicates that some membrane proteins are preferentially extracted into organic solvents in a functional state. The enzymes, as protein-lipid complexes, are fairly stable in organic solvents; in a month of storage at 4°C in hexane some enzymes lost less than 50% of their activity.

The ATPase and cytochrome oxidase were transferred into tolueno as protein-lipid complex. At 70°C and an initial water concentration of 13 ul per ml toluene, the half-life of the ATPase was approx. 11 hr., whereas that of cytochrome oxidase was about 100s. Thermostability of cytochrome oxidase could be increased more than 100-times by decreasing the water concentration to 3 ul per ml toluene. At this latter concentration of water the half-life of the ATPase at 90°, 80° and 70°C was 5, 48, and 96 h., respectively.

## INDICE

### I. Introducción

1) Antecedentes.....	1
2) Solubilización de Proteínas	
en Solventes Orgánicos.....	5
3) Factores que constituyen el	
Sistema Solubilizado.....	6
a) Tensoactivo.....	6
b) Proteínas.....	7
c) Agua .....	8
d) Cationes .....	9
4) Propiedades de las Enzimas	
en Solventes Orgánicos .....	9

II. Metodología .....	11
-----------------------	----

III. Discusión .....	15
----------------------	----

IV. Bibliografía General .....	23
--------------------------------	----

## I. INTRODUCCION.

### 1. Antecedentes.

Gran parte de la información que se tiene acerca de las proteínas, entre ellas las enzimas, se ha obtenido de proteínas solubles o proteínas de membrana que se han solubilizado y purificado. Mientras que las proteínas solubles se han estudiado principalmente en medios acuosos, las proteínas de membrana se han caracterizado en presencia de detergentes. Por otro lado, el análisis de complejos multienzimáticos, también se han realizado utilizando enzimas purificadas, tal es el caso de las vías metabólicas de la glucólisis y ciclo de las pentosas, que se han reconstituido in vitro a partir de sus componentes purificados. A su vez, para la reconstitución de los complejos multienzimáticos embebidos en una membrana como los responsables de llevar a cabo la fosforilación oxidativa y fosforilación fotosintética, se requiere de la estructura de una membrana. Este hecho, muestra que las interacciones fisicoquímicas dadas por el ambiente hidrofóbico o hidrofílico en el que se encuentran los diferentes componentes de una vía, repercuten en la adopción de una estructura tridimensional particular que define la actividad biológica de dichos componentes. Debido a esto resulta indispensable introducir nuevas metodologías en el estudio de la estructura y función de las proteínas, que simulen las condiciones fisicoquímicas que existen en la célula. Así por ejemplo, para el estudio de proteínas o sistemas multienzimáticos embebidos en una membrana, se requiere encontrar condiciones similares a las de la membrana celular. Los estudios sobre sistemas modelo de membrana realizados por Muller y Rudin (2) en 1962 y por Bangham en 1965 (42) dieron la pauta para la

utilización de membranas artificiales de lípidos en el estudio de las funciones de proteínas. En el caso de péptidos pequeños y antibióticos la incorporación de éstos a una membrana modelo no presenta muchas dificultades. Sin embargo, en los estudios de reconstitución de bicapas planas en los que se requería la incorporación de proteínas de mayor peso molecular, se presentaron algunos obstáculos. Una descripción de diferentes métodos para la incorporación de proteínas de membrana a bicapas de lípido fue hecha por Montal y colaboradores (1). Algunas de las metodologías que se describen requerían de la transferencia de proteínas a solventes orgánicos.

El tratamiento de material biológico con solventes orgánicos se inició con los trabajos de Folch:Lee (4) quienes solubilizaron complejos lípo-proteicos que existían naturalmente en algunas membranas biológicas. Estos complejos a los que se les llamó "proteolípidos" eran insolubles en agua pero solubles en una mezcla de cloroformo metanol. Los proteolípidos se han encontrado en las membranas de plantas, animales y bacterias (5), y son más abundantes en la vaina de mielina que recubre las neuronas. Por otro lado, Das y Crane (6) formaron complejos de fosfolípidos y citocromo c y encontraron que éstos se podían solubilizar en solventes orgánicos.

Los estudios que estaban realizando Montal y colaboradores (10), con el objeto de incorporar proteínas a bicapas de lípidos, los condujo a utilizar los principios de las metodologías mencionadas antes. Ellos siguieron principalmente la metodología descrita por Das y Crane (6) para incorporar la citocromo oxidasa purificada a bicapas de lípidos.

Para que las proteínas pudieran ser solubilizadas en solventes orgánicos; se pensaba que se requería que estas presentaran propiedades de solubilidad similares a las de los lípidos, como sucede con los proteolípidos. Entonces para conseguir la solubilización se pensó que se tenían que formar complejos lipo-proteicos, ya que lípidos y proteínas interaccionan electrostáticamente entre sí (1). Los primeros trabajos que se realizaron utilizando esta metodología muestran que la transferencia de complejos lipo-proteicos a solventes orgánicos se favorecía acidificando la fase acuosa o adicionando cationes. Esto aparentemente se debía a que los fosfolípidos acídicos forman pares iónicos con las cargas positivas de las proteínas. Las cargas negativas restantes eran neutralizadas por cationes o en su defecto por protones. En un principio se pensó que sólo en estas condiciones sería posible la transferencia de complejos lipo-proteicos a solventes orgánicos. Sin embargo, actualmente se han publicado un gran número de trabajos en los que se reporta la solubilización de proteínas en solventes orgánicos utilizando detergentes sintéticos (15). El grupo de Luisi (14), logró solubilizar la  $\alpha$ -quimotripsina en n-ciclohexano utilizando tensoactivos catiónicos. En estas condiciones no se detectaron alteraciones en el espectro de absorción de la enzima. Por lo tanto, además de los fosfolípidos (que son tensoactivos naturales) se pueden utilizar una gran variedad de tensoactivos sintéticos.

La aplicación de esta metodología ha sido bastante amplia -si se toma en cuenta que para 1983 alrededor de 45 enzimas se habían solubilizado en solventes orgánicos- sin embargo, aún resta mucho por conocer sobre el mecanismo que permite la solubilización de proteínas a solventes orgánicos. Actualmente se piensa que la solubilización de



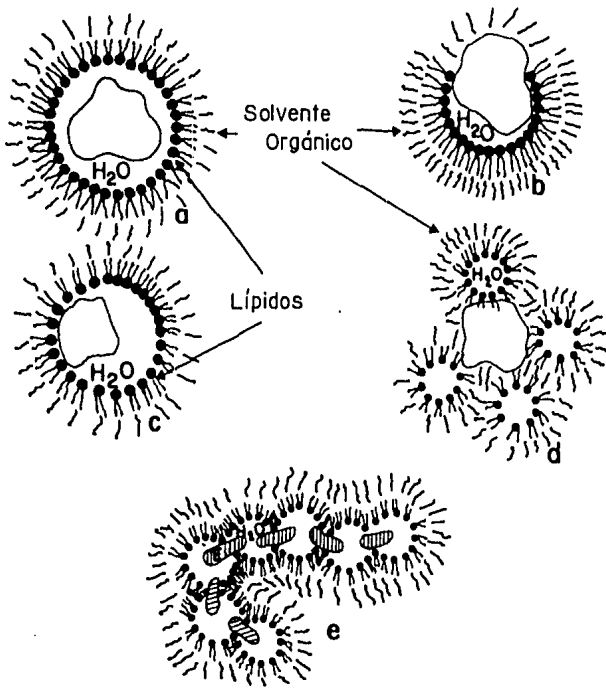
proteínas en solventes orgánicos se lleva a cabo a través de la formación de micelas invertidas.

Como se mencionó en los párrafos anteriores, la presencia de un tensoactivo resulta indispensable en el proceso de solubilización de proteínas en solventes orgánicos. Al disolver un tensoactivo en un solvente orgánico, la estructura que se obtiene es la de una micela invertida (Fig. 1a). La Fig. 1 presenta diferentes modelos que intentan explicar el mecanismo a través del cual las proteínas se disuelven en el solvente orgánico. La estructura que se forme dependerá de la naturaleza (hidrofóbica o hidrofílica) de la proteína, de su tamaño, del tensoactivo y del solvente que se utilice.

Es importante mencionar que una característica de los sistemas micelares es que el contenido de agua dentro de la micela puede variar, pudiéndose obtener preparaciones con diferente contenido de agua. Como consecuencia, las proteínas que son parcial o totalmente albergadas en el núcleo de la micela, cambian sus propiedades dependiendo del contenido de agua en el interior de éstas (13).

Muchos investigadores reconocen la importancia de la transferencia de enzimas a solventes orgánicos. Esto es porque las propiedades de éstas en el medio hidrofóbico son diferentes a las que presentan en el medio acuoso, ya que se considera que de esta forma se podría ampliar la aplicación de enzimas tanto en la industria como en la investigación. Por ejemplo se han descrito cambios en la especificidad, superactividad y resistencia a altas temperaturas de las enzimas cuando se encuentran en solventes orgánicos (34-30). Además, existe la ventaja de que las reacciones enzimáticas se lleven a cabo en

Figura 1



REPRESENTACIÓN DE LOS DISTINTOS MODELOS QUE SE ESPECULA PUEDEN FORMARSE, CUANDO LAS MICELAS CONTIENEN PROTEÍNAS. A) REPRESENTA UNA PROTEÍNA HIDROFÍLICA. B) MUESTRA UNA PROTEÍNA QUE TIENE UNA PARTE HIDROFÓBICA. C) EJEMPLIFICA UNA PROTEÍNA ADSORBIDA A LA PARED DE LA MICELA. D) ILUSTR A UNA PROTEÍNA SOLUBILIZADA POR VARIAS MICELAS EN DONDE LAS CADENAS HIDROCARBONADAS DEL TENSOACTIVO INTERACTÚAN CON LA PORCIÓN HIDROFÓBICA DE LA PROTEÍNA. E) ESQUEMATIZA LA FORMACIÓN DE UN COMPLEJO ENTRE VARIAS MICELAS CONECTADAS POR LAS PROTEÍNAS.

solventes orgánicos y no en agua, ya que así se pueden manejar sustratos o productos insolubles en agua. Del mismo modo se pueden realizar nuevas reacciones que no se podían llevar a cabo en agua por restricciones cinéticas o termodinámicas (50). Como ya se mencionó las enzimas en solventes orgánicos presentan mayor estabilidad incluso a temperaturas elevadas, lo cual permite acelerar la velocidad de reacción.

## 2. Solubilización de Proteínas en Solventes Orgánicos.

En los primeros estudios que se hicieron utilizando fosfolípidos como agentes tensoactivos para solubilizar proteínas en solventes orgánicos, se observó la transferencia del citocromo c. El método consistió en asociar el citocromo c con fosfolípidos, tal como fue descrito por Das y Crane (6). Una vez formados los complejos citocromo c fosfolípidos, éstos se transfirieron al solvente orgánico. De la misma manera citocromo c de caballo se transfirió al solvente orgánicos. Y recientemente el citocromo c3 de Desulfovibrio vulgaris se solubilizó en heptano utilizando como agente tensoactivo al 2-etilhexil-sulfo-succinato de sodio (AOT) (16). De una manera similar ha sido posible transferir proteínas de membrana, cuando se asocian a fosfolípidos. Algunas de estas son la citocromo oxidasa, la rodopsina y los centros de reacción de Rhodopseudomonas sphaeroides (10,12,23,19). En los trabajos descritos anteriormente, se solubilizaban las proteínas antes de transferirlas al solvente orgánico. Sin embargo, en trabajos posteriores (23,17,25), se han transferido directamente de membranas, eliminando así el uso de detergentes.

El objetivo del primer trabajo que aquí se presenta fue el de utilizar la extracción de proteínas a solventes orgánicos como un

método que permitiera la purificación de proteínas de membrana. Se partió del hecho de que distintas proteínas se transfieren de forma diferente al solvente en respuesta a variaciones en cada uno de los componentes del sistema (fosfolípidos, solvente orgánico, agua etc). Esto implica que, o bien algunas proteínas resisten más al solvente orgánico que otras, o que la asociación con los fosfolípidos adicionales es más efectiva con ciertas proteínas siendo que esta asociación favorece la partición al solvente orgánico. Por lo tanto, se espera que en el proceso de extracción ciertas proteínas se transfieran con mayor preferencia que otras. Anteriormente se describió (25) una partición diferencial de algunas proteínas hacia el solvente orgánico. En este caso se transfirieron proteínas al hexano a partir de mitocondrias o partículas submitocondriales. De los extractos se formaron liposomas los cuales fueron analizados en geles de poliacrilamida. Comparando el patrón de bandas obtenido con los liposomas con el patrón de bandas obtenido con partículas submitocondriales, se observó que en los liposomas algunas bandas estaban ligeramente enriquecidas, mientras que otras bandas eran apenas detectables.

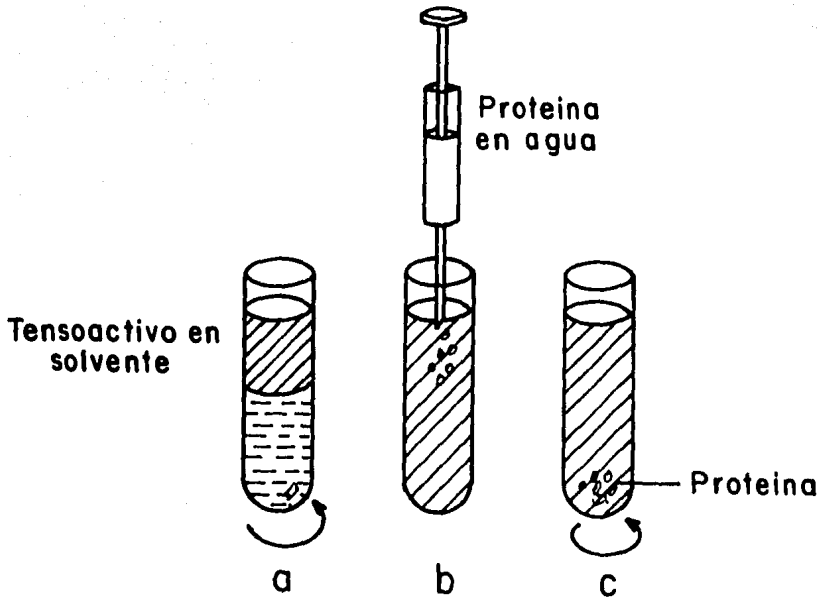
### 3. Factores que Constituyen el Sistema Solubilizado.

De los trabajos anteriores se hace aparente que la solubilización de proteínas en solventes orgánicos requiere de varias etapas y de ciertos componentes. El sistema que se obtiene está formado por el solvente orgánico, el tensoactivo, las proteínas, el agua y los cationes. En seguida se discute el papel de cada uno.

#### a) Tensoactivo.

Un requerimiento indispensable para la solubilización de

Figura 2



TRES DE LOS MÉTODOS USADOS PARA SOLUBILIZAR PROTEÍNAS EN MICELAS INVERTIDAS. A) MÉTODO DE TRANSFERENCIA DE FASE. B) MÉTODO DE INYECCIÓN (EL MÁS UTILIZADO). C) MÉTODO PARA PROTEÍNAS INSOLUBLES EN AGUA.

Tomado de Luisi, P.L. (1985) *Agew. Chem. (Int. Ed.*

*Engl.)* 24, 439-450.

proteínas es el agente tensoactivo. Los tensoactivos son moléculas anfifílicas, la mayoría constituidos por una porción hidrocarbonada y una porción iónica. La primera puede ser lineal o ramificada, esta región interacciona debilmente con el agua en un medio acuoso por lo que considera la región hidrofóbica del tensoactivo. La porción iónica o polar de la molécula interacciona fuertemente con el agua por lo cual se dice que es hidrofílica. Dependiendo de los grupos que formen esta región los tensoactivos pueden ser: catiónicos, aniónicos, zwitteriónicos o no iónicos. La conducta de agregación depende de su estructura química y de la naturaleza de medio. Los tensoactivos en solventes orgánicos se asocian formando micelas invertidas, que como se ha mencionado antes son las estructuras que permiten la solubilización de proteínas en solventes orgánicos. Los tensoactivos utilizados para la solubilización de proteínas pueden ser naturales, como los fosfolípidos, o sintéticos como el dodecilaonio benzoato, el 2-etilhexilsulfosuccinato de sodio (AOT), y el dinonilnaftalenosulfonato de sodio, entre otros. En general, el agente tensoactivo se disuelven en el solvente orgánico y la proteína en agua o liofilizada se incorpora por diferentes métodos.

b) Proteínas.

La tabla I (46) ilustra los principales estudios que se han hecho hasta el momento con proteínas solubilizadas en estos sistemas. También muestra los tipos de proteínas se han podido solubilizar en solventes orgánicos conteniendo tensoactivos.

Existen diferentes técnicas para lograr la solubilización de proteínas; una de ellas es la utilizada en este trabajo (ver Fig. 3) que consiste en sonicar la solución de fosfolípidos junto con la

TABLA I

SISTEMA	TIPO DE ESTUDIO REALIZADO EN PRESENCIA DE SOLVENTE ORGÁNICO, PRINCIPALES RESULTADOS
α Quimotripsina y peroxidasa en AOT octano.	Estudio de la actividad enzimática; ambas enzimas - permanecen activas.
α Quimotripsina y otras enzimas en AOT/octano o CTAB/octano/CHCH <sub>3</sub> [a]	Determinación de las Kcat y Km, consideraciones teóricas acerca de la cinética enzimática en micelas - invertidas.
Quimotripsina en AOT/octano	Estudios de ultracentrifugación en micelas vacías y en micelas que albergan a la enzima.
Peroxidasa en AOT/octano	Estudio de la actividad enzimática; ésta resulta - ser mucho más alta que en agua.
Lipasa pancreática en AOT/octano	Determinación de la especificidad por el sustrato.
Alcohol deshidrogenasa de hígado de	Determinación de la especificidad por el sustrato, ésta presenta cambios notables.
Fosfolipasa A <sub>2</sub> en fosfatidilcolina - /eter/MeOH.	Estudios cinéticos; el agente tensoactivo funciona - como sustrato.
α Quimotripsina y sero albumina de b <sub>0</sub> vino en varios tensoactivos.	Estudio espectroscópico y medición de la actividad - enzimática.
α Quimotripsina en AOT y C <sub>12</sub> E <sub>4</sub> /octano [b]	Estudios cinéticos con varios sustratos; la Kcat <u>re</u> - sulta ser similar a la que se detecta en agua.
α Quimotripsina en AOT/heptano.	Investigación de la actividad enzimática como una - función del pH. Exploración de la relación H <sub>2</sub> O/ Ten - soactivo.
Citocromo P-450 en sorbitan triesterasa.	Crioenzimología en micelas invertidas.
Tripsina en AOT/heptano.	Estudio de la actividad enzimática; ésta resulta - ser similar a la que se presenta en agua. Enfoque - crioenzimológico.
Rodopsina en fosfolípidos/hexano	Modelo del arreglo de la proteína dentro de la mi - cela invertida.
Centros de reacción de Rhodospseudomo - nas.	Estudio de la actividad de los centros de reacción; fotoquímicamente activos.
Hidrogenasa en CTAB/octano/CHCL <sub>3</sub> [a].	Medición de la formación de hidrógeno. Fotosinteti - zado con sensibilizadores en la interfase.
Hidrogenasa CTAB/octano/hexanol [a].	Utilización de la progesterona como sustrato de es - te sistema en la fase orgánica.
Folch- Pi proteolípidos en AOT/isooc - tano.	Solubilización de proteínas insolubles en agua en micelas invertidas. Estudios estroscópicos.
Citocromo en AOT/isooctano.	Reducción del análisis de la citocromo por transfe - rencia de fotoelectrones.
α Quimotripsina, tripsina, pepsina, glucagon en metiltrioctilamino cloruro/ ciclohexano.	Evaluación del transporte de enzimas hacia la fase orgánica. Investigación de sus propiedades espec - troscópicas. Se registra la pérdida de la actividad enzimática.
Ribonucleasa en AOT/octano.	Estudio de propiedades espectroscópicas; éstas re - sultan ser similares a las que se presentan en agua. La enzima permanece activa.
Alcohol deshidrogenasa en AOT/ isoocetano.	Investigación espectroscópica y estudios de activi - dad enzimática.
Varias enzimas en AOT/isoocetano.	Estudios de ultracentrifugación y proposición de <u>mo</u> - delos estructurales.
α Quimotripsina en AOT/isoocetano. lisozima en AOT/isoocetano.	Evaluación de la actividad y de las propiedades es - pectroscópicas en función del pH y de la relación - H <sub>2</sub> O/tensoactivo.

[a] CTAB=Bromuro hexadeciltriethylanonio. [b] C<sub>12</sub>E<sub>4</sub> Monododecileter de tetraetilenglicol.

solución concentrada de proteína. Otras técnicas existentes se presentan en la Figura 2. Mientras que los métodos ilustrado en la Figura 2<sup>a</sup> y 2<sup>b</sup> son apropiados para la transferencia de proteínas solubles en agua, el esquematizado en la figura 2<sup>c</sup> muestra el método que se utiliza tanto para proteínas insolubles como solubles en agua. Es posible que la solubilización se lleve a cabo debido a que las micelas proporcionan condiciones similares a las que presenta la membrana celular. La solubilización de proteínas de membrana en solventes orgánicos es un área muy poco explorada, y son muy pocas las proteínas de membrana que se han solubilizado hasta ahora.

c) Agua.

Las micelas invertidas de tensoactivos en solventes orgánicos son capaces de solubilizar grandes cantidades de agua y otras sustancias polares en su interior. La relación molar de agua a tensoactivo es expresada como  $w_0$ . A una concentración dada de tensoactivo a medida que el  $w_0$  incrementa el tamaño de la micela también aumenta como consecuencia de un aumento en la concentración de agua en el interior de la micela. Las propiedades del agua solubilizada han sido estudiadas por numerosas técnicas: espectros de absorción, espectros de fluorescencia, espectros de RMN etc., y se ha encontrado que las propiedades del agua solubilizada dependen del  $w_0$ , cuando el  $w_0$  es inferior a 10 las propiedades del agua solubilizada son sustancialmente diferentes a las del agua "libre", y todas las moléculas de agua se encuentran fuertemente unidas al tensoactivo. Cuando la concentración de agua se incrementa ( $w_0$  mayor que 10) empiezan a aparecer moléculas de agua libre en el interior de la micela. Así cuando  $w_0 = 40$  únicamente el 17% de agua está unida y el



resto se encuentra como agua libre con propiedades similares a las del agua no solubilizada.

El tamaño micelar ha sido determinado para un gran número de tensoactivos, por ejemplo los valores determinados para el AOT que es uno de los más utilizados y caracterizado por diferentes técnicas. A un  $w_0 = 5$  el diámetro de la micela es de 27 Å y a un  $w_0 = 50$  el diámetro alcanza valores de 105 Å (34).

#### d) Cationes.

En relación a los cationes existe poca información respecto a su función y si son o no necesarios. Montal y colaboradores (10) reportaron que la presencia de cationes era un factor indispensable para lograr la transferencia de proteínas al solvente orgánico. Algunas metodologías, como las de la figura 2 y otra que recientemente se ha desarrollado en nuestros laboratorios, logran la transferencia total de proteína sin utilizar cationes. También se ha reportado (34) que la presencia de sales afecta la solubilización de agua y por lo tanto la solubilización de las proteínas disueltas en ella. Además, recientemente se ha observado que los cationes afectan la especificidad de transferencia de proteínas a solventes orgánicos (47). Los cationes más utilizados hasta ahora son:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{1+}$  y  $\text{K}^{1+}$ .

#### 4. Propiedades de las Enzimas en Solventes Orgánicos.

En la naturaleza, la mayor parte de enzimas funcionan en medio acuosos. Por consiguiente no es sorprendente que la mayoría de los estudios en enzimología se hayan hecho en estos medios. Sin embargo, se sabe también que muchos fenómenos en la célula se llevan a cabo a nivel de la interfase agua/medio orgánico (13). Por otro lado muchas

de las enzimas se localizan sobre la superficie de membranas biológicas, parte de ellas en su interior. Otras enzimas funcionan en complejos con componentes macromoleculares de la célula, ésto es con proteínas o polisacáridos. El estudio generalizado de las proteínas en sistemas acuosos corresponde a un afán netamente operacional o de sencillez metodológica, más no se tiene la certeza de que éstos constituyen el medio óptimo para el funcionamiento de las enzimas. Tradicionalmente se ha considerado que sólo en el ambiente acuoso es posible medir las funciones enzimáticas. Esta visión emana del hecho de que el agua participa directa o indirectamente en todas las interacciones no covalentes que mantienen la conformación nativa y las propiedades catalíticas de la mayor parte de las enzimas. De esta manera la remoción total del agua podría conducir a la desnaturalización de las mismas por cambios drásticos en su conformación nativa.

Sin embargo resulta de gran interés evaluar la actividad enzimática en un medio no acuoso (hidrofóbico) y dilucidar cual es la cantidad mínima de agua que se requiere para que se lleven a cabo los procesos enzimáticos. No hay que olvidar que la enzima sólo entra en contacto con las capas de agua más inmediatas las cuales en principio serían los responsables de mantener su conformación nativa. Por lo tanto resulta lógico pensar que el resto del agua se puede sustituir por un solvente orgánico, cuyo contenido de agua se puede reducir hasta menos de 1%. Las enzimas que se han estudiado con este enfoque son: la quimotripsina (26), la xantina oxidasa (27,28) y la Lipasa pancreática (29). Todas resultaron ser catalíticamente activas en el solvente orgánico.

TABLA II

## REACCIONES CATALIZADAS POR LIPASA PANCREATICA PORCINA EN DIFERENTES SOLVENTES ORGANICOS

VELOCIDAD DE REACCION INICIAL,  $\mu\text{mol} / \text{hr.} / \text{mg.}$  DE LIPASA

SOLVENTE	TRANS- ESTERIFICACION	ESTERI- FICACION	AMINOLISIS	INTERCAMBIOS ACIL	TIOTRANSES TERIFICACION	OXIMOLISIS
Hexano	5.2	2.4	0.60	2.0	3.0	3.0
Acetona	1.2	0.3	0.60	0.54	1.10	1.50
Tetrahidrofu- rano	2.0	0.36	0.54	0.54	1.80	2.10
Eter etílico	5.1	0.90	0.24	0.72	1.90	2.10
Piridina	1.3	0.06	0.60	0.12	1.10	1.10
Tolueno	2.1	2.4	0.18	1.10	1.70	2.30

Tomado de: Aleksey Zaks y Alexander M. Klivanov.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. Vol. 82 pp. 3192-3196.

Por otro lado en los trabajos realizados por Klibanov (30), se describe que las enzimas suspendidas en solventes orgánicos pueden llevar a cabo reacciones catalíticas diferentes a las que se había reportado en medios acuosos. La tabla II (30), muestra que las enzimas pueden catalizar un número mayor de reacciones que las conocidas hasta ahora. Se ha observado que en el solvente orgánico, la enzima tiene la capacidad para catalizar reacciones que difícilmente se llevan a cabo en sistemas acuosos (50). Además se han obtenido datos que indican que las enzimas pueden llevar a cabo catálisis a temperaturas elevadas cuando se encuentran en solventes orgánicos (29,31).

Por otro lado, también se ha visto que la termoestabilidad de la ATPasa y Citocromo oxidasa aumentó en forma muy importante cuando se encuentran en el solvente orgánico. La realización de este estudio resulta de gran interés ya que proporciona información valiosa sobre la termoestabilidad proteica de enzimas multiméricas a concentraciones muy bajas de agua.

## II. METODOLOGIA.

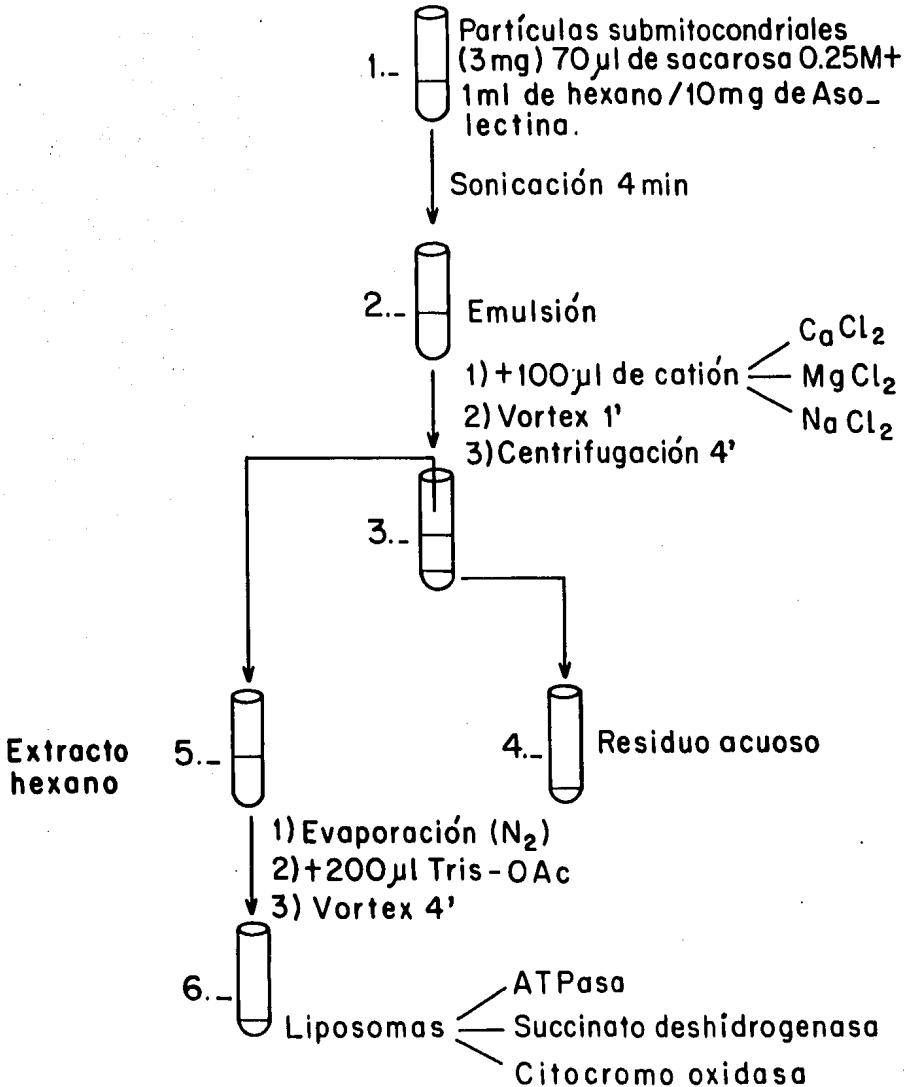
La metodología de transferencia de proteínas a solventes orgánicos que se empleó fue la descrita en los trabajos en que se utilizan fosfolípidos como tensoactivos. Este procedimiento consta de las siguientes 4 etapas (Fig. 3).

1.- Obtención de una preparación de membrana parcialmente purificada.

2.- Formación por sonicación de una emulsión de fosfolípidos/agua/solvente/proteína.

Figura 3

Metodología de Preparación de Extractos



3.- Adición de un catión.

4.- Obtención, por centrifugación de las proteínas que se particionan a la fase no acuosa.

Esta metodología opera con los siguientes componentes:

a) Proteínas.

En los primeros trabajos en los que se transfirieron proteínas de membranas, el paso inicial consistió en solubilizar la membrana con detergente y aislar la proteína de interés. La proteína se mantenía con detergente para que permaneciera en solución. Posteriormente para poderla incorporar en un sistema modelo, el detergente se eliminaba por diálisis o utilizando Bio Beads SM-2 (20). Este procedimiento era utilizado cuando se quería reconstituir una sola proteína. La principal desventaja de este procedimiento es la presencia de detergente residual. Contrastando con el método anterior, se cuenta con una técnica que no requiere del uso de detergentes (21). En esta técnica la transferencia directa de las proteínas se lleva a cabo a partir de membranas nativas no perturbadas o de extractos de membrana crudos, que nunca han estado en contacto con detergente. En estas condiciones, se puede estudiar el posible papel de los detergentes en el fenómeno estudiado.

b) Lípidos.

Independientemente de si la extracción se inicia a partir de una proteína purificada con detergente; o a partir de extractos crudos, la presencia de fosfolípidos es esencial. En ausencia de fosfolípidos, la cantidad de proteína que se transfiere al solvente orgánico es mínima (22), ya que la presencia de estos lípidos es necesaria para la

partición al solvente orgánico, se considera que la proteína en el medio hidrofóbico se encuentra formando complejos lipo-proteicos, quizá en micelas (44). Sin embargo, hasta la fecha se conoce poco del arreglo en el que se asocian lípidos y proteínas. Los conocimientos más recientes sugieren que dicho arreglo corresponde al de las estructuras presentadas en la Fig. 1 (34).

Resulta conveniente aclarar que los complejos lipo-proteicos (que se forman en el medio acuoso) pueden estar constituidos por un solo tipo de lípido o por una mezcla de ellos, del mismo modo que por una gran variedad de tensoactivos sintéticos (15).

c) Cation.

Además de los fosfolípidos, se encontró que la transferencia de los complejos lipo-proteicos se incrementa acidificando la fase acuosa o adicionando un catión (11,6,22). Hasta ahora se había considerado que la función del pH y del catión era la de neutralizar las cargas negativas que no habían sido neutralizados por los fosfolípidos. Sin embargo, los conocimientos recientes ponen en duda el que ésta sea su función.

d) Solvente Orgánico.

La elección del solvente usado en la extracción está determinado para la eficiencia de extracción y el grado de preservación de la actividad biológica que se obtiene. En general, se ha encontrado que los solventes orgánicos apolares son los más apropiados para las diferentes proteínas que hasta ahora se han estudiado. Por ejemplo para la extracción de centros de reacción de Rhodospseudomonas sphaeroides (22) se probaron diferentes solventes, los mejores resul-

taron ser los solventes orgánicos apolares (metilciclohexano, benceno).

e) Sonicación.

La sonicación también se consideró inicialmente como un paso determinante en la transferencia de proteínas o de complejos lipo-proteicos formados previamente. En nuestro trabajo si no se lleva a cabo la sonicación sólo pequenísimas cantidades de proteínas o de complejos lipo-proteicos pasan al solvente orgánico. A medida que se incrementa el tiempo de sonicación, la transferencia se incrementa hasta alcanzar un tiempo máximo después del cual la cantidad transferida permanece constante (23). Se cuenta con un reporte en el que se muestra que para el caso de los centros de reacción de R.sphaeroides, el prolongar la sonicación después de un tiempo óptimo, repercute en la desnaturalización gradual de la proteína (22). En el presente trabajo se usaron tiempos de sonicación de entre 4 y 10 minutos, que resultaron ser conveniente para los propósitos aquí planteados. Sólo resta mencionar que existen otras metodologías en las que no es necesario sonicar, para lograr con éxito la transferencia de proteínas al sistema micelar.



BBA 41860

## Extraction of mitochondrial membrane proteins into organic solvents in a functional state

Guadalupe Ayala, Aguinaldo Nascimento \*, Armando Gómez-Puyou \*\* and Alberto Darszon

*Centro de Investigaciones en Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, and Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Apartado Postal 14-740 México, D.F. (Mexico)*

(Received February 25th, 1985)

(Revised manuscript received July 1st, 1985)

Key words: Mitochondrial membrane; Protein-lipid complex; ATPase; Cytochrome c oxidase; Succinic dehydrogenase; Liposome

Protein-lipid complexes in organic solvents can be used as the starting material in the reassembly of functional planar and spherical bilayers (Montal, M., Darszon, A. and Schindler, H. (1981) *Q. Rev. Biophys.* 14, 1-79). The transfer of three enzymes of the inner mitochondrial membrane into organic solvents as protein-lipid complexes has been studied to understand better the extraction process. The enzymes studied were cytochrome c oxidase, ATPase and succinate dehydrogenase. These enzymes were transferred into hexane and diethyl ether in an active state, however, the activities extracted varied quantitatively, depending on the amount of protein of the starting preparation, the concentration of phospholipids and the cation employed. In all conditions cytochrome c oxidase was extracted with the highest yield and specific activity, and it was actually enriched in the organic extract. The values for succinate dehydrogenase and ATPase were lower, but their specific activities were similar to those of the starting material. This indicates that some membrane proteins are preferentially extracted into organic solvents in a functional state. The enzymes, as protein-lipid complexes, are fairly stable in organic solvents; in a month of storage at 4°C in hexane some enzymes loose less than 50% of their activity.

### Introduction

In the last years a general procedure has been developed to transfer proteins directly, in their active form from biological membranes into organic solvents as protein-lipid complexes. These complexes in the hydrophobic media constitute the building blocks of several kinds of model mem-

branes, i.e., monolayers, planar bilayers and liposomes of diverse sizes [1]. In addition, in mitochondrial membranes the technique has been used to determine the state of the ATPase which under physiological conditions can undergo transitions of its activity [2,3].

Previously, it had been shown that purified cytochrome c oxidase [4], reaction centers from photosynthetic bacteria [5] and rhodopsin, either purified or from rod outer segments [6,7], could be transferred into hexane as protein lipid complexes in high yields (50-90%). In contrast, we have found that the mitochondrial ATPase is less effi-

\* Present address: Departamento de Bioquímica, Universidad Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

\*\* To whom correspondence should be sent.

ciently transferred from mitochondria or sub-mitochondrial particles in this solvent (10–15%), although it maintains its specific activity [2]. These results raise the possibility that some membrane proteins have a higher probability of being transferred into the solvent as protein-lipid complexes in their active form.

To test this possibility, we have measured the transfer of the ATPase, cytochrome *c* oxidase and succinic dehydrogenase from submitochondrial particles into hexane. These different inner mitochondrial proteins partition into the solvent as protein-lipid complexes with different yields, but cytochrome *c* oxidase is transferred in better yields ( $39 \pm 15\%$ ).

The overall results confirm the generality of the method used to transfer membrane proteins into organic solvents (for a review, see Ref. 1) and indicate that some proteins (i.e., cytochrome *c* oxidase) are preferentially extracted into the solvent as protein-lipid complexes in an active form.

#### Materials and Methods

Bovine heart mitochondria were prepared according to Löw and Vallin [8]. Submitochondrial particles were prepared by sonication of mitochondria (20 mg per ml) in 1 mM  $MgSO_4$ , 1 mM ATP and 250 mM sucrose (pH 7.2) for 35 s in a Branson sonifier. The sonicate was centrifuged at 10000 rpm in a Sorvall SS-34 rotor for 10 min. The supernatant was centrifuged at  $105000 \times g$  for 45 min and the pellet washed and centrifuged again for 60 min. The washed pellet was suspended at a concentration of 50 mg per ml. The suspension was divided in aliquots which were stored at  $-40^\circ C$ . The same preparation was used in all the experiments shown, however, essentially the same results have been obtained with many other preparations of inner mitochondrial membranes.

The general scheme for the extraction of sub-mitochondrial particles was as follows: in most of the experiments 1 ml of hexane that contained 10 mg of soybean phospholipids was added to 3 mg of protein (suspended in 70  $\mu$ l of sucrose 240 mM) in a 1.8 cm  $\times$  14.8 cm test tube. Immediately, the mixture was sonicated in a water bath sonicator

(Bransonic 220, Heat Systems Ultrasonic, Plainview, New York) for 4 min. The suspension was transferred to 1 cm  $\times$  10 cm test tubes, and 100  $\mu$ l of 1.0 M  $CaCl_2$  were added (in some experiments  $Ca^{2+}$  was substituted with other cations) and the mixture stirred in a Vortex mixer for one min, and thereafter centrifuged for 4 min at  $3/4$  of the maximal speed of a clinical centrifuge with floating tubes. The upper hexane layer was withdrawn, avoiding the removal of the inter-phase and evaporated in an ice-bath under a current of nitrogen. To the dry residue 200  $\mu$ l of 25 mM tris-acetate (pH 7.4) was added. The residue was allowed to hydrate and liposomes formed by stirring in a Vortex mixer for 4 min. Enzymic activities were assayed in the liposomes. Some of the steps of the extraction procedure were varied to test whether they affected the extraction. These changes are indicated in the Results section.

#### Enzymic activities

The activity of succinate dehydrogenase was measured spectroscopically following the reduction of dichlorophenolindophenol [9]. ATPase was assayed in a coupled enzyme system, following NADH oxidation spectroscopically [10]. Cytochrome *c* oxidase was recorded with an oxygen electrode using cytochrome *c* as substrate in the presence of ascorbate and *N,N,N',N'*-tetramethyl-1,4 phenylenediamine dihydrochloride [11]. Apparently, the activities obtained were maximal, since disruption of the liposomes by 2% Triton X-100 did not increase the activity rates. However, Triton X-100 induced a decrease in the rate of cytochrome *c* oxidase in liposomes, thus whether this activity is completely expressed in the liposomes cannot be strictly ascertained.

#### Other procedures

Protein of the particles was assayed by the Biuret method, while that of the liposomes was determined according to Lowry et al. [12]. Soybean phospholipids (asolectin) were purified according to Kagawa and Racker [13]. Polyacrylamide gel electrophoresis was carried out as follows: samples that contained a final concentration of 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 3% mercaptoethanol were electrophoresed in 0.1% sodium dodecyl sulfate, 10%

polyacrylamide slab gels (9 cm) according to Laemmli [14]. The gels were fixed and stained for protein with 0.1% coomassie blue in 30% methanol/10% acetic acid and destained in 30% methanol/10% acetic acid.

Spectral determination of cytochromes  $a_3$ , and  $b$  was performed in the presence of 50% glycerol in an SLM-Aminco Midrian II spectrophotometer at room temperature (1.0 cm light-path cuvettes). The concentration of the cytochromes was estimated from the difference spectra (dithionite-reduced minus persulfate-oxidized) of liposomes or sub-mitochondrial particles, using the following wavelength pairs and extinction coefficients: cytochrome  $a_3$ , extinction coefficient at 630 to 603 nm  $E_{603-630} = 24 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , cytochrome  $b$ ,  $E_{563-575} = 22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [15].

#### Electron microscopy

For freeze fracture, liposomes formed from sub-mitochondrial particle organic extracts were centrifuged at  $100\,000 \times g$  for 2 h, and the pellets fixed for 15 min in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.3) at room temperature. Thereafter, the pellets were washed twice with 0.1 M cacodylate buffer and were gradually impregnated with increasing concentrations of glycerol in cacodylate buffer for 30 min, up to a concentration of 20% glycerol and allowed to stand for 30 min. The fixed, glycerol-impregnated pellets were cut and rapidly frozen in the liquid phase of partially solidified Freon 22, cooled and stored in liquid nitrogen for a few days. Freeze fracture was carried out at  $-115^\circ\text{C}$  in a Balzers 300 apparatus (Balzers Co., Liechtenstein) equipped with a turbo molecular pump.

Replicas were produced by evaporation from a carbon platinum source. The specimens were shadowed at  $2 \cdot 10^{-6}$  mm Hg with 2–4 s of fracturing. After cleaning in sodium hypochlorite, replicas were washed with distilled water, mounted on Formvar-coated grids, and observed with a Zeiss EM 10 (Zeiss Co., Ober-Kochen, F.R.G.) electron microscope.

#### Results

The results in Fig. 1A show that more protein was extracted into the solvent from which lipo-

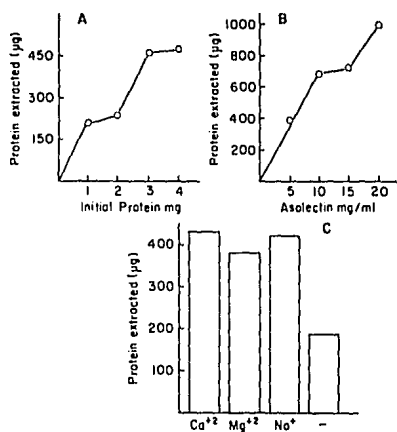


Fig. 1. Extraction of protein from submitochondrial particles into hexane. The extraction of protein from submitochondrial particles is detailed under Methods, except that in (A) the amount of starting protein was varied. The results represent the average of three experiments. In (B) the amount of asolectin per ml of hexane was as shown. In (C) 100  $\mu\text{l}$  of 3 M NaCl, 1 M  $\text{MgCl}_2$  or 1 M  $\text{CaCl}_2$  were added; the right bar shows the amount of protein extracted with no added cation. The overall standard deviation in these type of experiments was  $\pm 35\%$ ,  $n = 10$ .

somes were formed, as the protein in the starting preparation was increased up to 4 mg. Fig. 1B illustrates the dependence of the extraction on added lipid. When no lipid was added, protein was not extracted into the solvent. Fig. 1C illustrates that the presence of cations enhanced the amount of protein extracted into the solvent.

Electrophoretic analysis in SDS gels of hexane and diethyl ether extracts from submitochondrial particles showed that many of the polypeptides present in the original membrane were transferred into the solvent (data not shown). Apparently, a few bands were enriched, while others were in a lower concentration. This suggested the possibility that some proteins were preferentially being extracted into the solvent.

According to these data it was decided to explore whether the proteins extracted into the organic phase possessed some enzymic activity and whether during the procedure some enzymes were preferentially extracted. To this purpose three

membrane enzymes were assayed: succinate dehydrogenase, cytochrome *c* oxidase and ATPase. These are three enzymes with different characteristics and variable degrees of complexity (for reviews see Refs. 16, 17 and 18). The specific activities of succinate dehydrogenase and ATPase in submitochondrial particles were  $0.1 \pm 0.01$  and  $0.38 \pm 0.1 \mu\text{mol}/\text{min}$  per mg protein, respectively. It has been shown that the activity of cytochrome *c* oxidase depends on the phospholipid milieu [19,20]. Accordingly, particles were sonicated in the presence of soybean phospholipids, to mimic the conditions of the liposomes, and their cytochrome *c* oxidase specific activity measured and used to estimate the enrichment and recovery of the extracted enzyme. Interestingly, the specific activity of submitochondrial particles sonicated with lipids ( $3946 \pm 576 \text{ natoms O}/\text{min}$  per mg) was approx. 4-times higher than in the untreated particles.

Figs. 2 and 3 summarize the results of experiments in which the specific activities and recoveries of the three enzymes were measured after the extraction of the particles into hexane under various conditions and subsequent incorporation of

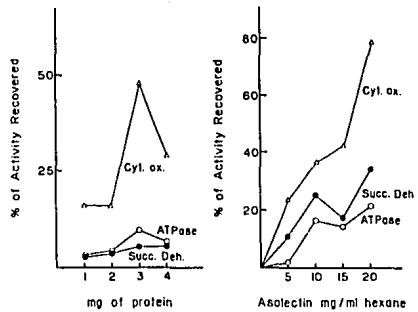


Fig. 3. Percent recovery of succinate dehydrogenase, cytochrome *c* oxidase and ATPase activities in the liposomes. The experimental conditions were as in Fig. 2. The total activity of these enzymes in submitochondrial particles was taken as 100%. In the case of cytochrome *c* oxidase the value after sonicating the particles with lipid was considered as 100%.

the protein-lipid complexes into liposomes. A parallelism was found; in general, conditions which favor higher protein extraction yield higher recoveries and specific activities for the three

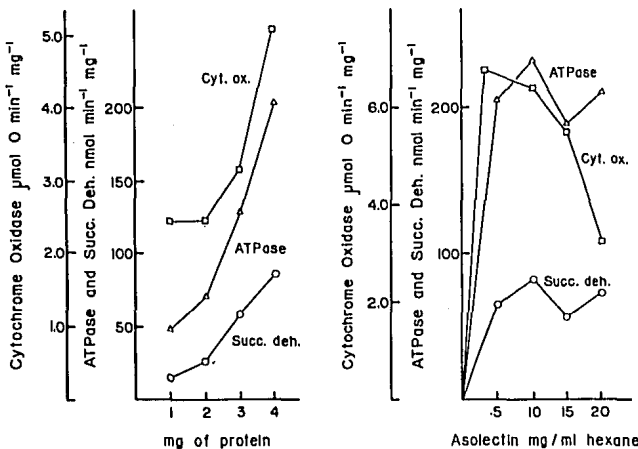


Fig. 2. Specific activities of succinate dehydrogenase (Succ. Deh.), cytochrome oxidase (Cyt. ox.) and ATPase in liposomes. The experimental conditions were as in Fig. 1; the indicated activities were assayed in liposomes formed from the respective hexane extracts.

Another important source of variability is in the formation of the liposomes: the protein-lipid residue after solvent evaporation must be carefully resuspended in the desired buffer, since otherwise the residue may remain adhered to the wall of the test tube.

Also it was of interest to explore whether these membrane proteins could be extracted into organic solvents other than hexane, and whether this change affected the pattern of extraction of the enzymes. Thus, the same general procedure was used, except that hexane was substituted for diethylether. Diethylether was chosen because it was used previously in the extraction of vertebrate rhodopsin [6] and the ATPase [2]. The results (not shown) indicate that this change of solvent did not result in a significant variation of the amount of protein that was extracted, nor in the characteristics of the three enzymes studied.

It is the impression of the authors that this methodology has a potential use in the purification of membrane-bound enzymes that is worth exploring, therefore it was of importance to determine the stability of the enzymes in hexane. The results are shown in Fig. 5. The enzymes seem to be fairly stable in hexane, since after 10 days of storage at 4°C the organic extracts lost less than 50% of the activity of the three enzymes, and after 30 days the

activities of succinate dehydrogenase and cytochrome *c* oxidase were preserved by more than 50%.

## Discussion

The present study shows that the three mitochondrial membrane enzymes that were assayed are functionally present in varying amounts in liposomes formed from the protein-lipid complexes obtained after extracting submitochondrial particles with organic solvents. All conditions tested in the extraction procedure (amount of protein, phospholipid concentration in hexane and different cations) influence the yield of the protein extracted, and differentially affect the resulting activity of the enzymes. It is therefore possible to take advantage of this behavior, and by selecting appropriate conditions (amount of protein, etc.) modify the transfer of some enzymes.

Two main factors, which depend to a large extent on the extraction conditions, determine the specific activity and recovery of a particular enzyme in the liposomes formed from the mitochondrial organic extracts: (a) the efficiency with which the specific protein is transferred into the solvent and (b) how well the enzyme withstands the treatment. An enzyme can partition very efficiently into the solvent, but its transfer results in denaturation; therefore, its specific activity would be low. On the other hand, it can partition poorly, but retain its functional capacity and have the same or higher specific activity, depending on how well other proteins are transferred. With the measurements performed here it is not possible to detect a specific denatured enzyme in the liposomes; however, this would be possible using antibodies, or other suitable markers of the enzyme. Therefore, to evaluate if an enzyme has been purified or enriched it is necessary to consider: (1) the total yield of extracted protein; (2) the total activity of the particular enzyme recovered; (3) its specific activity in the starting material and in the liposomes; and (4) if the enzyme has been activated during treatment.

This analysis can be done for cytochrome *c* oxidase and several conclusions may be derived: (a) on the average this activity is enriched by a factor of 1.6 in the liposomes formed from the

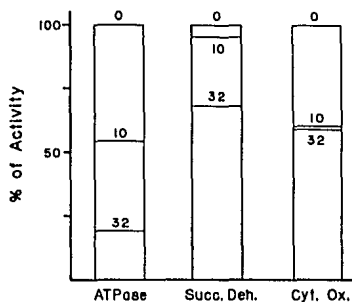


Fig. 5. Stability of succinate dehydrogenase, cytochrome *c* oxidase and ATPase in hexane. Hexane extracts were formed as described under Methods. Immediately after preparation, an aliquot was used to form liposomes and the enzymic activities assayed. The rest of the organic extract was kept at 4°C for 10 and 32 days, at this time aliquots were used to form liposomes to assay the activities. The initial activity was taken as a 100%.

particle extracts considering the specific activity of submitochondrial particles sonicated in the presence of soybean lipid vesicles to mimic the extraction conditions; (b) the recovery of cytochrome *c* oxidase activity is higher (30%) than the total protein yield of extraction (10–15%). The possibility that solvent activation could explain the enrichment factor obtained for cytochrome *c* oxidase considering its specific activity was ruled out by finding that the content of cytochrome *aa<sub>3</sub>* increased in the liposomes proportionally to their specific activity. In addition, it was observed that cytochrome *b* was not enriched in the liposomes and that the ratio cytochrome *aa<sub>3</sub>*/cytochrome *b* was higher in liposomes than in submitochondrial particles. Therefore, it is clear that cytochrome *c* oxidase preferentially partitioned into the solvent retaining its function. This case exemplifies the potential of the technique in the purification of some membrane proteins.

Considering the cytochrome *c* oxidase results, it does not seem likely that whole membrane fragments of submitochondrial particles are being transferred into the solvent. If this was the case the



Fig. 6. Freeze fracture appearance of liposomes formed from hexane extracts of submitochondrial particles (see Methods). Magnification, 31000 $\times$ .

specific activity of this enzyme in the extracts should not be enriched and its recovery should reflect its natural abundance (approx. 10%) in the inner mitochondrial membrane. In addition, if whole membrane fragments were being transferred into the lipid containing solvent, freeze fracture replicas of the liposomes formed from the organic extracts should show single-layered sub-mitochondrial fragments with membrane particles and multilayered lipid vesicles devoid of particles. In contrast, the replicas of the liposomes (see Fig. 6) reveal an apparently homogeneous distribution of membrane particles within mostly multilamellar vesicles.

In principle, the role of the cation in the transfer of proteins as protein-lipid complexes into apolar solvents is to neutralize the overall charge of the complex. However, it has been found that there is a small dependence on  $\text{Ca}^{2+}$  in the extraction of rhodopsin from purified bovine rod outer segments [21], which indicates that the role of cations is not entirely defined. The data described here (Fig. 4) show that cations besides enhancing the partition of protein into the solvent may play a more specific role in allowing the transfer of functional complexes.

Protein-lipid complexes in hydrophobic media besides being the starting material of several kinds of model systems [1] are interesting preparations from which new methods for protein purification could be developed. The protein-lipid complexes are reasonably stable in the organic solvent, and thus they could be used to further purify a specific enzyme in a hydrophobic environment without the use of detergents.

#### Acknowledgements

We are indebted to Bibiana Chávez and Adolfo Martínez Palomo for electron microscopical studies and to Dr. Edgardo Escamilla for the spectroscopic assays. This work was supported by grants from CONACYT, the Ricardo J. Zevada Foundation and the Organization of American States.

#### References

- 1 Montal, M., Darszon, A. and Schindler, H. (1981) *Q. Rev. Biophys.* 14, 1–79

- 2 Darszon, A. and Gómez-Puyou, A. (1982) *Eur. J. Biochem.* 121, 427-433
- 3 Sánchez-Bustamante, V.J., Darszon, A. and Gómez-Puyou, A. (1982) *Eur. J. Biochem.* 126, 611-616
- 4 Montal, M. (1974) in *Perspectives in Membrane Biology* (Estrada, S. and Gitler, C., eds.), pp. 591-622, Academic Press, New York
- 5 Schönfeld, M., Montal, M. and Feher, G. (1980) *Biochemistry (New York)* 19, 1535-1542
- 6 Darszon, A., Philipp, M., Zarco, J. and Montal, M. (1978) *J. Memb. Biol.* 43, 71-90
- 7 Darszon, A., Strasser, R.J. and Montal, M. (1979) *Biochemistry* 18, 5205-5213
- 8 Low, H. and Valin, I. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 69, 361-374
- 9 Hatefi, Y. and Stiggall, D.L. (1978) *Methods Enzymol.* 53, 21-27
- 10 Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. and Racker, E. (19-0) *J. Biol. Chem.* 235, 3322-3329
- 11 Barranco, J., Darszon, A. and Gómez-Puyou, A. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 1402-1408
- 12 Löwry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 13 Kagawa, Y. and Racker, E. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5477-5487
- 14 Laemmli, U.K. (1970) *Nature (Lond.)* 227, 680-685
- 15 Smith, L. (1978) *Methods in Enzymol.* 53, 202-213
- 16 Singer, T.P., Kearney, E.B. and Kenney, W.C. (1973) *Adv. Enzymol.* 37, 189
- 17 Fuller, S.D., Capaldi, R.A. and Henderson, R. (1979) *J. Mol. Biol.* 134, 305-327
- 18 Galante, Y.M., Wong, S.Y. and Hatefi, Y. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 12372-12378
- 19 Robinson, N.C., Strey, F. and Talbert, L. (1980) *Biochemistry* 19, 3656-3661
- 20 Awasthi, Y.C., Chuang, T.F., Keenan, T.W. and Crane, F.L. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 226, 42
- 21 Darszon, A. (1982) *Vision Res.* 22, 1443-1446

# Thermostability of membrane enzymes in organic solvents

Guadalupe Ayala, M. Tuena de Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou and Alberto Darszon\*

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, 04510 México DF and \*Departamento de Bioquímica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, México DF, Mexico*

Received 11 March 1986

Two multisubunit enzymes of the inner mitochondrial membrane, cytochrome oxidase and the H<sup>+</sup>-ATPase may be transferred into highly apolar solvents as protein-lipid complexes. At 70° C and an initial water concentration of 13  $\mu$ l per ml organic solvent (toluene), the half-life of the ATPase was approx. 11 h, whereas that of cytochrome oxidase was about 100 s. Thermostability of cytochrome oxidase could be increased more than 100-times by decreasing the water concentration to 3  $\mu$ l per ml toluene. At this latter concentration of water the half-life of the ATPase at 90, 80 and 70° C was 5, 48 and 96 h, respectively.

*ATPase    Cytochrome oxidase    Enzyme stability    Organic solvent    Thermostability    Water content*

## 1. INTRODUCTION

Enzymes lose their catalytic activity as the temperature is raised. A fundamental step in thermostabilization is the unfolding of the protein which results from a decrease of the different covalent forces that maintain the native, catalytically active structure [1,2]. Also, it is accepted that water is involved in the maintenance of noncovalent interactions in the enzyme [3-5]. Thus, it appeared of interest to study the thermostability of enzymes that possess highly complex subunit structures under conditions where water is largely substituted by apolar solvents. These studies became possible due to the development of a methodology that allowed the transfer of enzymes into apolar solvents as protein-lipid complexes [6,7]. Previously, Zaks and Klibanov [5] reported that pancreatic lipase suspended in organic solvents withstands 100°C for many hours. Our studies show that mitochondrial H<sup>+</sup>-ATPase [8] and cytochrome oxidase [9], when transferred to toluene, increase their thermal stability by orders of magnitude. Their thermostability is largely affected by the content of water in the solvent.

## 2. MATERIALS AND METHODS

The transfer of enzymes from submitochondrial particles from bovine heart into toluene was made essentially as in [7], except that the procedure was carried out at room temperature. The turbid organic phase obtained was withdrawn without touching the interphase, placed in 1.7  $\times$  15 cm tubes, and incubated at various temperatures. Liposomes were formed from these extracts at room temperature as described [7]. The ATPase and cytochrome oxidase activities were measured in the liposomes [10,11] and were considered an index of the degree of inactivation of the enzymes in the organic phase.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

Approx. 50% of the protein of submitochondrial particles was extracted into toluene. The activities of the ATPase and cytochrome oxidase in the liposomes were approx. 0.3  $\mu$ mol  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg<sup>-1</sup> and 2  $\mu$ gatom  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg<sup>-1</sup>, respectively. The respective specific activities of the ATPase and cytochrome oxidase in the liposomes were 50% lower and 15% higher than in the particles. The



reasons for the difference in the specific activities between liposomes and particles have been discussed [7].

Toluene extracts incubated at 70, 80 and 90°C for prolonged times yielded liposomes that possessed ATPase activity (fig.1). The half-life of the enzyme at these temperatures was about 11 h, 4 h and 20 min, respectively. The incubation of submitochondrial particles in 0.25 M sucrose at the above temperatures totally inactivated the ATPase in 2 min, 1 min and 20 s. In contrast to the marked thermostability of the ATPase in toluene, cytochrome oxidase was rapidly inactivated, i.e. total loss of activity was observed at 70°C in less than 2 min.

Water is known to be involved in the thermal inactivation of enzymes [3-5]. Using  $^3\text{H}_2\text{O}$ , the amount of water in the extracts was estimated (see legend to table 1). This was  $13 \pm 3 \mu\text{l } ^3\text{H}_2\text{O}$  per ml toluene extract. It was assumed that in the preparation of the toluene extracts,  $^3\text{H}_2\text{O}$  distributes

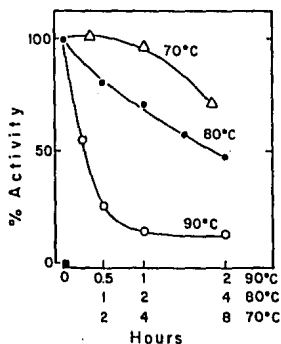


Fig.1. Thermostability of enzyme-lipid complexes in toluene. Toluene extracts were placed in open 1.7 × 15 cm tubes and incubated at the temperatures shown. At various times, the tubes were placed in an ice bath, liposomes were formed and their ATPase activity measured. Cytochrome oxidase activity of liposomes formed from toluene extracts incubated for 2 min at 70°C was also measured (■). The activities of cytochrome oxidase and ATPase of liposomes formed without incubation at high temperatures were considered to be 100%; these activities were 1.9 μgatom O · min<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup> at 30°C and 0.38 μmol · min<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup> at 37°C, respectively.

uniformly in all water spaces, and that the measured radioactivity corresponded to water. After initiation of incubation at 70°C in 1.7 × 15 cm tubes, the amount of  $^3\text{H}_2\text{O}$  in the extract rapidly diminished to 2-3 μl per ml in a period of 10 min; this value did not change significantly after 1.5 h (fig.2). The rapid initial elimination of water from toluene extracts proved fundamental for attaining thermostability of enzymes. In fact, it was observed that if the incubation at high temperatures was carried out in 1.3 × 12.5 instead of 1.7 × 15 cm tubes, the ATPase was rapidly inactivated (fig.2); apparently this correlated with a slower evaporation of water from the organic phase (fig.2).

At low temperatures, the amount of water in the toluene extracts could also be decreased by partial evaporation of the organic phase under an N<sub>2</sub> current (table 1). This partial elimination of water caused the turbid extracts to become transparent, and provoked a large increase in thermostability of

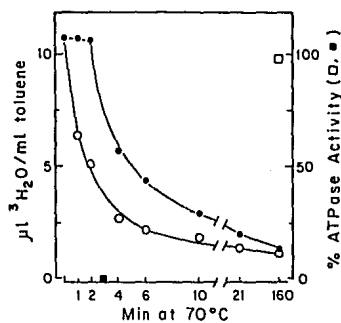


Fig.2. Water concentration in organic extracts and ATPase inactivation. Toluene extracts were prepared as described, except that the sucrose and CaCl<sub>2</sub> solutions were made in  $^3\text{H}_2\text{O}$  with the same specific activity ( $1.9 \times 10^7$  cpm/ml). The radioactivity of the toluene extract was assayed to estimate  $^3\text{H}_2\text{O}$  per ml organic phase. Thereafter, 0.8 ml extract was placed in 1.7 × 15 cm (O—O) and 1.3 × 12.5 (●—●) tubes and incubated at 70°C. As indicated aliquots were withdrawn to measure radioactivity. After incubation of the extract at 70°C for 3 min in the small tubes (■) and 160 min in the large tubes (□) liposomes were formed from aliquots of the extract to assay ATPase activity. The results are in % activity remaining; 100% activity was 0.42 μmol · min<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup> which corresponds to liposomes of toluene extracts that had not been incubated at 70°C.

Table 1

Effect of water concentration in toluene extracts on thermostability of the ATPase and cytochrome oxidase

Initial $^3\text{H}_2\text{O}/$ ml toluene ( $\mu\text{l}$ )	Tempera- ture ( $^{\circ}\text{C}$ )	Half-life	
		Cytochrome oxidase	ATPase
13	70	< 3 min	11 h
3	70	4 h	96 h
3	80	50 min	48 h
3	90	7.5 min	5 h

The water content of toluene extracts (13  $\mu\text{l}$ ) was measured as in fig.2. The starting water content of the extracts was diminished to 3  $\mu\text{l}$  evaporating them under an  $\text{N}_2$  current to about half of their original volume which was restored with toluene. The two extracts were incubated at the temperatures shown. Aliquots were withdrawn at various times to assay ATPase and cytochrome oxidase activity. During incubation toluene was added to compensate evaporation

both cytochrome oxidase and ATPase (table 1). This decrease in water content caused about a 100-times increase in the half-life of cytochrome oxidase (see data at  $70^{\circ}\text{C}$ , table 1).

These results suggest that in organic solvents, all enzymes acquire thermostability provided that bulk water is eliminated. Nevertheless, even at initial low water concentrations in the extracts, the ATPase was more stable than cytochrome oxidase; after 2, 8 and 60 h at 90, 80 and  $70^{\circ}\text{C}$ , respectively, 100% ATPase activity remained, whereas in these conditions cytochrome oxidase was inactivated (not shown).

We believe that water that is removed from the system as in the experiment of table 1 is directly involved in the rapid formation of incorrect structures, and thus in enzyme inactivation. In addition there also seems to exist a definite amount of water that is not as readily removed; at least part of this water could correspond to protein-bound water that may prove essential for maintenance of the native protein structure [15]. In agreement with Zaks and Klivanov [5], it was found that enzymes in organic solvents are very stable at high temperatures. However, the system described here differs from that of those authors in that the enzymes in the solvent exist as protein-lipid com-

plexes and do not sediment at low centrifugal forces (see methodology). Although we have not explored whether, under our conditions, the enzymes possess catalytic activity in the solvent, as do other enzymes [5,12,14], it is remarkable that the highly complex multi-subunit ATPase and cytochrome oxidase [8,9] acquire high thermostability when transferred to toluene.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Organization of American States, CONACYT (México) and the Ricardo J. Zevada Foundation.

#### REFERENCES

- [1] Kausman, W. (1959) *Adv. Protein Chem.* 14, 1-63.
- [2] Tanford, C. (1968) *Adv. Protein Chem.* 23, 121-282.
- [3] Ahern, T.J. and Klivanov, A.M. (1985) *Science* 228, 1280-1284.
- [4] Klivanov, A.M. (1983) *Adv. Appl. Microbiol.* 29, 1-28.
- [5] Zaks, A. and Klivanov, A.M. (1984) *Science* 224, 1249-1251.
- [6] Darszon, A., Phillip, M., Zarco, J. and Montal, M. (1978) *J. Membrane Biol.* 43, 71-90.
- [7] Ayala, G., Nascimento, A., Gómez-Puyou, A. and Darszon, A. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 810, 115-122.
- [8] Capaldi, R.A., Malatesta, F. and Darley-Usmar, V.M. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 726, 135-148.
- [9] Hatefi, J. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* 54, 1015-1069.
- [10] Barranco, J., Darszon, A. and Gómez-Puyou, A. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 1402-1408.
- [11] Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. and Racker, E. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 3322-3329.
- [12] Takahashi, K., Nishimura, H., Yoshimoto, T., Sart, Y. and Inada, Y. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 261-270.
- [13] Inada, Y., Nishimura, H., Takahashi, K., Yoshimoto, T., Saha, A.R. and Saito, Y. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122, 845-850.
- [14] Zaks, A. and Klivanov, A.M. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3192-3196.
- [15] Douzou, P. and Petsko, G.A. (1984) *Adv. Protein Chem.* 36, 245-361.

### III. DISCUSION

En los trabajos que hemos publicado se muestra que una metodología que inicialmente resultó de mucha utilidad para poder incorporar proteínas de membrana en sistemas modelo (1,32), se puede utilizar para extraer a solventes orgánicos varias proteínas de membrana a partir de membranas biológicas aisladas. Utilizando partículas submitocondriales o mitocondrias, se observó que ciertas proteínas se particionaban en mayor proporción al solvente (25). Nuestros datos muestran que la citocromo oxidasa se transfiere en mayor proporción que las otras enzimas que se estudiaron. Este resultado está de acuerdo con lo reportado recientemente por Leser y colaboradores (47) quienes estudiaron la partición de diferentes proteínas a un sistema micelar formado por bis (2-etil-hexil) sulfosuccinato de sodio AOT en isooctano/agua. Se encontró que la eficiencia de partición al sistema micelar fue diferente para las diferentes proteínas estudiadas. Además también reportaron que factores externos tales como pH o sales afectan la solubilización de las proteínas al sistema micelar. Es posible por lo tanto que se puedan desarrollar métodos de purificación de enzimas con solventes orgánicos que contienen agentes tensoactivos.

Por otro lado, una ventaja de esta metodología es que nunca se utilizan detergentes artificiales. Por lo que evita los efectos que éstos puedan tener sobre las enzimas; además se evita el problema de la eliminación posterior del detergente.

Existen actualmente varios reportes en los que se han utilizado los solventes orgánicos que contienen agentes tensoactivos para solubilizar proteínas. Estas normalmente han sido proteínas solubles y de

bajo peso molecular. En contraste nosotros reportamos la transferencia de enzimas que poseen estructuras altamente complejas y formadas por varias subunidades.

Posibles estructuras de los complejos lipo-protéicos en solventes orgánicos.

La figura 1 muestra las posibles estructuras que se forman cuando las proteínas se solubilizan en solventes orgánicos que contienen agentes tensoactivos. Para aceptar dichos modelos se debe postular que la estructura que permite la solubilización de proteínas en solventes orgánicos son micelas invertidas y también se supone que la solubilización de los biopolímeros no afecta la forma de la micela.

Para el caso de proteínas hidrofílicas y de bajo peso molecular, como sería el caso del citocromo c, se esperaría que ésta ocupara el núcleo de la micela como se muestra en la Fig. 1a.

En la figura también se muestran otros modelos de cómo las proteínas se pueden localizar en la micela, particularmente si la proteína no es muy hidrofílica. Para proteínas altamente hidrofóbicas, como es el caso de la citocromo oxidasa o la parte hidrofóbica de la ATP sintetasa, es muy probable que la proteína interactúe con el solvente orgánico.

Un ejemplo como el anterior se encuentra en la rodopsina, que es una proteína transmembranal con dos regiones hidrofílicas y un segmento hidrofóbico. Ramakrishnan (44) y colaboradores estudiaron los complejos rodopsina-fosfolípidos en hexano. Ellos proponen un modelo en donde el núcleo de las micelas invertidas formada por los fosfolípidos

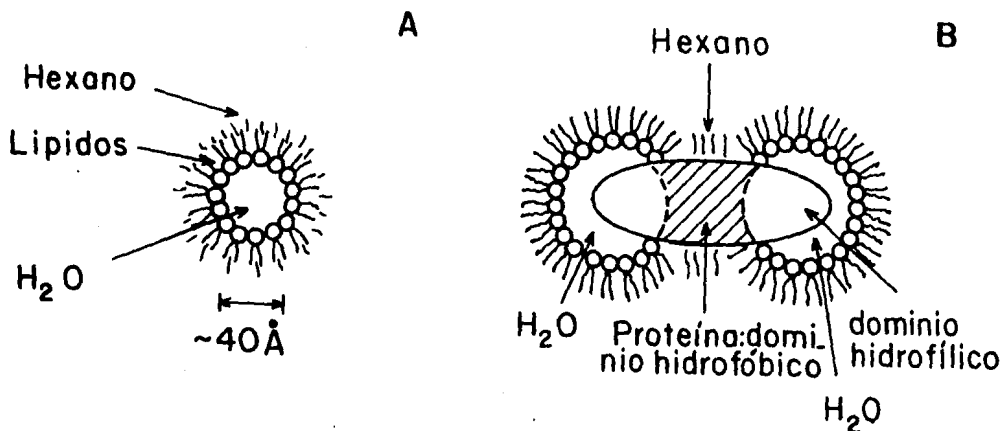
contiene las regiones polares. Mientras que el dominio hidrofóbico que está en contacto con el solvente actúa como un puente conectando, dos micelas como ilustra en la fig. 4.

Como podemos ver, las características de la proteína y las restricciones que existen por las características propias de las micelas, es decir tamaño, forma y contenido de agua son determinantes en las estructuras que se pueden formar en el sistema micelar. De acuerdo con lo anterior se pensaría que las proteínas solubles y de bajo peso molecular formarían estructuras simples (Fig. 1a). Pero a medida que el tamaño de la proteína aumenta y se vuelve más hidrofóbica, las estructuras que se pueden tener son más complejas. Así pudimos ver como la rodopsina que es una proteína de un peso molecular de 37,000 requirió de dos micelas invertidas (Fig. 4) para que ésta pudiera existir en el solvente orgánico. La estructura representada en la figura 4b es la que se formaría con un monómero de rodopsina. Sin embargo, los datos de análisis de difracción de rayos X de los complejos rodopsina-fosfolípidos, indican la formación de agregados constituidos de 200 a 300 monómeros. Por lo que se propone que los complejos rodopsina-fosfolípidos formarían una estructura como la que está esquematizada en la figura 1e. Ahora si se trata de tener un modelo para la ATPasa y la citocromo oxidasa, que son mayores que la rodopsina, se tendría que postular una estructura aún más compleja.

Posible Localización de la  $H^+$ -ATPasa y la Citocromo Oxidasa en el Solvente Orgánico.

La  $H^+$ -ATP sintetasa de membrana mitocondrial es una enzima multimérica que posee de 16-21 subunidades y un peso molecular de 500,000.

Figura 4



REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS POSIBLES ESTRUCTURAS QUE PUEDEN FORMARSE EN EL EXTRACTO DE HEXANO. A) MICELA INVERTIDA DE FOSFOLÍPIDOS CON UN NÚCLEO HIDROFÍLICO. B) COMPLEJOS HIDRATADOS RODOPSINA-FOSFOLÍPIDOS EN DONDE LA PROTEÍNA ACTÚA COMO UN PUENTE ENTRE DOS MICELAS INVERTIDAS.

Tomado de Venkatraman, R., Ramakrishnan, Alberto

Darszon and Mauricio Montal (1983) J. Biol. Chem.

258 No. 8: 4851-4860.

Está constituida por dos regiones; la  $F_0$  embebida en el interior de la membrana responsable de la translocación de protones; y el sector catalítico  $F_1$  que es hidrofílica y se proyecta hacia la matriz mitocondrial. Nuestros datos muestran que la  $H^+$ -ATP sintetasa se pudo transferir al solvente orgánico. Algunas de las preguntas que surgen en relación a esto, son: ¿cómo se encuentra la  $H^+$ -ATPasa en el solvente orgánico? ¿se transfirieron el complejo  $F_1$ - $F_0$  unidos?. Siendo que la  $F_1$  tiene una forma más o menos esférica con un diámetro de 90 Å (51) y que es hidrofílica se pensaría que su solubilización en el solvente orgánico fue posible porque ésta podría ser albergada en el interior de la micela. Esto considerando que el radio de una micela invertida puede llegar a valores superiores a los 100 Å ( $w_0=50$ ). Este valor se ha determinado para micelas invertidas, cuando éstas no contienen proteínas, sin embargo existen datos (34) que indican que cuando las micelas albergan proteínas el  $w_0$  incrementa con respecto al valor de la micela vacía. En nuestro sistema el contenido de agua para micelas de fosfolípidos en tolueno fue de 1.19 ul mientras que cuando se solubilizaron proteínas el contenido aumentó a 13 ul que corresponde a un  $w_0=40$  (53). Esto sugiere que las micelas invertidas formadas por los fosfolípidos serían lo suficientemente grandes para albergar a la  $F_1$ . En cuanto a la  $F_0$  se esperaría que ésta estuviera en contacto con el solvente orgánico, formándose una estructura similar a la que está esquematizada en la figura 1b. Con la  $F_1$  (hidrofílica), en el interior de la micela y la  $F_0$  (hidrofóbica) en contacto con el solvente.

Mientras tanto para la citocromo oxidasa que es una proteína multimérica con un peso molecular de 160,000 y que tiene dos grandes

porciones hidrofílicas, una que se proyecta hacia la región acuosa de la mitocondria o matriz mitocondrial, (20 Å) y otra hacia el espacio acuoso externo o intramembranal (55 Å), se puede considerar que el arreglo sea de tal manera que la región central de la proteína esté en contacto con el solvente, en tanto que las regiones polares de la enzima están en contacto con el núcleo de la micela invertida (Fig. 5).

#### Termoestabilidad en el Solvente Orgánico.

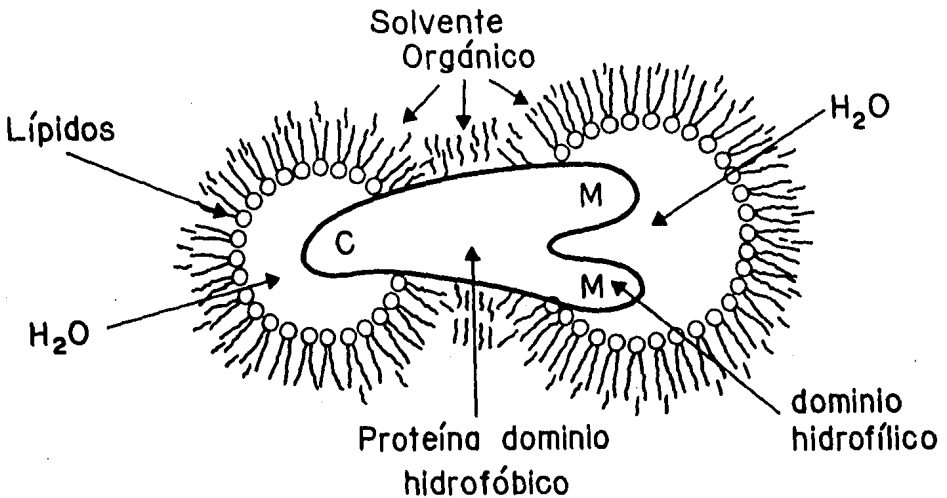
Los resultados reportados en el segundo trabajo en donde se estudió la termoestabilidad de dos enzimas de membrana y multiméricas muestran que el contenido de agua en el sistema fosfolípido/solvente orgánico es determinante en la termoestabilidad de la citocromo oxidasa. Si pensamos que la citocromo oxidasa se encuentra en el solvente orgánico como se muestra en la figura 5, el bajo contenido de agua en el sistema es el que determina que la enzima resista las altas temperaturas. De hecho se ha demostrado que el agua participa en la inactivación térmica (29, 31 y 40).

Nuestros datos muestran que cuando el agua de los extractos de tolueno se reduce (tabla 1, segundo trabajo) la termoestabilidad de la citocromo oxidasa, aumenta. El mecanismo de inactivación térmica de las enzimas no se conoce con precisión, sin embargo algunas rutas parecen estar bien establecidas (40). Lo primero que ocurre en la termoinactivación de las enzimas es la pérdida de la estructura terciaria, ésta se mantienen por diferentes fuerzas: Van der Waals, puentes de hidrógeno, e interacciones hidrofóbicas e iónicas. A medida que la temperatura aumenta dichas fuerzas disminuyen (a excepción de



## Figura 5

### Citocromo Oxidasa



MODELO HIPOTÉTICO DE LA CITOCROMO OXIDASA EN EL EXTRACTO DE TOLUENO. LA CITOCROMO OXIDASA ES UNA PROTEÍNA TRANSMEMBRANAL EN FORMA DE Y (49) CON DOS REGIONES QUE SOBRESALEN HACIA LA MATRIZ (M) Y CON UNA REGIÓN EN CONTACTO CON EL CITOPLASMA (C). ÉSTAS REGIONES SON HIDROFÍLICAS Y POR LO TANTO, SE ENCUENTRAN DENTRO DEL NÚCLEO DE LA MICELA INVERTIDA, MIENTRAS QUE LA REGIÓN HIDROFÓBICA SE ENCUENTRA EN CONTACTO CON EL SOLVENTE.

Tomado de Escamilla, E. Ayala, G., M. Tuena de Gómez

Puyou and Darszon A. (en prensa).

las interacciones hidrofóbicas) perdiéndose la estructura terciaria y la proteína adquiere una conformación desordenada, ésto resulta en un desarreglo del centro activo y pérdida de la actividad catalítica.

Un factor muy importante para que ocurra la inactivación térmica es la presencia de agua, ésta interviene permitiendo la movilidad conformacional de la proteína para que ésta pueda desenrollarse (29). Esto significa que si las enzimas son colocadas en un medio con bajo contenido de agua, la estabilidad térmica de la proteína aumentará. Experimentos como éstos han sido realizados por Zaks y colaboradores (29). Ellos estudiaron la estabilidad térmica de la lipasa pancreática solubilizada en solventes orgánicos, encontrándose que su estabilidad térmica aumentaba a medida que el contenido de agua en el solvente orgánico disminuía. Así en un medio que contenía 0.015% de agua, la vida media de la enzima a 100°C fue de 12 horas.

Por lo anterior podemos pensar que el aumento en termoestabilidad de la ATPasa y citocromo oxidasa en nuestro sistema se podría explicar como una consecuencia de la reducción de agua dentro de la micela. Como se ha mencionado antes cuando la concentración de agua en el interior de una micela invertida es baja, sus propiedades físicas tales como: polaridad, viscosidad, movilidad molecular, y capacidad calorífica son diferentes a las del agua libre (41). Entonces no es simplemente la baja concentración de agua, la causa del aumento en termoestabilidad, es el hecho de que el agua cambia sus propiedades cuando se encuentra en el sistema micelar. Ya que en sistemas biológicos tales como la matriz mitocondrial donde la concentración de agua es también baja (52) no resisten el calentamiento. Así la resistencia

al calor de la ATPasa se debe a la baja concentración de agua y a sus nuevas propiedades en el sistema micelar. De hecho se ha descrito que la actividad catalítica de muchas enzimas que se han estudiado depende del contenido de agua dentro de la micela invertida (13).

## PERSPECTIVAS

Los datos presentados en estos trabajos junto con los reportados por diferentes grupos, indican que es posible tener a las proteínas en sistemas ternarios de solvente orgánico/tensoactivo/agua. Las proteínas en estos sistemas presentan mayor resistencia de desnaturalización por calor y cambios en sus propiedades catalíticas.

La utilización de sistemas ternarios formados por: solvente orgánico, fosfolípidos y agua, para la solubilización de proteínas, es una metodología reciente, que ha despertado un gran interés.

Sin embargo, aún es necesario un gran número de estudios ya que existen muchos aspectos de estos sistemas que no se han precisado, como serían: ¿Cuáles son las estructuras que se forman cuando se solubilizan proteínas multiméricas?; ¿se altera la conformación de las proteínas en el sistema micelar?; ¿cambia el contenido de agua dentro de la micela, cuando éstas contienen proteínas?; ¿cuál es la localización y estructura en el interior de la micela de otros componentes por ejemplo: iones, sustratos, inhibidores y agua?. Cuando se tenga la respuesta a estas preguntas, se podrán hacer caracterizaciones precisas de las enzimas solubilizadas en sistemas micelares.

Una de las principales propiedades de los sistemas micelares es

que contienen al menos dos fases bien definidas, la fase acuosa en el interior de la micela y la fase orgánica que la limita. Esto permite que las sustancias disueltas en dichos sistemas elijan, de acuerdo a su naturaleza (hidrofóbica-hidrofílica) el microambiente óptimo. Desde el punto de vista biotecnológico los sistemas micelares ofrecen ventajas; como sería por ejemplo, realizar reacciones catalíticas con enzimas cuyos sustratos son insolubles en agua; como en el caso de las lipasas.

Por otro lado, como ya se ha mencionado antes, las enzimas disueltas en solventes orgánicos con la ayuda de micelas invertidas presentan propiedades diferentes a las observadas en medios acuosos. Así tenemos que las enzimas en el sistema micelar pueden cambiar la especificidad por el sustrato, presentar "superactividad" y resistir altas temperaturas, lo que ampliaría su utilización en los procesos industriales.

Por último los sistemas ternarios formados por solvente orgánico, agente tensoactivo y agua, ofrecen microambientes que permitan el funcionamiento de muchas enzimas, como ya citamos en el caso de las lipasas para las cuales la existencia de la interfase es una condición obligatoria para la actividad catalítica. Los logros en la enzimología micelar en los últimos años, tanto en los aspectos fundamentales como en los aplicados son una buena razón para esperar un rápido progreso en este campo.

## BIBLIOGRAFIA GENERAL

1. Montal, M., Darszon, A., and Schindler, H.G. (1981) Q. Rev. Biophys. 14: 1-79.
2. Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T., and Wescott, W.C. (1962) Nature London 194: 979-981.
3. Montal, M., Mueller, P. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 3512-3566.
4. Folch, J. and Less, M. (1951) J. Biol. Chem. 191: 807-817.
5. Folch-Pi, J., and Stoffyn P.J. (1972) Ann. N.Y. Acad. Sci. 195: 86-107.
6. Das, M. L. and F.L. Crane (1964) Biochemistry 3 No. 5 May: 696-700.
7. Sigrist, H., Sigrist-Nelson, R., and Gitler, C., (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 178-184.
8. Nelson, N., Eytan, E., Ostani, B.E. Sigrist, H., Sigrist-Nelson, K., and Gitler, C. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 24, 2375-2378.
9. Higashi, Y., Siwert, G., and Strominger, J.L. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3683-3690.
10. Montal, M., (1974) In Perspectives in Membrane Biology (Estrada, S. and Gitler, C. eds.) pp. 591-622 Academic Press New York.
11. Carlos Gitler and Mauricio Montal (1972) Biochemical and Biophysical Research Communication 47: 1486-1491.
12. C. Gitler and M. Montal (1972) FEBS Letters 28: 329-332.
13. Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N., Khmelnitri, Y.L., and Berezin, L.V. (1986), Eur. J. Biochem. 155 453-468 FEBS.
14. Luisi, P.L., Henninger, F., Joppich, M., Dossena, A. and Casnati,

- G. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74: 1384-1389.
15. Fendler, J.H., *Membrane Mimetic Chemistry*, John Miley and Sons. New York, 1982.
  16. Visser, A.J.W.G. and Janos, H., Fendkler (1982) *J. Phys. Chem.* 86: 947-950.
  17. Darszon, A., Strasser, R.J. and Montal, M. (1979) *Biochemistry* 18: 5205-5213.
  18. Darszon, A., Vandenberg, C.A., M. Schonfeld, M.H., Ellisman, N.C. Spitzer and M. Montal (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, No. 1 pp 239-243.
  19. Schonfeld, M., Montal, M., and Feher, G. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6351-6355.
  20. Holloway, P.W. (1973) *Anal. Biochem.* 53: 304-308.
  21. Darszon, H., Vandenberg, C.A., Ellisman, M.H. and Montal M., (1979) *J. Cell. Biol.* 81: 446-452.
  22. Schonfeld, M., Montal, M., and Feher, G. (1980) *Biochemistry* 19: 1535-1542.
  23. A. Darszon, M. Philipp, J. Zarco and M. Montal (1978) *J. Membrane Biol.* 43: 71-90.
  24. Schonfeld, M., Montal, M., and Feher, G.G. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 6351-6355.
  25. Darszon, A., and Armando Gómez-Puyou (1982) *Eur. J. Biochem.* 121: 427-433.
  26. Dastoli, F.R., Musto, N.A. and Price, S., (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 115: 44-47.
  27. Dastoli, F.R., and Price, S. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 118, 163-165.

28. Dastoli, F.R. and Price, S. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 112, 289-291.
29. Zaks, A., and Klivanov, A.M. (1984) Science 224: 1249-1251.
30. A. Zaks and A.M. Klivanov (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3192.
31. T.J. Ahern, and A.M. Klivanov (1985) Science 228: 1280.
32. A. Darszon (1983) J. Bioeng. and Biomem. 15: No. 16: 321-334.
33. Leser, Martin, E., Wei, Genshican, Luisi P. Luigi, Maestro Marco (1986) Biochem. and Biophysical Res. Communication 135, No. 2: 629-635.
34. Luisi, P.L. and Magid, J.J. (1986) C.R.C. Critical Rev. Biochem. 20: 409-474.
35. Ramakrishnan, V., Darszon, A. and Montal, M. (1983) J. Biol. Chem. 258: 4857-4860.
36. Wong, M., Thomas, J.K. and Nawak, T. (1977) J. Am. Chem. Soc. 99. 4730-4736.
37. Maitra, A. (1984) J. Phys. Chem. 88: 5122-5125.
38. Huang, S.B., Korenbrot, N.I. and Stoeckenius, N. (1977) Memb. Biol. 36: 115-136.
39. Escamilla, E., Ayala, G., M. Tuena de Gómez-Puyou, A. Gómez-Puyou and Darszon, A. enviados para su publicación.
40. Klivanov, A.M. (1983) Adv. Appl. Microbial 29: 1-28.
41. Tsuju, K., Sunamoto, J. and Fendler (1983) Bull. Chem. Soc. Jpn. 56: 2889-2893.
42. Bangham, A.D., Standish, M.M. and Watkins, J.C. (1965) J. Mol. Biol. 13: 238.
43. Darszon, A. (1982) Vision Res. 22: 1443-1446.
44. Venkatram, R., Ramakrishnan, Alberto Darszon and Mauricio Montal

- (1983) J. Biol. Chem. 258: No. 8: 4851-4860.
45. K. Martinezk, A.V. Levashov, N.L. Klyachko, V.L. Pantin and I. Berezin, B.B.A. 657, (1981) 277-294.
  46. Luisi, P.L. (1985) Angen. Chem. (Int. Ed. Engl.) 24, 439-450.
  47. Martin, E. Liser, Genshuan Wei, Pier Luigi Luisi and Marco Maestro. Biochemical and Biophysical Research Communication (1986) 135 No. 2 629-635.
  48. A. Delhodde, M., Vacher, C., Nicot, M., Waks, Arch. Biochem. Biophys. 231 (1984) 86.
  49. Capaldi, R.A. (1982) Biochim. Biophys. Acta 694, 291-306.
  50. Yuji, Inada, Hiruyuki Nishimura, Katsunobu Takahashi, Takavuki Yoshimoto, Anutosh Ranjan Saha and Yuji Saito (1984) Biochemical Biophysical Research Communication 122, 2, 845-850.
  51. Yoissef Hatefi (1985) Ann. Rev. Biochem. 54: 1015-69.
  52. Srere, P.A. (1980) Trends Biochem. Sci. 5, 120-121.
  53. Este valor de  $w_0$  se calculó considerando un peso molecular promedio para los fosfolípidos de 750 y asumiendo que todos los fosfolípidos se transfirieron al solvente orgánico.