

00562
3
14

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

"ESTUDIOS SOBRE LA INTERACCION DE LA ATPase MITOCONDRIAL Y SU
INHIBIDOR NATURAL. EMPLEO DE MARCADORES FLUORESCENTES."

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)

PRESENTA LA BIOLOGA:

SILVIA DEVARS RAMOS

México, D.F.

1986

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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

El papel regulador que desempeña el inhibidor natural de la ATPasa en la actividad de la enzima parece ser muy importante. Su efecto principal es el de impedir la hidrólisis del ATP preformando cuando no existe gradiente de protones y es posible que en presencia del gradiente y un elevado potencial de fosfato pueda inhibir a la sintetasa permitiendo que el gradiente se utilice en otros procesos.

En el presente trabajo, el inhibidor natural de la ATPasa mitocondrial aislado se marcó con fluoresceína y con fluorescamina (4-fenilspiro furán 2(3H), 1'-ftalán -3,3'-diona) obteniendo los derivados fluorescentes respectivos. Ambos derivados se obtuvieron con un grado de marcaje que preservó la actividad inhibitoria sobre la enzima. El derivado de la fluorescamina, en condiciones adecuadas de asociación con la enzima presenta un cambio en la intensidad de la fluorescencia debido a la interacción con la enzima que es directamente proporcional a la concentración de ésta. El derivado de la fluoresceína presenta un cambio en la polarización de la fluorescencia que parece deberse a la interacción con la enzima, que es dependiente de la concentración de ésta y de la presencia de nucleótido trifosfato.

La importancia del empleo de derivados fluorescentes de la proteína inhibidora radica en las posibilidades de estudiar su interacción con la ATPasa que permanecen aún inexploradas. La correlación temporal de la interacción de ambas proteínas, así como estudios de topología en los que se requiere un fluoróforo

unido a la enzima para medir transferencia de energía con el
fluróforo unido al inhibidor, son ejemplos de la utilidad que
ofrecen tales derivados.

ABSTRACT

The regulation exerted by the natural ATPase inhibitor on the activity of the enzyme seems to be very important. Its major role is to prevent the hydrolysis of preformed ATP when there is not proton gradient and it is possible that in presence of the gradient and a high phosphate potential it may inhibit the synthetase allowing the gradient to be used in other processes.

In this work, the natural ATPase inhibitor isolated from mitochondria was labeled with fluorescein and with fluorescamine (4-phenylspiro furan 2(3H),1'phtalan 3,3'-dione). Both fluorescent derivatives were obtained with an extent of label which fully preserves the inhibitory activity.

A fluorescence intensity change is observed on the fluorescamine derivative by the presence of the enzyme under association conditions, which is directly proportional to the enzyme concentration.

Fluorescein derivative shows a fluorescence polarization change likely due to the interaction with the enzyme being dependent on the protein concentration and on the presence of triphosphate nucleotide (ATP). The employment of fluorescent labels on the inhibitor protein could be used to study some aspects of its interaction with the enzyme that have not been explored before, as the temporal correlation of the interaction between both proteins and topological studies applying energy transfer technique.

INDICE

Página

Abreviaturas	1
Introducción	
Estructura y Función Mitocondrial	2
Estructura y Función de la ATPasa	7
La Proteína Inhibidora	12
a) Universalidad	13
b) Propiedades fisicoquímicas	14
c) Interacción con la F_1	15
Antecedentes y Objetivo	20
Materiales y Métodos	
1) Obtención de Mitocondrias de Corazón de res	24
2) Preparación de partículas submitocondriales	
a) Obtención de psm.AS	25
b) Obtención de psm.K	26
3) Purificación de ATPasa (F_1)	26
4) Obtención del inhibidor	27
5) Determinación de la actividad ATPasa	30
6) Determinación de la actividad de la proteína	
inhibidora	32
7) Electroforesis en geles de poliacrilamida	33
8) Marcaje fluorescente	34
a) Marcaje con Floram	35
b) Marcaje con FITC	35
9) Medidas de Fluorescencia	35
10) Determinación de proteína	38
Resultados y Discusión	39
I. Marcaje y caracterización de un derivado de la	
proteína inhibidora con floram	39
II. Marcaje y caracterización de un derivado	
fluorescente de la proteína inhibidora con	
isotiocianato de fluoresceína (FITC)	56
Referencias	71

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura #	Titulo	Página
1.	Micrografia electrónica de mitocondrias de hígado de rata	3
2.	Modelo de la topología de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial	6
3.	Esquema de la ATPasa de mitocondrias de corazón de res.....	9
4.	Reacción del Fluram y el FITC con aminas primarias para formar los respectivos derivados fluorescentes.....	22
5.	Electroforesis en gel de poliacrilamida 15% en SDS de inhibidor y F ₁	28
6.	Esquema de las reacciones acopladas para medir ATPasa espectrofotométricamente con sistema re- generador de ATP	31
7.	Esquema de marcaje del inhibidor con FITC	36
8.	Espectros de excitación y emisión no corregidos del inhibidor marcado con Fluram	40
9.	Efecto de diferentes concentraciones de Fluram en el marcaje de la proteína inhibidora	41
10.	Actividad inhibitoria del derivado fluorescente de la proteína inhibidora con diferentes grados de marcaje sobre la ATPasa soluble (F ₁).....	43
11.	Capacidad inhibitoria comparativa de diferentes concentraciones de inhibidor nativo y marcado con Fluram sobre la actividad ATPasa de partículas AS	44
12.	Capacidad inhibitoria comparativa del inhibidor marcado con Fluram y sin marcar, sobre la actividad ATPasa soluble y particulada	46
13.	Estabilidad de la fluorescencia y actividad inhibitoria a 4°C del inhibidor marcado con Fluram	48
14.	Estabilidad de la intensidad relativa de la fluorescencia del inhibidor marcado con Fluram a 4° y 0°C	50

15.	Cambios de intensidad de la fluorescencia del inhibidor marcado en función de la concentración de F_1	53
16.	Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS de inhibidor marcado con Fluram	55
17.	Espectros de excitación y emisión no corregidos del inhibidor marcado con FITC	57
18.	Curva de actividad del inhibidor marcado con FITC	59
19.	Polarización del inhibidor marcado con FITC en presencia de nucleótido y F_1	60

TABLA

1.	Cambios de intensidad de la fluorescencia del inhibidor marcado con Fluram inducidos por F_1 ...	51
2.	Cambios de intensidad de la fluorescencia del inhibidor marcado con Fluram inducidos por F_1 ...	52
3.	Polarización de la fluorescencia del inhibidor marcado con FITC en presencia de nucleótido y F_1	63
4.	Efecto de dilución sobre la polarización de la fluorescencia del inhibidor marcado con FITC	64
5.	Polarización de la fluorescencia del inhibidor marcado con FITC en presencia del nucleótido y F_1	65

ABREVIATURAS

ADP	adenosina 5'difosfato
ATP	adenosina 5'trifosfato
ATPasa,	
H+ATPasa	adenosina-5'-trifosfatasa
Dansilo	1-dimetil amino naftaleno 5-sufonilo
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilén diamino tetraacético
F ₁	factor de acoplamiento 1 de la ATPasa
FITC	6-isotiocianato de fluoresceina
Fluram,	
Fluorescamina	4-fenilespiro furán-2(3H),1'-ftalán -3,3'-diona
MES	ácido 2(N-morfolino) etano sulfónico
PM	peso molecular
SDS	dodecil sulfato de sodio
Sefadex	Sephadex
Sefarosa	Sepharose
TCA	ácido tricloro acético
TMED	N'N'N' Tetrametilén diamina
Tris	tris(hidroxiometil)amino metano

INTRODUCCION

ESTRUCTURA Y FUNCION MITOCONDRIAL

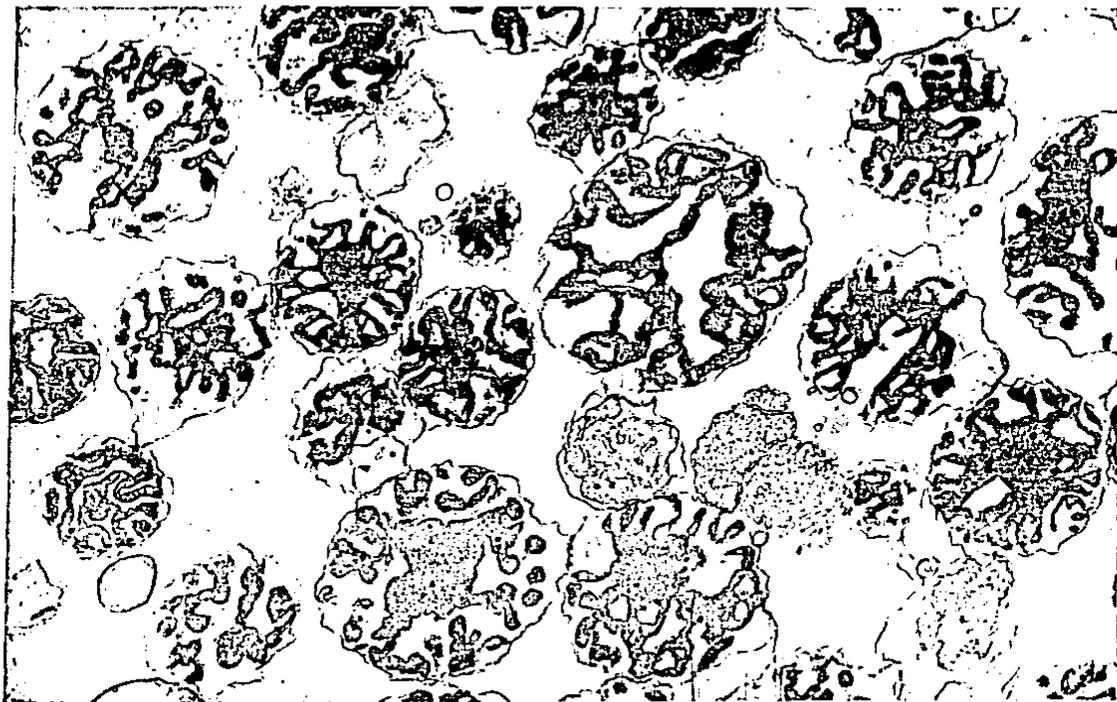
Desde 1949 quedó demostrado que el sitio donde se lleva a cabo la respiración celular, es la mitocondria (1,2). Dicho proceso consiste en la transformación de una parte de la energía contenida en los alimentos, en el enlace de alta energía del ATP. Debido a que la fosforilación del ADP a ATP es impulsada por la oxidación de los sustratos por el oxígeno molecular a través de la cadena respiratoria, dicho proceso recibe el nombre de fosforilación oxidativa (3).

El número, tamaño, forma y localización intracelular de las mitocondrias varía de un tipo celular a otro (4) pero están presentes en el citoplasma de todas las células de los distintos eucariontes: protistas, hongos, plantas y animales.

La mitocondria es un organelo de doble membrana (5), que contiene en su interior un gel denso llamado matriz mitocondrial, en el que se encuentran DNA (6), ribosomas y otros factores necesarios para la síntesis de proteínas, aunque el DNA mitocondrial codifica para solo un 5% de sus proteínas estructurales, siendo el resto codificado por el genoma nuclear (7).

En la matriz mitocondrial se encuentran también las enzimas del ciclo del Ácido cítrico o ciclo de Krebs (excepto la succinato deshidrogenasa) y las de otros procesos relacionados con la fosforilación a nivel de sustrato, la carboxilación del piruvato y del fosfopiruvato, la oxidación del glutamato, las

Figura 1. Micrografía electrónica de mitocondrias aisladas de hígado de rata.



Micrografía electrónica aumento final de 28000 x (tomada por el Dr. Alfonso Cárabez T. de la Unidad de Microscopía Electrónica del Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

transaminaciones, la síntesis de citrulina y la oxidación de los ácidos grasos (8). En la figura 1, la matriz mitocondrial corresponde a las zonas de color obscuro.

La membrana externa mitocondrial es lisa y tiene una relación lípido/proteína 2 o 3 veces mayor que la membrana interna (9), es rica en colesterol (10) y en ella se localizan diversas enzimas como la NADH-citocromo c reductasa insensible a rotenona (11), la monoamino oxidasa (12) y varias enzimas involucradas en el metabolismo de los fosfolípidos (13). También se ha descrito la presencia de una proteína de peso molecular 30 000 llamada porina, que permite la entrada de algunas sustancias (14,15).

En el espacio intermembranal se encuentra la adenilato cinasa (8), las nucleósido mono- y di-fosfocinasas (11,12) la sulfito oxidasa (16) y en la levadura la citocromo c peroxidasa (17), que es sintetizada en el citoplasma como precursor.

La membrana interna se encuentra plegada formando crestas (18), lo cual le confiere una mayor superficie. Es altamente selectiva en cuanto a su permeabilidad (19) y contiene una alta concentración de proteínas integrales, como lo demuestran las micrografías electrónicas de criofractura (20). El fosfolípido cardiolipina, que se encuentra casi exclusivamente en la mitocondria, se localiza solamente en esta membrana (9). En la membrana mitocondrial interna se localizan los componentes de la cadena respiratoria (21) y de la fosforilación oxidativa (22), así como la nicotinamida nucleótido transhidrogenasa (8), la - hidroxibutirato deshidrogenasa (22), la carnitín transferasa de

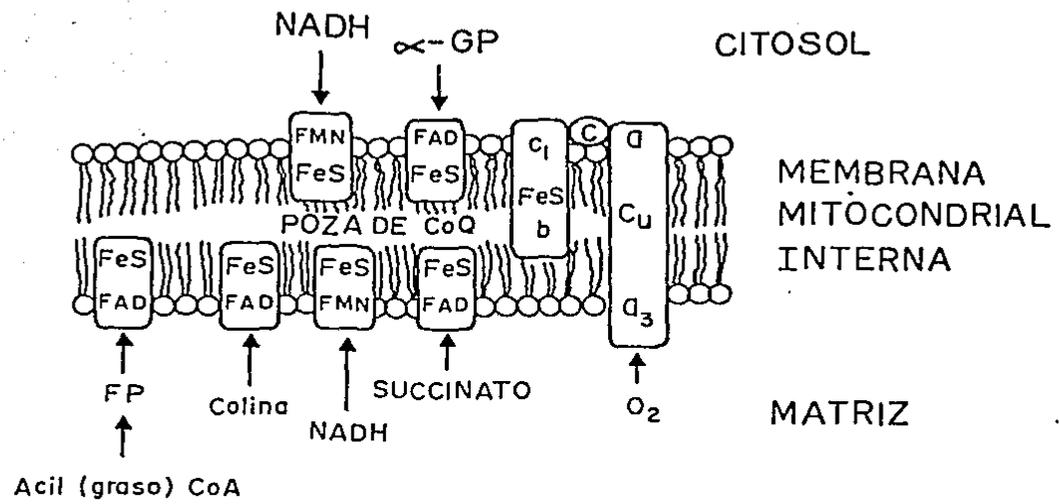
los ácidos grasos (23) y dos enzimas involucradas en la síntesis del grupo hemo, la ferroquelatasa y la delta-amino levulínico sintetasa (24). Ver figura 1.

La asimetría característica de todas las membranas biológicas resulta de particular interés en la membrana interna mitocondrial, ya que la topología de sus componentes está involucrada en el mecanismo de la fosforilación oxidativa.

Debido a la asimetría, los grupos prostéticos de la NADH- y de la succinato-ubiquinona reductasas están orientados hacia la matriz mitocondrial (lado "M"). La ubiquinona y ubiquinol-citocromo c reductasa son probablemente inaccesibles a ambos lados de la membrana, mientras que el citocromo c₁, se localiza en el lado citosólico (lado "C"), donde se localizan también los citocromos c y a. La citocromo oxidasa atraviesa la membrana exponiendo su sitio reactivo al O₂ (citocromo a₃) hacia el lado "M". También orientados hacia el lado "M", se encuentran los sitios catalíticos de la transhidrogenasa del NADH, las deshidrogenasas del β-hidroxiubutirato y de la colina y la de la flavoproteína, grupo prostético de la deshidrogenasa succínica, que cede los electrones a los citocromos. Hacia este lado se encuentra orientado también el sitio catalítico de la ATPasa, que del mismo modo que las otras unidades transductoras de energía que translocan protones (complejos I, III y IV y transhidrogenasa), atraviesa completamente la membrana (25). Ver figura 2.

Aunque se desconoce en la actualidad el origen evolutivo de las mitocondrias, se han sugerido dos teorías diferentes para explicar su adquisición por las células eucariontes: como

Figura 2. Modelo de la topología de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial.



Se indican con flechas los sitios de entrada de los electrones provenientes de distintos sustratos. Abreviaturas utilizadas: α-GP, alfa glicero fosfato; Co, coenzima; FP, flavoproteína; FAD, flavín-adenín-dinucleótido; FeS, centros hierro-azufre; c₁, b, c, a y a₃, citocromos.

resultado de una evolución gradual y continua en la que la membrana plasmática del ancestro procarionte originó ambas membranas mitocondriales (26), o bien como resultado de una evolución abrupta en que una célula procarionte quedó integrada como endosimbionte de otro procarionte de mayor tamaño (27) en cuyo caso, las membranas mitocondriales tendrían su origen en la membrana plasmática del endosimbionte.

ESTRUCTURA Y FUNCION DE LA ATPasa.

El papel de la ATPasa durante la fosforilación oxidativa consiste en acoplar el regreso de los protones, previamente expulsados durante el transporte de electrones, hacia el interior de la mitocondria, a la síntesis de ATP (28).

La estructura fundamental de las H⁺-ATPasas eucariontes, que se localizan en las mitocondrias y los cloroplastos, es similar a las del tipo procarionte, localizadas en la membrana plasmática de bacterias aeróbicas y anaeróbicas (29).

La ATPasa mitocondrial consta de 3 componentes fundamentales: F₀, F₁ e I. El factor de acoplamiento F₀ es la porción del complejo embebida en la membrana, cuya función es permitir el paso de protones de un lado a otro de la membrana. El factor de acoplamiento F₁ es la porción catalítica de la enzima que participa directamente en la síntesis e hidrólisis del ATP. I es una proteína reguladora de bajo peso molecular cuya función principal es evitar la hidrólisis del ATP recién sintetizado (30).

La porción F₁ separada del resto del complejo por sonicación

(31), tiene un peso molecular de 360 000 daltones y puede ser disociada en 5 subunidades distintas: alfa, beta, gama, delta y epsilon, cuyos pesos moleculares aparentes estimados por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS son: 53, 50, 33, 15 y 9 kilodaltones respectivamente (32). La estequiometría más probable parece ser 3:3:1:1:1 según evidencia acumulada en los últimos años en las enzimas obtenidas de bacterias (33,34), mitocondrias de levadura (35,36) e hígado de rata (37).

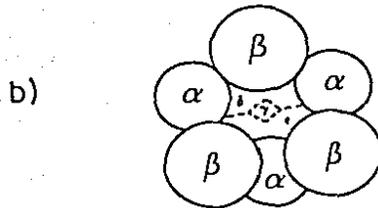
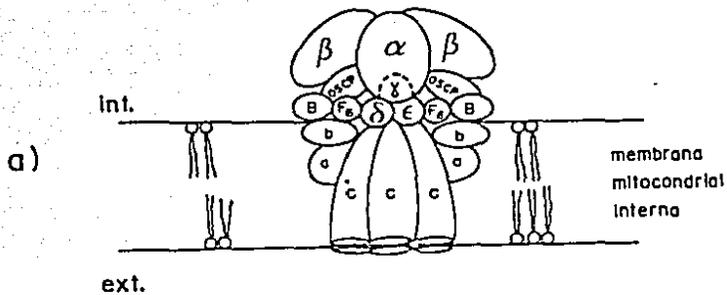
Función de las subunidades.

Se han descrito 6 sitios de fijación de nucleótidos en F_1 (38, 41), de los cuales 3 son recambiables y 3 no recambiables (42). Los primeros se consideran los sitios catalíticos de la enzima y a los últimos, también llamados "fuertemente unidos", se les ha atribuido un papel estructural o bien alostérico (43-45).

La subunidad alfa se considera el sitio de unión de los nucleótidos fuertemente unidos (46), ya que éstos se fijan con alta afinidad en ausencia de Mg^{++} y se disocian muy lentamente. La subunidad beta contiene el sitio de adenín nucleótidos recambiables que se considera el catalítico, lo cual ha quedado establecido por diversos tipos de estudios. Se ha demostrado, por ejemplo, que los análogos de adenín nucleótido y otros compuestos que inhiben la catálisis se unen exclusivamente a dicha subunidad (47-51), así como el análogo de P_i : 4-azido 2-nitro fenilfosfato (52).

Los experimentos de reconstitución con las subunidades aisladas de E. coli, demostraron que la combinación mínima de subunidades que presenta actividad hidrolítica del ATP es alfa-

Figura 3. Esquema de la ATPasa de mitocondrias de corazón de res.



Se muestra el probable arreglo de las subunidades del complejo en una vista lateral (a) y en vista apical (b). El factor de acoplamiento F_1 , que contiene las subunidades α , β , γ , δ y ϵ , se une al factor F_0 que contiene las subunidades a , b y c a través de los factores de acoplamiento $OSCP$, F_6 y B . Ver en el texto las evidencias experimentales de este modelo.

beta-gama (46). Debido a que gama no une nucleótidos, se considera que juega un papel de organizador en dicho trimero. Por otro lado, la fijación de delta y epsilon a F_0 no impide el paso de protones, solamente cuando se añade también gama al flujo se detiene (53), según experimentos realizados con las proteínas purificadas de la bacteria termófila PS3; esto sugiere que la subunidad gama funge también como "tapón" o compuerta de paso de los protones. Ver figura 3.

El acoplamiento entre la utilización del gradiente de protones y la producción de ATP, depende de la correcta interacción entre los sectores F_1 y F_0 de la ATPasa (54). Las subunidades de la F_1 que parecen estar implicadas en la interacción con F_0 en la enzima de bacterias, son las subunidades más pequeñas: delta y epsilon (46,53), haciendo la conexión a través de la subunidad gama. Sin embargo, en la ATPasa mitocondrial, la unión de F_1 a F_0 depende además de proteínas adicionales que no se han encontrado en el sistema bacteriano: la OSCP (proteína que confiere sensibilidad a oligomicina) de 18 000 daltones (55), el factor 6 o F_6 (56,57) de 9400 daltones (58) y el factor B de 14 600 daltones (59).

La subunidad delta purificada de mitocondrias de corazón de res, es capaz de evitar el flujo de protones que ocurre espontáneamente en membranas despojadas de F_1 (60). Por otro lado, estudios en la H^+ -ATPasa de cloroplasto con reactivos mono- y bifuncionales (61) han demostrado que la subunidad gama sufre cambios conformacionales que inducen la apertura o cierre del paso de los protones por la subunidad delta.

Además de las subunidades descritas existe una proteína

inhibidora en las ATPasas de mitocondrias de mamifero (62,63) y levadura (64,65) cuya función, se ha sugerido, es realizada por la subunidad epsilon en la ATPasa de bacterias (66-68) y probablemente también en cloroplasto (69). El presente estudio se refiere al inhibidor natural de la ATPasa de mitocondrias de corazón de mamifero, por lo que será objeto de una descripción detallada más adelante.

El sector membranal del complejo ATP-sintetasa (F_0), ha sido menos estudiado debido a las dificultades técnicas que ofrecen para su estudio las proteínas intrínsecas de membrana. En bacterias, parece estar formado por 3 polipéptidos distintos (70), en cloroplastos por 3 ó 4 (71) y en mitocondria probablemente por un número mayor (72). De la F_0 del sistema mitocondrial de animales se han purificado y caracterizado: un proteolípido de alrededor de 10 000 de peso molecular que une DCCD (diciclohexil carbodiimida) inhibiendo específicamente el transporte de protones, otra proteína de aproximadamente 30 000 daltones que une desacoplante y un polipéptido de 28 000 daltones de peso molecular (73). En este sistema, se considera también parte del sector F_0 a los ya mencionados factores OSCP, F_0 y F_6 .

El sector F_0 forma el canal por donde los protones pasan hacia el sector F_1 de la ATPasa durante la síntesis de ATP acoplada al gasto del gradiente electroquímico. La naturaleza de dicho acoplamiento, que explicaría el mecanismo de acción de la enzima, se desconoce hasta la fecha. El estudio de los componentes de la ATPasa, precisamente pretende llegar a establecer el mecanismo molecular de la síntesis del ATP.

LA PROTEINA INHIBIDORA

Ya que en la mitocondria las reacciones acopladas del transporte de electrones y de síntesis de ATP se encuentran cercanas al equilibrio (74), el cambio total de energía libre para la fosforilación oxidativa tiende a cero en condiciones de estado estable. Esto implica que en condiciones de alto potencial de fosfato y sustrato oxidable limitante, se vería favorecida la reversión total del proceso: es decir la hidrólisis de ATP y el transporte de electrones en reversa. Si esto ocurriera el ATP formado por la H^+ -ATPasa podría ser hidrolizado por ella misma sin utilidad para la célula.

El inhibidor natural de la ATPasa parece ser la estrategia elegida para que esto no suceda, ya que al bloquear cinéticamente a la enzima del paso final de la serie de reacciones en las condiciones mencionadas, hace irreversible el proceso.

Se sabe que la proteína inhibidora ejerce su acción tanto sobre la actividad hidrolítica (62,75), como sobre la sintética (76-78) de la ATPasa. Si suponemos que la enzima se ve inactivada por la presencia del inhibidor en el sitio inhibitorio y solo se activa cuando el inhibidor se disocia de dicho sitio, parece necesario que la disociación sea reversible, de modo que cuando las condiciones favorezcan la reinhibición, el inhibidor pueda regresar rápidamente al sitio inhibitorio.

Por otro lado, se ha sugerido también que la inhibición de la síntesis del ATP en mitocondrias incubadas en presencia de Ca^{++} , por la acción de la proteína inhibidora, permite la utilización

del gradiente electroquímico para el transporte de calcio (79), aunque ésta, seguramente, no es su función más importante in vivo.

Aparentemente, cuando las condiciones son favorables para la hidrólisis del ATP, efectivamente ésta sucede y es una conformación hidrolítica (80) de la enzima la que induce la unión de la proteína inhibidora a la misma, puesto que se ha observado que no basta la presencia de Mg.ATP (81) ó Ca.ATP (79) sino que se requiere su hidrólisis (82).

A la fecha, no está claro si la proteína inhibidora de las H⁺-ATPasas ayuda a suprimir la hidrólisis del ATP mientras la síntesis se está llevando a cabo, o si lo hace inmediatamente después de que ha ocurrido la síntesis para proteger el ATP recién sintetizado (83).

Características de la proteína inhibidora.

a) Universalidad.

Desde su descubrimiento (84) y purificación a partir de mitocondrias de corazón de res en 1963 (62), el inhibidor natural de las H⁺-ATPasas ha sido aislado de diversas fuentes biológicas en las que se ha buscado: mitocondrias de hígado de rata (63, 85) y de levadura (64,65), de cloroplasto (69) y de numerosas especies bacterianas (66-68), en las que, a diferencia de la mitocondria, como ya mencionamos, ha sido identificado como la subunidad epsilon (86). Esto sugiere que su presencia es una característica universal de las H⁺-ATPasas, misma que no comparten con otras ATPasas transportadoras tales como la Na⁺/K⁺

(87) de membrana plasmática, o la de Ca^{++} de retículo sarcoplásmico (88) o de membrana plasmática (89).

b) Propiedades fisico-químicas

La proteína inhibidora tiene un peso molecular estimado por secuencia de aminoácidos (90) de 9578 en mitocondrias de corazón de res, 7383 en levadura (91) y 14397 en *E. coli* (92). Previamente, se estimaron pesos moleculares desde 12300 (85) hasta 9600 (63) para el inhibidor de mitocondrias de hígado de rata y desde 6800 (93) hasta 10500 (94) para la proteína de corazón de res por su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida en condiciones de desnaturalizantes y hasta de 15 000 para este último por su coeficiente de sedimentación (62). Esto refleja la forma elongada que adopta la proteína en solución, como sugieren estudios posteriores realizados con la técnica de dispersión de neutrones (95).

Para la proteína mitocondrial de corazón de mamífero se ha calculado un coeficiente de extinción molar de $1.68 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ en fosfato 10 mM (pH 6.9) a 280 nm (90) debido a la absorción de su única tirosina. Estudios de dicroísmo circular en el mismo buffer señalan un 50% de estructura helicoidal en la proteína (90), estudios de predicción de la estructura con base en la secuencia de aminoácidos, sugieren un $80 \pm 5\%$ de alfa hélice (96).

Las proteínas inhibidoras aisladas de mitocondrias de corazón de res, hígado de rata y levadura son capaces de inhibir no sólo a las ATPasas homólogas, sino también a las aisladas de los otros tipos celulares (63,97), lo que sugiere cierta similitud estructural cuando menos en la región que participa en la

interacción con la enzima. Dicha similitud, sin embargo, no se traduce en una identidad inmunológica (97). La proteína inhibidora de corazón es capaz de inhibir también a la F_1 de cloroplasto (98).

El inhibidor de la ATPasa de cloroplasto es altamente insoluble en agua, para mantenerlo en solución se requiere la presencia de urea o detergentes en el medio (69). La solubilidad del inhibidor mitocondrial, con un 50% de residuos aminoácidos cargados (90), es mayor; sin embargo su hidrofobicidad es tal, que presenta una fuerte tendencia a formar agregados en solución, efecto que es inversamente proporcional a la concentración de sales y dependiente del pH (95).

Para la proteína aislada de mitocondrias de corazón de res por distintas metodologías, se ha reportado un valor de punto isoeléctrico de 7.7 ± 0.1 (75,90). Aunque previamente, otros investigadores reportaron un valor de 10.4 (31). Los inhibidores aislados de mitocondrias de hígado de rata y de la levadura Sacharomyces cerevisiae tienen carácter básico también: pI 8.9 y 9.05 respectivamente (63,65) sólo para el caso de la proteína purificada de otra especie de levadura C. utilis, se ha reportado un pI ácido de 5.6 (64).

Todos los inhibidores de las F_1 -ATPasas son resistentes al calor, al frío al ácido y al álcali (83) e inactivados por la tripsina. De hecho, la estimulación inicial de la actividad ATPasa por la acción de la tripsina, se ha utilizado como criterio para sugerir la existencia de un inhibidor natural en la enzima (92).

c) Interacción con la F_1 .

La asociación de la proteína inhibidora con su enzima es óptima a pH entre 5.8 y 7.0 (62), valor al cual el inhibidor se encuentra preferentemente en su forma monomérica (95). Requiere también la presencia de un catión divalente, en orden de preferencia: Mn^{++} , Ca^{++} , Fe^{++} , Mg^{++} , Cu^{++} , y con menor efectividad Co^{++} y Zn^{++} (81). Además es necesaria la hidrólisis de un nucleótido trifosfatado: ATP, ITP, UTP, GTP o CTP, así como otros análogos de ATP hidrolizables, favorecen la inhibición (80). El grado de inhibición alcanzado a los 5 min. es independiente de la velocidad de hidrólisis del nucleótido. Para explicar este requerimiento, se ha sugerido que existe una conformación hidrolítica de la enzima a la cual puede unirse el inhibidor (80).

Se ha sugerido (80) que la ATPasa debe hidrolizar 200 moléculas de ATP para promover la asociación de la proteína inhibidora y así proteger el ATP recién sintetizado. Esto implicaría un gasto energético excesivo para la célula. Por lo tanto, deben existir in vivo otros factores que faciliten la asociación del inhibidor con la enzima.

En las condiciones en que se ha ensayado, la actividad máxima de los péptidos inhibidores, a excepción del inhibidor de cloroplasto, requiere tiempos de incubación del orden de minutos (de 5 a 10) para ser alcanzada (83). Sin embargo existe una interacción primaria que se lleva a cabo a velocidades mucho mayores (80) que permanece aún inexplorada.

En la actualidad, es generalmente aceptado que basta un mol

de inhibidor para inhibir completamente un mol de enzima. Esta estequiometría ha sido reportada tanto en el caso de mitocondrias de corazón de res (80) usando enzima soluble, como para el sistema de *C. utilis* (99) usando partículas submitocondriales. Las constantes de disociación encontradas en cada caso fueron 10^{-11} M (80) y de 6 a 8.4×10^{-11} (99).

Se ha demostrado que el inhibidor de mitocondrias de corazón de res se une a la subunidad beta de la F_1 soluble (100,101) en un sitio distinto al catalítico, como sugieren los estudios previos de cinética. Diversos grupos de trabajo (76, 102,103) han reportado que la inhibición de la ATPasa producida por su inhibidor natural es no competitiva con respecto al ATP, por otro lado existe un reporte (104) de que dicha inhibición es acompetitiva e incluso se ha descrito como mixta (105). Además estudios cinéticos con pares de inhibidores (106) sugieren la existencia de 2 sitios regulatorios en la enzima independientes entre sí: uno para nucleótidos y otro para su inhibidor natural.

Por último también se ha demostrado que la interacción de la proteína inhibidora con la H^+ -ATPasa mitocondrial de corazón de bovino, no impide la unión de reactivos covalentes que supuestamente reaccionan con el sitio catalítico (107).

En cuanto a las fuerzas involucradas en la unión de ambas proteínas, Gómez-Fernández y Harris (80) usando partículas submitocondriales empobrecidas en inhibidor endógeno (psm AS) y reconstituidas con inhibidor exógeno concluyen que son de naturaleza fuertemente hidrófoba. Sin embargo, estudios realizados en nuestro laboratorio con partículas con alto

contenido de inhibidor endógeno (psm Mg.ATP) sugieren que también participan interacciones electrostáticas (108).

El estudio de las condiciones que liberan al inhibidor de la enzima es importante para entender su papel regulatorio. A este respecto se sabe que la actividad inhibitoria sobre partículas submitocondriales es suprimida por la exposición a alta fuerza iónica (81,62,108), a un pH alcalino (81,62) o bien a la energización de la membrana (condiciones de estado 3 de la respiración) (76). Incubaciones a temperatura de 38°C producen una activación lenta (109).

De todas las condiciones mencionadas, la más probable para desempeñar el papel de activador fisiológico de la enzima por desplazamiento del inhibidor en la célula viva, sería el estado de energización de la membrana. Esta idea se ve apoyada por el hecho de que el potencial de membrana parece ser el factor principal en la regulación de la inhibición (76,110).

La activación de la ATPasa soluble por remoción del inhibidor se ha logrado exponiendo a la enzima latente purificada de cloroplasto a la luz en presencia de agentes reductores (111), en tanto que la de la bacteria Alcaligenes faecalis (67) y la de mitocondrias de corazón de res (112) ocurre al exponerlas al calor.

La posición que guarda el inhibidor con respecto a la F_1 cuando no está ejerciendo su acción inhibitoria ha sido tema de debate por largo tiempo. Se han sugerido 2 posibilidades excluyentes entre sí: a) una vez activada la enzima el inhibidor permanece en ella en un sitio no inhibitorio, o bien b) el proceso de activación requiere la liberación del inhibidor al

medio.

Distintos autores han reportado la liberación de la proteína inhibidora al sobrenadante como resultado de la activación de partículas submitocondriales (101,109,110, 113). Sin embargo en dichos trabajos no se establece una relación cuantitativa entre ATPasas activadas e inhibidor liberado al medio.

Por otro lado estudios realizados con anticuerpos contra inhibidor "nativo" marcados radiactivamente, demostraron que las partículas Mg.ATP unen más anticuerpo después de haber sido energizadas (116). Tales resultados sugieren que el inhibidor permanece en la enzima (o en un sitio cercano a ella) pero en una posición diferente en la que es más fácilmente detectable por los anticuerpos. Lo mismo sucede cuando la activación de las partículas se lleva a cabo por calor (108). La movilización del inhibidor a un sitio no inhibitorio fue sugerida por primera vez por Van de Stadt y col. (117).

Curiosamente en estudios realizados recientemente, Husain y col. (118) encuentran que la energización de partículas produce la inaccesibilidad en un anticuerpo contra la proteína inhibidora "entrecruzada", en contraste con lo reportado por Dreyfus y col. (116). Sin embargo, tampoco en esta ocasión se logró cuantificar al inhibidor directamente en el sobrenadante.

ANTECEDENTES Y OBJETIVO

En 1975 Satre y col. (119) y en 1977 Klein y col. (120) obtuvieron al inhibidor de la ATPasa de mitocondrias de levadura marcado radioactivamente por biosíntesis, en tales circunstancias, la radioactividad específica era muy baja y no permitía calcular con precisión su estequiometría con respecto a la F_1 ni buscar su sitio de interacción en la enzima.

En trabajos realizados en la presente década, se ha marcado a la proteína inhibidora purificada de mitocondrias de corazón de res en su única tirosina con ^{125}I por Wong y col. en 1982 (121) y por Harris y col. en 1983 (108). También se ha marcado con compuestos radioactivos cuyos grupos reactivos reconocen aminas primarias tales como el fenil ^{14}C -isotiocianato (PITC) y el metil-4-azido ^{14}C -benzimidato (MABI) por Klein y col. en 1980 (101) y 1981 (102) respectivamente.

Dichos estudios demuestran que la actividad de la proteína inhibidora se puede preservar después de la iodación y también cuando el número de lisinas bloqueadas no excede a 5 por molécula, si este número es mayor, se tiene un brusco decremento en la actividad.

El marcaje de la proteína inhibidora con reactivos radioactivos aportó información en cuanto a la participación probable de los aminoácidos bloqueados en la interacción con la enzima, permitió calcular la estequiometría probable de 1:1 y analizar las condiciones de interacción con la misma. Además el uso del reactivo de entrecruzamiento MABI, permitió demostrar que el sitio de interacción que produce la inhibición se encuentra

localizado en o cerca de la subunidad beta de la ATPasa.

El empleo de marcadores fluorescentes, ofrece nuevas posibilidades como son:

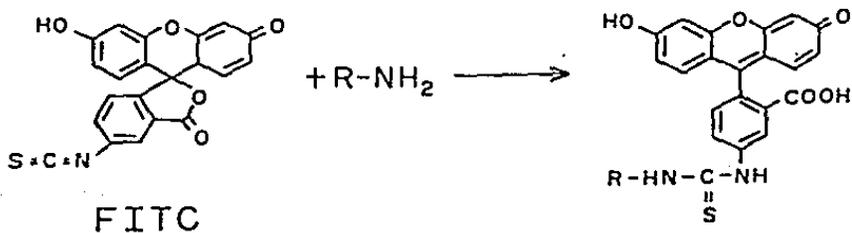
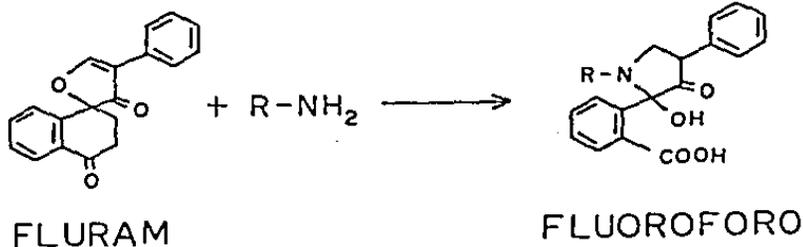
a) Estudios de correlación temporal: El estudio de la interacción del inhibidor marcado fluorescentemente con su enzima, se puede realizar en el momento en que dicha interacción se está llevando a cabo y no requiere la separación del inhibidor libre del pegado cuando se ha llevado a cabo un proceso de activación o inhibición de la enzima.

b) Estudios topológicos: también se puede obtener información con respecto a la distancia que existe entre el sitio de acción del inhibidor y sitios específicos en la enzima, usando pares de fluoróforos y midiendo transferencia de energía singulete-singulete entre ambos.

En el presente trabajo se eligió el marcaje inespecífico o al azar (122) del inhibidor en sus grupos amino primarios de los cuales presenta 11 por molécula: 10 lisinas y el amino terminal.

De entre los compuestos que existen en el mercado para marcar covalentemente aminas primarias se eligieron la Fluorescamina y el 6-isotiocianato de fluoresceína. Ver figura 4. La Fluorescamina o Floram (4-fenilspiro furano-2,1(3H),1-ftalán 3,3' diona) reacciona rápidamente con proteínas produciendo derivados con intensa fluorescencia en el azul (123). El reactivo en exceso se inactiva formando productos de hidrólisis no fluorescentes, tampoco la fluorescamina antes de reaccionar fluoresce, lo cual suprime la necesidad de separar el reactivo unido del libre una vez que se ha llevado a cabo el marcaje.

Figura 4. Reacción del Fluram y el FITC con aminas primarias para formar los respectivos derivados fluorescentes.



El 6-isotiocianato de fluoresceína (FITC) forma derivados estables que presentan una eficiencia cuántica y una absorbencia altas. Este compuesto ha sido usado en estudios que involucran transferencia de energía como aceptor usando como donador al cloruro de Dansilo (122). Se considera además adecuado para el estudio de la interacción de moléculas marcadas de bajo peso molecular con proteínas, a través de cambios en la polarización de la fluorescencia (124).

Por otro lado, el FITC ha sido utilizado como modificador del sitio activo de la ATPasa de cloroplasto por el bloqueo de grupos lisina en las subunidades alfa y beta que están involucradas en la unión del ATP (125).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es describir el marcaje fluorescente del inhibidor natural de la ATPasa mitocondrial con la finalidad de estudiar la interacción entre ambas proteínas en términos moleculares.

MATERIALES Y METODOS

1) Obtención de mitocondrias de corazón de res.

Se llevó a cabo siguiendo el método de Smith (127) modificado. Se partió de 6 corazones frescos mantenidos en baño de hielo que se disecaron en un cuarto frío a temperatura de 4°C que se mantuvo a todo lo largo de la operación, para obtener sólo el tejido muscular cortado en pedazos regulares que fué molido en un molino de carne. Cada kilogramo de molido, se suspendió en 4 litros de sacarosa 250 mM, Tris-Cl 5 mM, EDTA 15 mM pH 7.4 y se reajustó a pH 7.4 con Tris concentrado. La suspensión se homogeneizó en lotes de 3 litros durante 30 seg. a la velocidad intermedia en una licuadora Waring Blendor comercial.

Se reajustó el pH a 7.4 al homogeneizado del paso anterior y se centrifugó 10 min. a 650 g a 4°C para separar células enteras y núcleos.

El sobrenadante, filtrado por 2 capas de gasa se centrifugó 10 min. a 14 000 g. El precipitado resultante, que contiene el paquete de mitocondrias, se resuspendió en el medio de molido sin EDTA. Se centrifugó por 10 min. a 200 g para separar células rotas y eritrocitos y las mitocondrias contenidas en el sobrenadante se separaron en las fracciones ligera y pesada por decantación después de una última centrifugación de 15 min. a 14 000 g.

La fracción correspondiente a mitocondrias pesadas, se resuspendió en sacarosa 250 mM y la correspondiente a las ligeras en el medio de molido sin EDTA. Ambas fracciones se congelaron a -70°C en un congelador REVCO.

2) Preparación de partículas submitocondriales

Se prepararon 2 tipos de partículas submitocondriales (psm): las descritas por Horstman y Racker en 1970 (127) llamadas psm-AS (Amonio-Sefadex) y las descritas por Klein y col. en 1982 (95) que llamaremos psm-K en este trabajo. Ambos tipos de partículas carecen prácticamente de inhibidor endógeno pues les fué extraído durante su preparación.

a) Obtención de psm-AS.

Las psm-AS se prepararon a partir de mitocondrias pesadas descongeladas y diluidas a 20 mg/ml en sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM pH 7.4 llevadas a pH 9.2 con una solución de NH_4OH 1 N fresca y mantenidas a 4°C durante todo el procedimiento. La suspensión se sonicó en un baño de hielo durante 2 min. a intervalos de 1 min. de sonicación intercalados con 1 min. de descanso en un sonicador Branson B-12.

El sonicado se centrifugó a 9200 g por 10 min. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 115 000 g durante 20 min. a 4°C. El precipitado, que contiene las partículas submitocondriales, se resuspendió en sacarosa 250 mM y se recentrifugó. El precipitado final se homogeneizó a 20 mg/ml en KCl 250 mM, sacarosa 75 mM, Tris- SO_4 30 mM pH 8.0, EDTA 2 mM pH 8.0 y se pasó por una columna de Sefadex G-50 coarse de 45 x 2.5 cm. eluyendo con el mismo amortiguador a flujo lento para que su paso por la columna dure una hora.

Las partículas obtenidas de la columna, se centrifugaron a

115 000 g durante 20 min. y el precipitado se resuspendió en medio volumen original de sacarosa 250 mM y se recentrifugó. El precipitado final se resuspendió en un volumen pequeño de sacarosa 250 mM y se almacenó a -70°C .

b) Obtención de psm-K.

Las psm-K se obtuvieron partiendo de mitocondrias ligeras descongeladas y resuspendidas a 20 mg/ml en KCl 250 mM, sacarosa 75 mM, Tris- SO_4 30 mM pH 8.0 y EDTA 2 mM pH 8.0 que fueron sonicadas en este medio durante 2 min en un baño de hielo.

El sonicado se centrifugó durante 10 min. a 10 000 g a 4°C y el sobrenadante obtenido se incubó a temperatura ambiente (15 a 20°C) durante una hora. Posteriormente, se centrifugó a 100 000 g durante 30 min. a temperatura ambiente y el precipitado, que contiene las partículas submitocondriales, se resuspendió en un volumen mínimo de sacarosa 250 mM y se almacenó, como las anteriores, congeladas a -70°C . El sobrenadante se procesó posteriormente para la obtención de la proteína inhibidora (ver inciso 4).

3) Purificación de ATPasa (F_1).

Se partió de psm-K descongeladas y diluidas a 10 mg/ml en sacarosa 150 mM, EDTA 2 mM, ATP 2 mM pH 7.4. La suspensión se sonicó durante 30 min. a temperatura de 40 a 45°C mantenida con un baño de agua y hielo. El sonicado se centrifugó durante 30 min a 130 000 g y el sobrenadante, que contiene el factor F_1 , se adsorbió en una columna de hexilamina sefarosa 4B de 1.5 x 20 cm. Siguiendo la técnica descrita por Tuena de Gómez-Puyou y Gómez-

Puyou en 1977 (128).

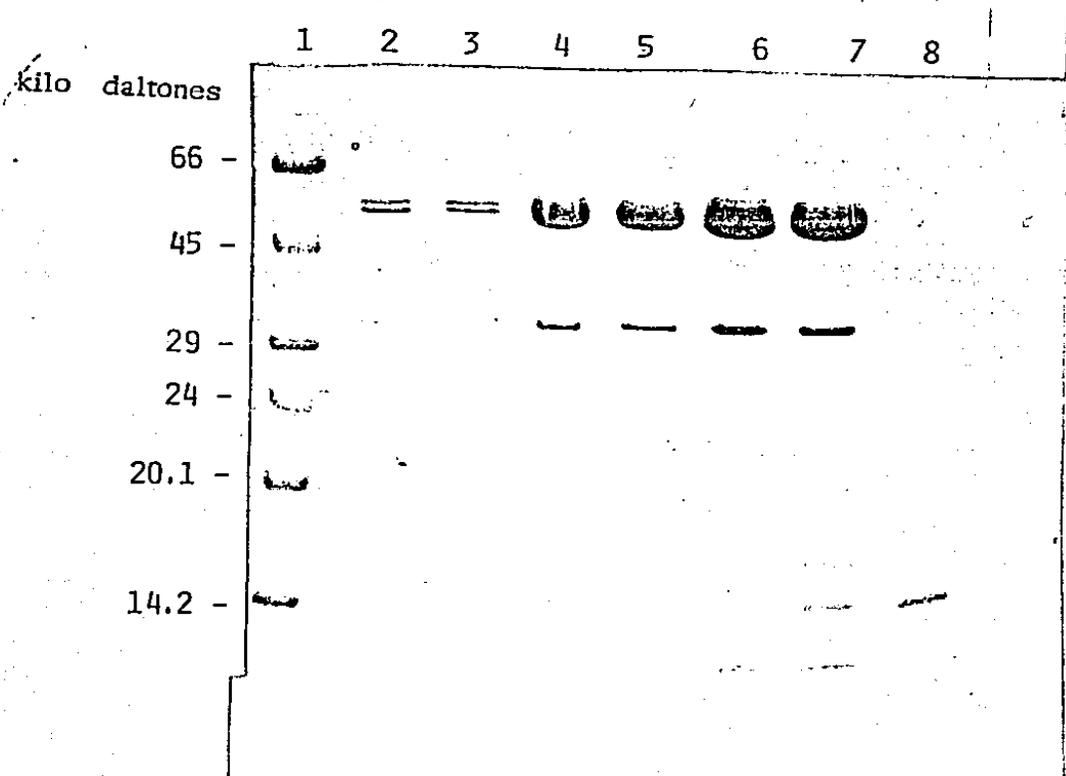
La columna fue previamente equilibrada con 40 ml del mismo amortiguador en que se resuspendieron las partículas (medio de ATP). Después de la adsorción la columna se lavó con 80 ml del mismo medio y la enzima se eluyó con medio de ATP adicionado de KCl 1 M. Las fracciones activas en hidrólisis de ATP se precipitaron con un volúmen igual de solución saturada de sulfato de amonio ajustada a pH 7.4 con tris y se mantuvieron a 4°C durante la noche. La suspensión de enzima se centrifugó a 9 200 g durante 15 min a 4 °C y el precipitado se resuspendió en medio volúmen de medio de ATP, el material insoluble se descartó por centrifugación a 3 000 rpm en una centrifuga clinica a temperatura ambiente. El sobrenadante se precipitó nuevamente con un volúmen igual de la solución de sulfato de amonio saturada. (Ver figura 5). La figura 5 muestra el grado de pureza de la enzima usada en este trabajo.

4) Obtención el inhibidor.

Se llevó utilizando el sobrenadante de las partículas psm-K (ver inciso 2 b), que contiene la proteína inhibidora extraída de la ATPasa. El procedimiento que se sigue corresponde al método descrito por Horstman y Racker en 1970 (81) modificado por Klein y col., 1982 (95).

Por cada 100 ml de sobrenadante de las psm-K, se agregaron 29 g de sulfato de amonio y se agitó en baño de hielo 25 min. Se descartó el precipitado por centrifugación a 14 000 g durante 10 min. A cada 100 ml del sobrenadante anterior, se agregaron 19.4 g

Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15% en SDS de inhibidor y F_1 .



Patrón de electroforesis en gel de poliacrilamida 15% en SDS. El gel contenía 10.60 y 118 μg de F_1 en los carriles 2.4 y 6 respectivamente, las mismas cantidades de F_1 -I en los carriles 3.5 y 7 respectivamente 5 μg de inhibidor en el carril 8 y marcadores de peso molecular en el carril 1. Tinción con azul de Coomassie.

de sulfato de amonio y se centrifugó de la misma manera. El precipitado sin resuspender se mantuvo a 0°C durante un día o más y se disolvió en 7 ml de sacarosa 250 mM por gramo de mitocondrias inicial.

A cada 70 ml de la solución obtenida se agregaron 5 ml de TCA 50% y se centrifugó inmediatamente la suspensión a 15 000 g durante 5 min., el precipitado de cada 70 ml se disolvió en 5 ml de agua y se homogeneizó en un homogeneizador de vidrio con vástago de teflón. El pH de la suspensión se llevó a 5.0 con KOH 1 N y el precipitado se descartó por centrifugación a 20 000 g por 5 min.

El sobrenadante se neutralizó a pH 7.4 con KOH 1 N y se llevó a una concentración final de sacarosa de 0.25 M por adición de la misma en estado sólido. la concentración de sal de la solución se ajustó a 0.83 M con sulfato de amonio sólido registrando la conductividad en un conductímetro CDM-3 Radiometer/Copenhagen. Por cada mililitro de la solución anterior se agregaron 1.7 ml de etanol al 95% frío en baño de hielo-agua. Se mantuvo con agitación durante 60 min y se centrifugó 5 min a 12 000 g. El precipitado se homogeneizó en un volúmen pequeño de sacarosa 0.25 M, Tris sulfato 10 mM pH 7.4 y se centrifugó 5 min a 12 000 g para remover cualquier material insoluble.

Se reajustó la conductividad del sobrenadante obtenido a la equivalente a una solución 0.83 M de sulfato de amonio con dicha sal y se volvió a precipitar con etanol agitando durante 20 min. El precipitado obtenido por centrifugación se resuspendió en un volúmen pequeño de sacarosa Tris pH 7.4 (0.8 ml por gr de mitocondrias inicial) y se evaporó el etanol por agitación a

temperatura ambiente en un kitasato conectado a una bomba de vacío.

La solución anterior se sometió a calentamiento en baño a ebullición a unos 85°C con agitación constante durante 3 min en un tubo Pyrex de 40 ml y se enfrió en un baño de agua a temperatura ambiente. El precipitado formado se removió por centrifugación a 100 000 g durante 20 min. El sobrenadante, que contiene la proteína inhibidora, se guardó a -70°C en un congelador REVCO. Ver figura 5.

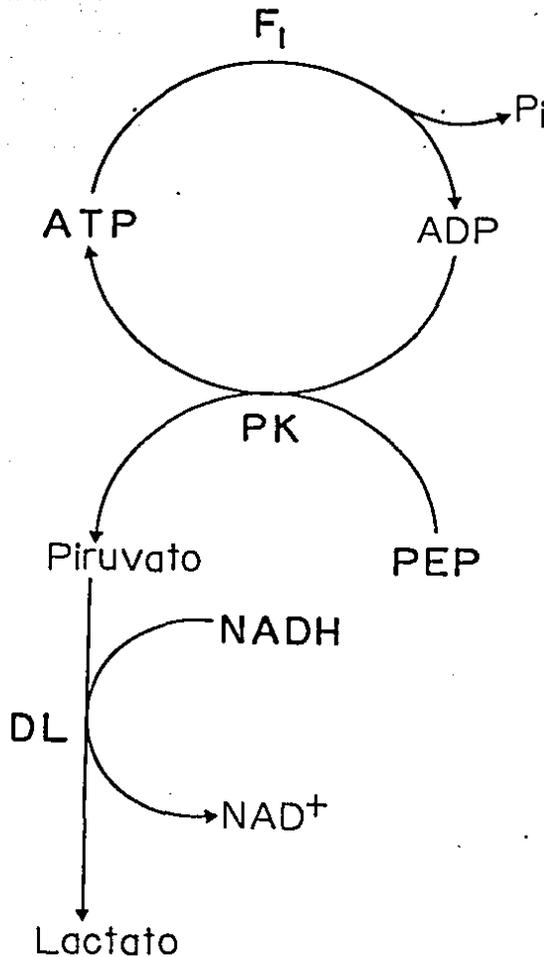
5) Determinación de la actividad ATPasa.

Se llevó a cabo por 2 métodos distintos: a) espectrofotométricamente y b) por cuantificación del Pi liberado.

a) La determinación espectrofotométrica descrita por Pullman y col. en 1960 (130) es una medida indirecta de la hidrólisis del ATP que se cuantifica como desaparición de NADH por absorbancia a 340 nm en presencia de un sistema regenerador de ATP. Ver fig. 6. El medio contenía en un volumen final de 3 ml: Tris acetato 25 mM pH 7.4, acetato de potasio 30 mM, acetato de magnesio 3 mM, fosfoenol piruvato 0.3 mM, ATP-NADH pH 7.4 0.3 mM, 16 a 20 µl de NADH 30 mM preparado en Tris-acetato 25 mM pH 7.4, piruvato cinasa 10 unidades y deshidrogenasa láctica 18 unidades ambas en solución de sulfato de amonio.

La reacción se inició con la adición de distintas cantidades de F₁ o partículas submitocondriales, en cuyo caso se añadió rotenona 10 µg en etanol 95% en la mezcla de reacción para evitar

Figura 6. Esquema de las reacciones acopladas para medir actividad ATPasa espectrofotométricamente con sistema regenerador de ATP.



En caracteres oscuros se muestran los sustratos y las enzimas añadidas al medio de reacción y en caracteres normales los productos e intermediarios formados. Abreviaturas: F₁, ATPasa; P_i, fosfato inorgánico; ADP, ATP, di- y tri-fosfato de adenosina; PK, Piruvato Cinasa; PEP, fosfoenol piruvato; DL, deshidrogenasa láctica; NADH, NAD⁺, β-nicotinamida adenin dinucleótido reducido y oxidado respectivamente.

que el NADH fuera oxidado por la cadena respiratoria. La reacción se registró durante 5 min en un espectrofotómetro Beckman 35.

b) La determinación colorimétrica del Pi liberado se realizó después de que la reacción ocurrió en 1 ml del medio usado en la determinación espectrofotométrica omitiendo el NADH y la deshidrogenasa láctica, incubando durante 5 min a 30°C y parando la reacción con ácido tricloro-acético 6% final. La cuantificación del fosfato liberado por la hidrólisis del ATP se realizó por el método de Sumner (130). En un volumen final de 5 ml se adicionaron a concentraciones finales molibdato de amonio al 0.6 %, ácido sulfúrico 0.75 N y sulfato ferroso 0.78%. El desarrollo de color se cuantificó después de 10 min a 660 nm en un espectrofotómetro Beckman 35 usando como referencia la absorción de 0.5 μ moles de KH_2PO_4 .

6) Determinación de la actividad de la proteína inhibidora.

a) En F_1 soluble.

Se preincubaron durante 20 min a 30°C de 1 a 2 g de F_1 soluble y distintas cantidades de inhibidor en 0.1 ml de Mes-Tris 20 mM pH 6.5, Mg-ATP 0.5 mM pH 6.5. La enzima utilizada en este tipo de ensayo mantenida en una suspensión de sulfato de amonio, se centrifugó 10 min en una centrifuga clinica y el precipitado se resuspendió en Tris-acetato 20 mM pH 7.4. El inhibidor usado para la interacción se filtró previamente por columnitas de Sefadex G 25-150 grueso siguiendo la técnica descrita por Penefsky (131). La resina hidratada se montó en jeringas desechables de 1 ml, se equilibró con Mes-Tris 20 mM pH 6.5 y se empacó por centrifugación en una centrifuga clinica durante 2 min

a velocidad máxima. Una alícuota de 100 a 150 μ l que contuviera no menos de 75 μ g de inhibidor se recentrifugó en las mismas condiciones, todo a temperatura ambiente.

La actividad ATPasa remanente se cuantificó por el método colorimétrico descrito en el punto anterior.

b) En partículas submitocondriales.

Se preincubaron durante 20 min a 30°C, 50 μ g de psm AS ó K con distintas cantidades de inhibidor en las mismas condiciones que para evaluar su actividad sobre la enzima soluble, inciso anterior.

7) Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se utilizaron dos sistemas distintos: a) el descrito por Wyckoff y col. (132) modificado y el descrito por Laemmli (133).

a) El sistema de electroforesis descrito por Wyckoff se montó en geles cilindricos a concentraciones de 11.4% acrilamida, 0.6% bis-acrilamida (NN'-bis-metilén-acrilamida), 81 mM Ammediol (2 amino-2 metil-1,3, propanediol) y 30 mM HCl pH 9.1 en el gel separador y 4.85% acrilamida, 0.15% bis-acriladmada, 51.4 mM Ammediol y 46 mM HCl pH 7.9 en el gel concentrador. Los geles se polimerizaron por la adición de persulfato de amonio a una concentración final de 0.05% y TEMED 0.005%.

La solución amortiguadora del reservorio superior contenía glicina 40 mM, Ammediol 40 mM y SDS 0.1% pH 9.4. La del reservorio inferior 62 mM Ammediol, 0.05 N HCl, pH 8.23. Las proteínas se disolvieron en Ammediol 84 mM, HCl 62 mM pH 8.37 con azul de bromofenol para poner en el gel y se corrieron los geles

a 85 voltios durante 2 hrs 30 min.

Las proteínas se fijaron al gel con TCA (ácido tricloroacético) 30 % durante 30 min y se tiñeron con azul de Coomassie brillante R al 0.25% en metanol:ácido acético 30:7.5% durante la noche a temperatura ambiente y se destiñeron en la misma solución sin colorante.

b) El sistema de electroforesis descrito por Laemmli se utilizó en placas que contenían acrilamida 15 %, bis-acrilamida 0.4%, Tris-Cl 0.4 M pH 8.8, 0.1% SDS en el gel separador y acrilamida 3% bis-acrilamida 0.08%, Tris-Cl 0.13 N pH 6.8, SDS 0.01% en el gel concentrador.

Los geles se polimerizaron por la adición de persulfato de amonio y TEMED a concentraciones finales de 0.017% y 0.1% respectivamente. la solución de los reservorios contenía Tris-Cl 25 mM, glicina 0.2 M, SDS 0.1% pH 8.6.

Las muestras de proteína se añadieron en mezcla de digestión que contenía glicerol 36.4%, Tris-Cl 0.34 M, SDS 3.84% y β -mercapto etanol 6.41% y azul de Coomassie. Se corrieron durante 4 o 5 hrs a 60 mA. Los geles se fijaron con TCA 10% durante 10 min y se tiñeron con azul de Coomassie al 0.05% en metanol/ácido acético 30/10% durante la noche y se destiñeron con la misma solución sin colorante.

Los geles se fotografiaron antes de la fijación y tinción de las proteínas bajo iluminación con luz ultravioleta de onda corta y después de la tinción.

B) Marcaje fluorescente.

La proteína inhibidora, obtenida como se indica en el inciso 4, se filtró por columnitas de Sefadex G 25-105 siguiendo la técnica descrita por Penefsky (131). La resina hidratada se montó en jeringas desechables de 1 ó de 3 ml y se equilibró con agua ajustada a pH 7.5-9.0 con KOH, NaOH ó NH₄ y se empacó por centrifugación en una centrifuga clinica durante 2 min. a velocidad máxima, todo a temperatura ambiente.

Se juntaron las fracciones filtradas y se liofilizaron a sequedad.

a) Marcaje con Floram.

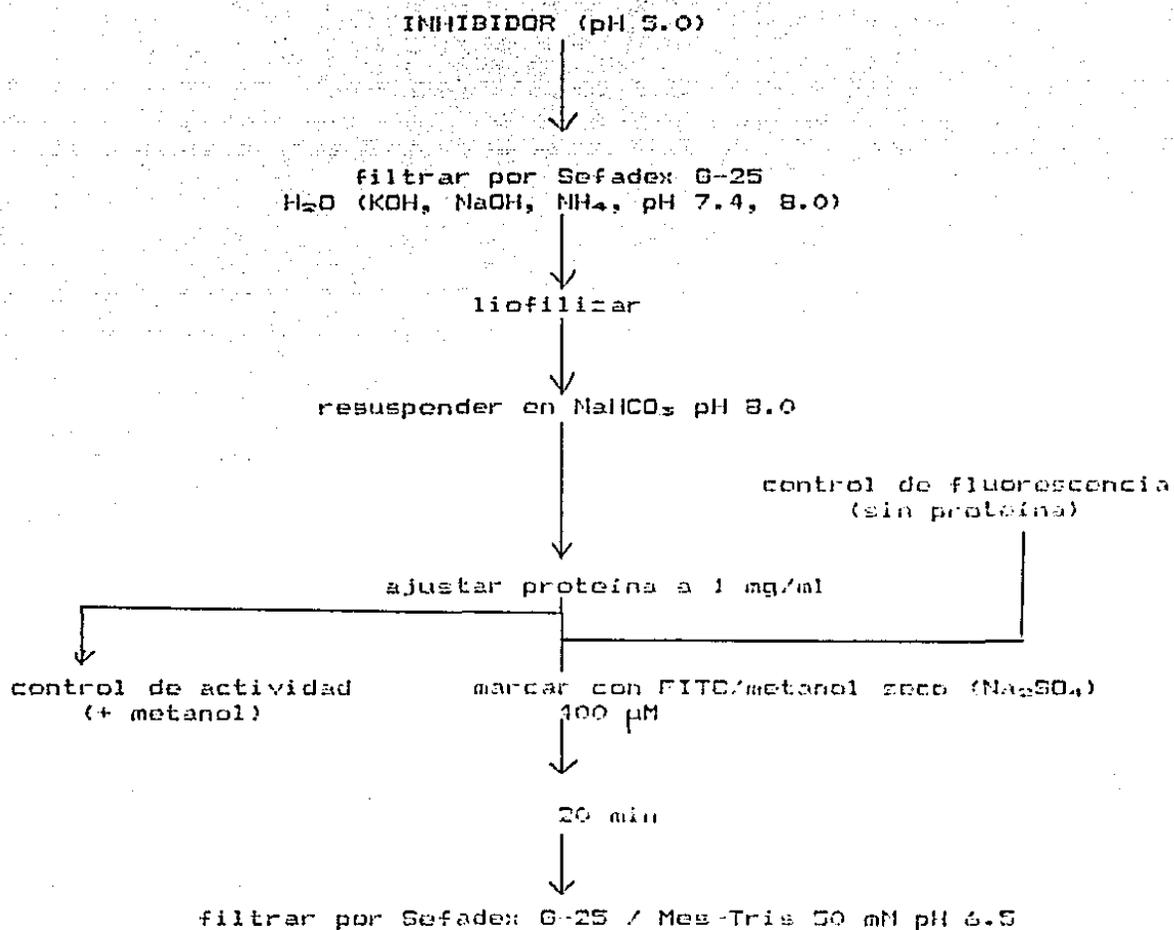
Se resuspendió el inhibidor en borato de potasio 20 mM pH 7.5 ó en bicarbonato de sodio 50 mM pH 9.0 a distintas concentraciones de proteína y se mezcló con Floram disuelto a distintas concentraciones en acetona agitando en Vortex durante unos segundos. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y manteniendo la muestra protegida de la luz.

b) Marcaje con FITC.

Se resuspendió el inhibidor liofilizado en bicarbonato de sodio 50 mM pH 8.0-9.0 a una concentración de proteína de 1 mg/ml. Se mezcló con FITC 400 µM disuelto en metanol seco (Na₂SO₄) agitando en Vortex. Se mantuvo protegido de la luz durante 20 min a temperatura ambiente y se filtró por las columnitas descritas (inciso B) equilibradas con Mes-Tris 50 mM pH 6.5 (ver figura 7).

Figura 7.

ESQUEMA DE MARCAJE DEL INHIBIDOR CON FITC



7) Medidas de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectro-fluorómetro SLM 4800. Para la obtención de los espectros de excitación y emisión se utilizó el fluorómetro acoplado a una computadora Apple II.

Las longitudes de onda de excitación y emisión se fijaron a 405 y 480 nm respectivamente para registrar los espectros del derivado fluorescente del Fluram y a 480 y 530 nm para registrar los correspondientes al derivado del FITC. Todas las aperturas del paso de luz se mantuvieron a 16 nm.

La intensidad de la fluorescencia se midió llevando a 0.02 unidades de fluorescencia la producida por una solución de sulfato de quinina a 1 mg/ml en ácido sulfúrico 0.1 N con excitación a 405 nm y emisión a 480 nm para el derivado del Fluram o bien, ajustando a 0.5 unidades de fluorescencia la correspondiente a una solución de fluoresceína de sodio 1 μ M en sosa 0.1 N a 470 y 530 nm las longitudes de onda de excitación y emisión respectivamente.

Las medidas de estado estacionario de polarización de la fluorescencia se hicieron con el fluorómetro en la forma "T", que permite medir las intensidades de fluorescencia de los componentes paralelo y perpendicular al eje de polarización de la luz de excitación simultáneamente usando 2 canales de detección (124). Las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente a través de filtros de corte SCHOTT KV 550 en los canales de emisión, excitando con luz monocromática de 480 nm.

La polarización (P) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$P = \frac{\frac{I_{VV}/I_{VH}}{I_{HV}/I_{HH}} - 1}{\frac{I_{VV}/I_{VH}}{I_{HV}/I_{HH}} + 1}$$

en donde I es la intensidad de la fluorescencia observada cuando los polarizadores de los haces de emisión y excitación se fijan con cierta orientación. El primer subíndice de cada intensidad indica la orientación del polarizador del haz de excitación y el segundo la orientación de los polarizadores de emisión. H y V significan horizontal y vertical respectivamente.

En general las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo a temperatura ambiente en celdas de 0.3 ml de capacidad y 0.3 cm de paso de luz.

10) Determinación de proteína.

Se siguió el método descrito por Gornall y col. (134) con el reactivo de Biuret para estimar la proteína en mitocondrias y partículas submitocondriales y el método descrito por Bradford (135) con azul de Coomassie R-250 para las proteínas purificadas usando albúmina sérica de bovino disuelta en agua como estándar. Para cuantificar la proteína de muestras del derivado fluorescente en amortiguador de bicarbonato de sodio, se utilizó el estándar diluido en el mismo amortiguador.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. Marcaje y Caracterización de un derivado de la Proteína Inhibidora con Fluram.

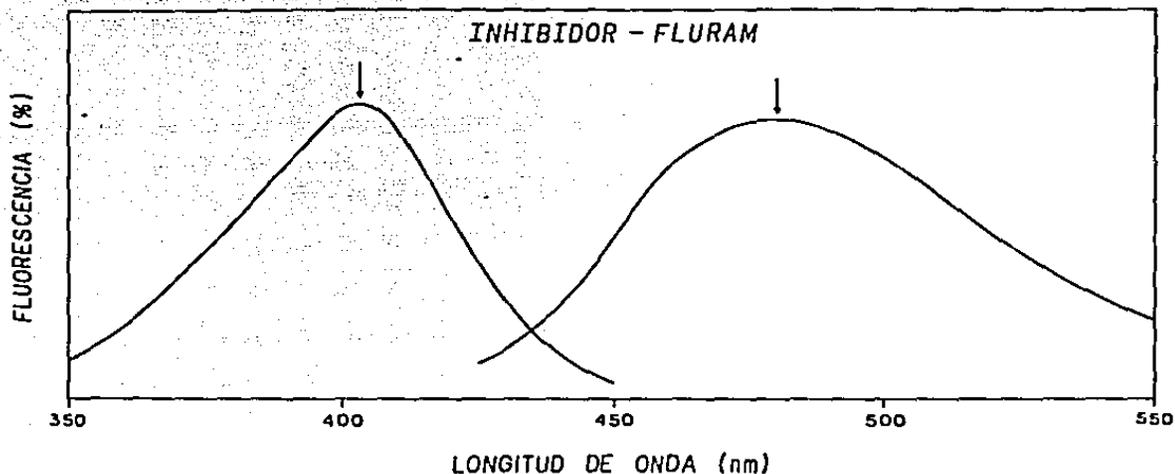
La proteína inhibidora purificada se marcó con fluorescamina en las siguientes condiciones: inhibidor a una concentración de 33.6 μM , en borato potasio 20 mM pH 8.0, Fluram 1 mM en acetona 3.8% final a temperatura ambiente agitando en Vortex durante unos segundos. En la figura 8 se muestran los espectros no corregidos de excitación y emisión de fluorescencia del inhibidor marcado con fluorescamina. Para la obtención de los espectros se diluyó la muestra con un volumen de Mes-Tris 20 mM pH 6.5

Los registros ilustrados en la figura 8, se hicieron barriendo la longitud de onda de excitación cada nanometro desde 350 hasta 450 manteniendo constante la longitud de onda de emisión a 481 nm para obtener el espectro de excitación y desde 450 hasta 550 nm la longitud de onda de emisión con la de excitación constante a 403 nm para el espectro de emisión.

Las longitudes de onda elegidas para trabajar fueron 405 y 480 nm de excitación y emisión respectivamente, que en la figura se muestran señaladas con flechas y que constituyen los máximos del espectro.

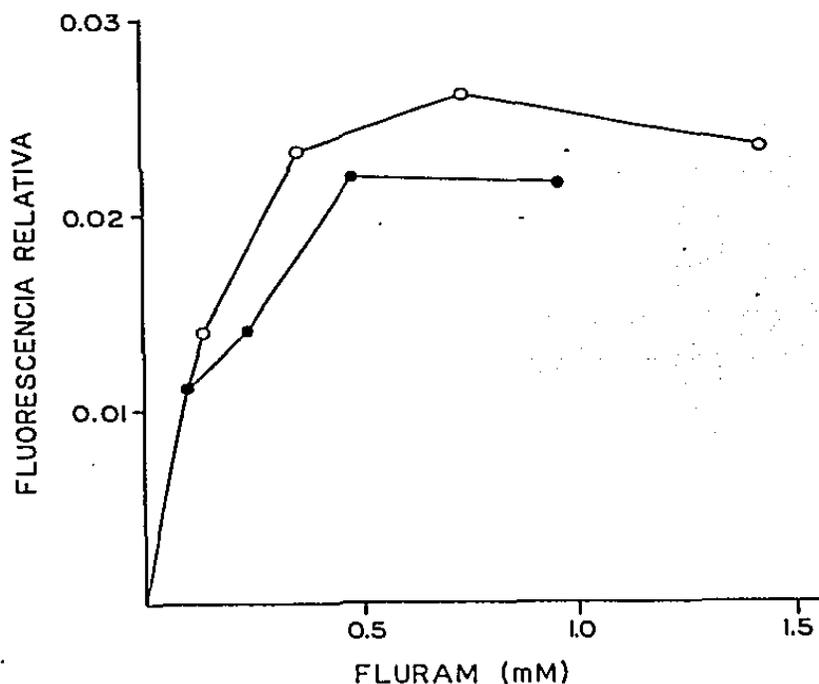
Utilizando condiciones de marcaje semejantes a las de la figura 8, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de fluorescamina y dos concentraciones fijas de inhibidor sobre el grado de marcaje. La figura 9 muestra una curva de saturación dependiente de la concentración de Fluram, lo cual indica que la

Figura B. Espectros de excitación y emisión no corregidos del inhibidor marcado con Fluram.



Registro de los espectros de fluorescencia de una muestra de inhibidor marcado con Fluram a una concentración de proteína de 16.8 M en borato de potasio 10 mM, Mes-Tris 10 mM pH 6.6, manteniendo constantes las longitudes de onda de emisión y excitación a 403 y 481 nm respectivamente, con 16 nm de paso de luz en ambos. Las flechas señalan las longitudes de onda elegidas para todos los experimentos posteriores.

Figura 9. Efecto de diferentes concentraciones de Fluram en el marcaje de la proteína inhibidora.



Se marcó el inhibidor diluido a dos concentraciones finales fijas: (●) 0.314 μM y (○) 0.11 μM en 0.15 y 0.1 ml borato de potasio 20 mM pH 8.0 respectivamente con las distintas concentraciones de Fluram en acetona 3.8% final que se indican, a temperatura ambiente. 0.02 unidades de fluorescencia corresponden a 1 mg/ml de sulfato de quinina en H_2SO_4 0.1 N.

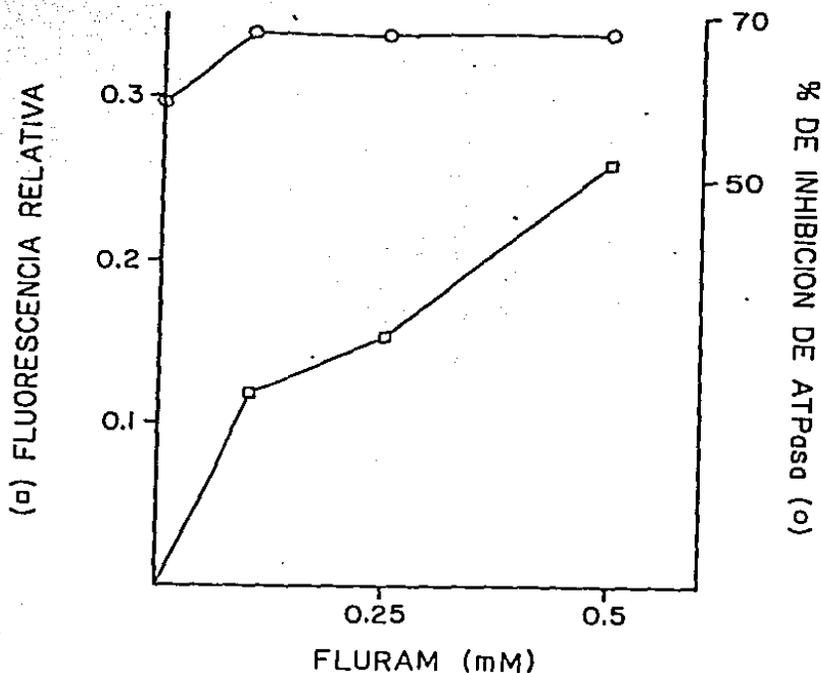
proteína posee un número limitado de grupos específicos expuestos capaces de reaccionar con el Fluram. Tales grupos corresponden supuestamente a las lisinas y posiblemente también al amino terminal.

Los dos experimentos ilustrados en la figura 9 se hicieron con las mismas condiciones de marcaje excepto por el volumen final, que en el experimento mostrado con puntos negros fue de 0.15 ml y en el que corresponde a los puntos blancos de 0.1 ml. Esto puede ser importante en una reacción en la que la probabilidad de reacción entre una molécula de fluram y una amina primaria depende no sólo de las concentraciones de ambas; es probable que un volumen mayor sea favorable para el rápido mezclado de los reactivos. Conviene recordar que el Fluram que no reacciona con una amina primaria (con un $t_{1/2}$ de reacción de msec) se hidroliza en segundos formando productos no fluorescentes.

Al probar la actividad inhibitoria del derivado fluorescente sobre la F₁ (figura 10), se observó que ésta no se modifica por el marcaje dentro del rango de concentraciones en el que el grado de marcaje fue proporcional a la concentración de Fluram utilizada aún cerca de la saturación de los posibles grupos marcables en estas condiciones. Esto podría indicar que no se habían saturado las 6 lisinas que producen la pérdida de la actividad al ser modificadas con otros reactivos (100,101).

La diferencia observada en las unidades de fluorescencia entre las figuras 9 y 10 se debe a que en la figura 9 las medidas se hicieron comparativas a una curva estándar de arginina marcada en las mismas condiciones y en la figura 10 se leyó comparando

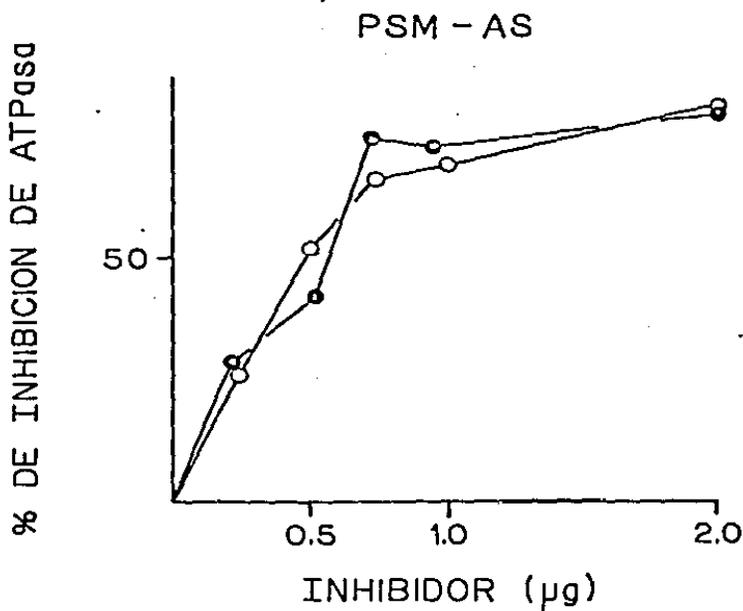
Figura 10. Actividad inhibitoria del derivado fluorescente de la proteina inhibidora con diferentes grados de marcaje sobre la ATPasa soluble (F_1)



El marcaje se llevó a cabo con inhibidor a $33 \mu\text{M}$ en 0.15 ml de borato de potasio 20 mM pH 7.5 con las concentraciones de Fluram que se indican. La inhibición de $4 \mu\text{g}$ de inhibidor se midió sobre $1 \mu\text{g}$ de F_1 con actividad específica de hidrólisis de ATP de $40 \text{ moles Pi min}^{-1} \text{ mo}^{-1}$.

Después de marcar y antes de medir fluorescencia, se equilibró con Mes-Tris 20 mM pH 6.5 filtrando la muestra por Sephadex G-25, como se detalla en la sección de materiales y métodos inciso 6a.

Figura 11. Capacidad inhibitoria comparativa de diferentes concentraciones de inhibidor nativo y marcado con Fluram sobre la actividad de ATPasa de particulas AS.



Se usaron 50 μg de psm-AS con una actividad hidrolitica especifica de 3.56 $\mu\text{moles Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y las cantidades indicadas de inhibidor control (●) y marcado con fluram (○) preincubando durante 20 min a 30°C en Mes-Tris 20 mM pH 6.5. La actividad ATPasa en 1 ml de Tris acetato 25 mM pH 7.4, acetato de potasio 30 mM, acetato de magnesio 3 mM, en presencia de fosfoenol piruvato 0.3 mM, ATP-NaOH 0.3 mM pH 7.4, 16 a 20 μl de NADH 30 mM disuelto en Tris acetato 25 mM pH 7.4 y 10 unidades de piruvato cinasa se evaluó por la cuantificación colorimétrica del Pi liberado. La intensidad de la fluorescencia del inhibidor utilizado fue de 0.26 unidades.

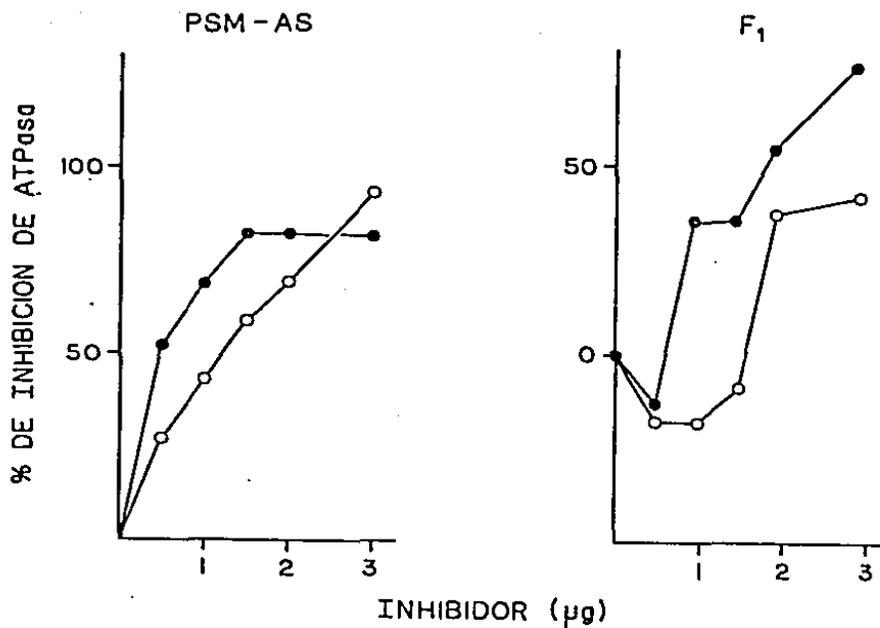
con un estándar de sulfato de quinina.

La capacidad inhibitoria del derivado fluorescente de la proteína inhibidora se estudió en comparación con la proteína sin marcar sobre la actividad ATPasa tanto de la enzima particulada (figura 11) como de la soluble (fig. 12). En la figura 11 se puede observar que no se detectó ninguna modificación por el marcaje de la inhibición producida; sin embargo, existieron lotes en los que el marcaje inhibió parcialmente su actividad, como se observó en el lote utilizado en la figura 12.

En el experimento mostrado en la figura 12, las condiciones de marcaje fueron las mismas que en el de la figura 11 excepto el volumen final, que esta vez fue 10 veces menor. Las curvas de inhibición demuestran que la actividad inhibitoria del derivado fluorescente es menor que la del control tanto si se mide en partículas submitocondriales como en F_1 soluble sin embargo, la diferencia de actividad inhibitoria observada entre los derivados fluorescentes usados en los experimentos de las figuras 11 y 12 es difícil de explicar por un mayor o menor número de grupos modificados puesto que la fluorescencia relativa de ambos fué muy similar: 0.26 y 0.20 unidades de fluorescencia para las figuras 11 y 12 respectivamente.

Tampoco puede deberse al contenido de inhibidor endógeno de las partículas empleadas en los 2 experimentos para evaluar la actividad del inhibidor ya que se utilizaron partículas de un mismo lote con una actividad específica de hidrólisis del ATP de 3 moles $\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$. Estos y otros experimentos no ilustrados, demuestran que ni el grado de marcaje ni la actividad inhibitoria

Figura 12. Capacidad inhibitoria comparativa del inhibidor marcado con Fluram y sin marcar sobre la actividad ATPasa soluble y particulada.



Se usaron 50 µg de psm-As ó 2 g de F₁ soluble con actividad hidrolítica específica de 3 y 34 moles Pi min⁻¹ mg⁻¹ respectivamente y las cantidades que se indicaron de inhibidor marcado (O) y sin marcar (●). La concentración de inhibidor durante el marcaje fue 10 µM en 0.15 ml de borato de potasio 20 mM pH 7.5, la intensidad de la fluorescencia era de 0.2 unidades de fluorescencia. La actividad se evaluó como en la figura anterior.

obtenida con el derivado fluorescente son fácilmente reproducibles, lo cual consideramos, representaba una desventaja considerable para el empleo del Fluram como reactivo marcador.

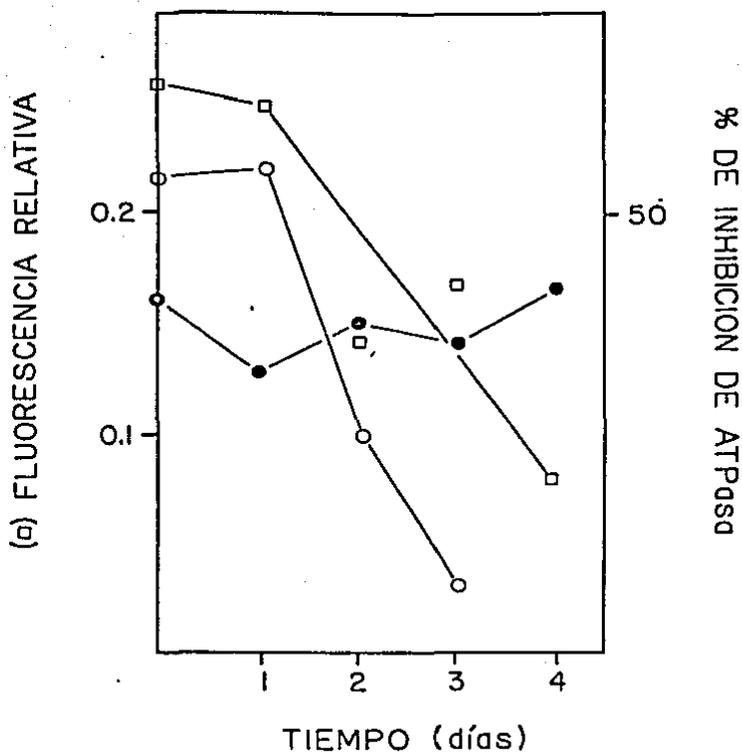
Como el problema mencionado podría ser superado si se preparaba un lote de inhibidor marcado suficientemente grande para realizar toda una serie de experimentos, se estimó importante determinar la estabilidad del derivado fluorescente.

La figura 13 muestra la estabilidad de la fluorescencia y de la actividad del inhibidor marcado cuando se almacenó a 4°C protegido de la luz. El derivado fluorescente empleado en este experimento fue el mismo que el utilizado en la figura 11. Como puede verse, tanto la actividad inhibitoria como la intensidad de la fluorescencia se conservaron 24 horas en el inhibidor marcado mantenido a 4°C; a tiempos mayores se pierden la actividad y la fluorescencia concomitantemente.

El experimento mostrado en la figura 14 demuestra que la intensidad de la fluorescencia del derivado se preserva mejor cuando se mantiene congelado a 0°C. En este experimento, aún la estabilidad a 4°C se mantuvo inalterada por 24 horas, como en el experimento mostrado en la figura 13.

Experimentos posteriores mostraron que el problema de la estabilidad puede ser resuelto manteniendo a 0°C en la oscuridad al derivado fluorescente ya que la intensidad de la fluorescencia se mantuvo constante en esas condiciones y se repitió con lotes diferentes de inhibidor marcado hasta por 20 días. Sin embargo no se midió la actividad remanente en esos experimentos pero es probable que tampoco la actividad se viera afectada puesto que como se puede apreciar en la figura 13 la pérdida de actividad es

Figura 13. Estabilidad de la fluorescencia y actividad inhibitoria a 4°C del inhibidor marcado con Fluram.



La actividad inhibitoria del inhibidor marcado (○) se muestra comparada con la del control (●). Aparece también en la gráfica la intensidad de la fluorescencia del derivado fluorescente. Las condiciones de marcaje fueron: inhibidor en borato de potasio 20 mM pH 7.5 a una concentración final de 10 μ M, Fluram 600 μ M en acetona 4.17% final.

paralela a la pérdida de fluorescencia. La figura 14 ilustra que la fluorescencia relativa del inhibidor marcado disminuye por dos congelaciones y descongelaciones sucesivas.

El empleo de marcadores fluorescentes puede permitir medir la interacción de un derivado fluorescente de la proteína inhibidora con su sitio de fijación en la enzima independientemente de la actividad, si existen cambios en la fluorescencia atribuibles al paso del fluoróforo de un medio acuoso a uno más hidrofóbico.

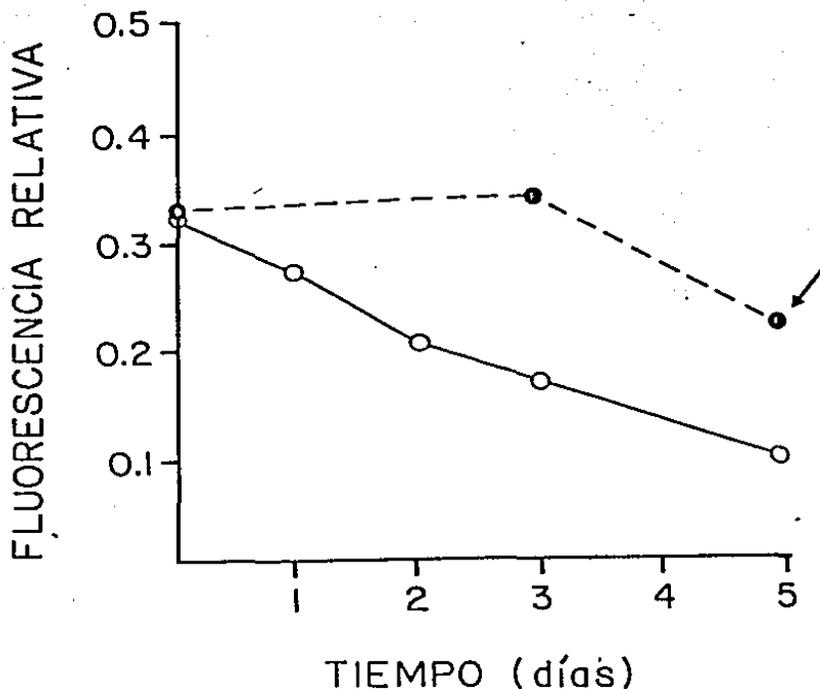
Cuando al inhibidor marcado se añadió enzima F_1 soluble en condiciones que promueven su asociación (i.e. pH 6.5 y Mg-ATP), se pudo detectar un cambio importante, rápido y reproducible en la intensidad de la fluorescencia, ilustrado en las tablas 1 y 2. Ambos experimentos se realizaron con dos lotes diferentes de inhibidor y de F_1 .

El cambio en la intensidad de la fluorescencia del inhibidor marcado es directamente proporcional a la cantidad de F_1 añadida, como se ilustra en la figura 15.

Por otro lado, los cambios observados no parecen deberse a dispersión de la luz causada por la enzima ya que una solución de enzima a concentración de 1.1 μ M no emitió ninguna fluorescencia en el rango registrado (450 a 550 nm) si es excitada a 405 nm tanto en presencia como en ausencia de Mg-ATP 2 mM en Mes-Tris 20 mM pH 6.5.

A pesar de que la magnitud del cambio observado en la intensidad de la fluorescencia (tablas 1 y 2) es pequeña, lo cual puede explicarse por la relativamente poca sensibilidad que

Figura 14. Estabilidad de la intensidad relativa de la fluorescencia del inhibidor marcado con Fluram a 4°C y 0°C.



La intensidad de fluorescencia del inhibidor marcado mantenido a 4°C (○) y congelado a 0°C (●) se muestran en la gráfica. El punto señalado con una flecha corresponde a la intensidad de la fluorescencia del inhibidor que fue sometido a los procesos de congelación y descongelación sucesivos. Las condiciones de marcaje fueron: inhibidor en borato de potasio 20 mM pH 7.5 a concentración final de 20 μ M, Fluram 500 μ M en acetona 4.1% final. Fluorescencia relativa del inhibidor marcado: 0.33 unidades.

Tabla 1. Cambios de intensidad de la fluorescencia del inhibidor marcado con Floram inducidos por F_1 .

F_1 (μ M)	Fluorescencia (UF)	Δ UF \times 100
-----	0.2939 \pm 0.0161	-----
0.55	0.3011 \pm 0.0093	0.72
1.11	0.3279 \pm 0.0130	3.39
2.22	0.3433 \pm 0.0112	4.94

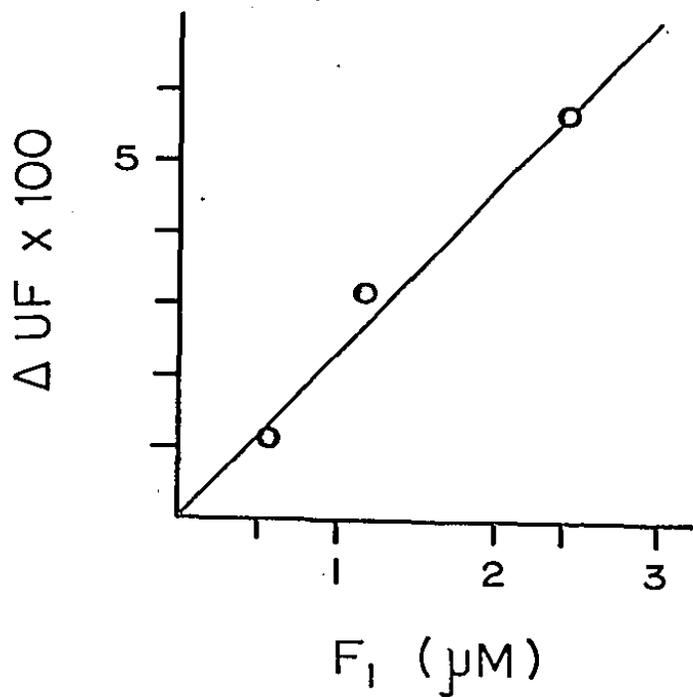
UF: unidades de fluorescencia, Δ UF: diferencia en UF entre el control (sin F_1) y los experimentales; tomando 9 lecturas de UF a intervalos de 15 seg. En todos los casos la concentración final de inhibidor fue 10 μ M en Mes-Tris 20 mM pH 6.5, borato de potasio 3.6 mM pH 8.0, Mg-ATP 2 mM. La fluorescencia de las muestras se midió a diferentes tiempos desde la adición de F_1 hasta 90 min.

Tabla 2. Cambios de intensidad de la fluorescencia del inhibidor marcado con Floram inducidos por F_1 .

F_1 (μM)	Fluorescencia (UF)	$\Delta\text{UF} \times 100$
----	0.3547 ± 0.0074	-----
0.56	0.3658 ± 0.0075	1.11
1.17	0.3862 ± 0.0109	3.15
2.40	0.41140 ± 0.0179	5.63

La concentración final de inhibidor era $7.43 \mu\text{M}$ en todos los casos en Mes-Tris 20 mM pH 6.5, borato de potasio 7 mM pH 8.0, Mg-ATP 2 mM . La fluorescencia se midió a diferentes tiempos desde la adición de F_1 hasta 40 min. La desviación estándar corresponde a 5 datos. Las abreviaturas usadas se explican en la Tabla 1.

Figura 15. Cambios de intensidad de la fluorescencia del inhibidor marcado en función de la concentración de F_1 .



Los datos graficados corresponden a las primera y última columnas de la tabla 2.

presentan en general los derivados fluorescentes del Fluram al medio en el que se encuentran (123,136), la reproducibilidad en el cambio de fluorescencia, aunado a la velocidad con la que se observa y el hecho de que permanezca constante en el tiempo, hacen de ésta una técnica invaluable para el estudio de tal interacción. Ya que se trata de una interacción rápida, no podría detectarse midiendo la inhibición, que es el otro parámetro que se ha utilizado para su estudio.

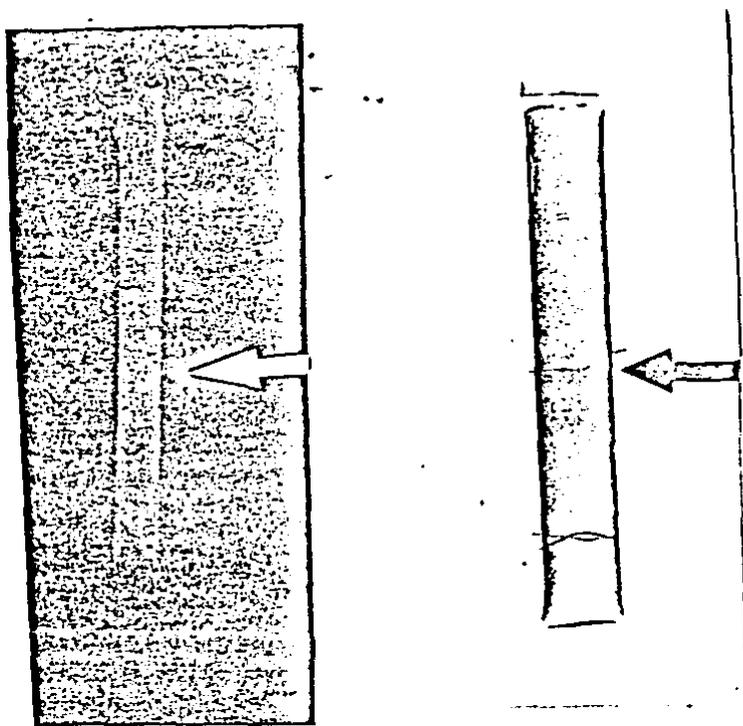
Un estudio detallado de estas interacciones, permitirá obtener constantes cinéticas de asociación y disociación y establecer las condiciones para la fijación de la proteína inhibidora en un sitio específico de la enzima. Cabe hacer notar que el empleo de marcadores fluorescentes evitan la necesidad de separar el inhibidor libre del unido a la enzima para detectar la interacción lo cual permite realizar estudios en intervalos de tiempo que no permitiría el uso de marcadores radioactivos.

Por otra parte, el empleo del Fluram, nos permitió detectar a la proteína inhibidora en geles de poliacrilamida en SDS bajo iluminación con luz ultravioleta de onda corta. (Ver figura 16).

Sin embargo, existen desventajas con el uso del Fluram como reactivo marcador, ya que el rendimiento cuántico de los derivados que forma, es significativamente menor que los de la fluoresceína o el dansilo (123); a pesar de ello, sus características espectrales resultan favorables ya que la emisión de los derivados del Fluram es máxima a longitudes de onda cortas, a las que la sensibilidad de la mayoría de los fototubos es mayor.

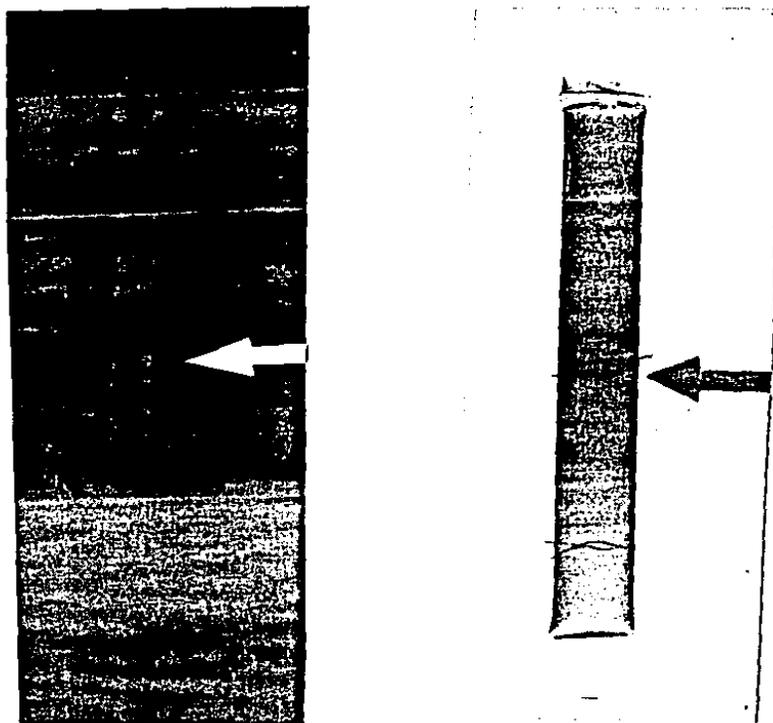
Quizás la principal desventaja es la poca reproducibilidad en el marcaje. Esto se puede atribuir a que la reacción con aminas

Figura 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS de inhibidor marcado con Fluram.



El gel contenía 40 μg de inhibidor marcado con Fluram.
a) Detección de fluorescencia en el gel con luz ultravioleta de onda corta. b) el mismo gel después de teñir con azul de Coomassie.

Figura 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida en SDS de inhibidor marcado con Fluram.



El gel contenía 40 μg de inhibidor marcado con Fluram.
a) Detección de fluorescencia en el gel con luz ultravioleta de onda corta, b) el mismo gel después de teñir con azul de Coomassie.

primarias (ver figura 4) se lleva a cabo en tiempos muy cortos del orden de mseg, ya que el reactivo que no reaccionó durante ese intervalo de tiempo con una amina, reacciona en segundos con el agua del medio formando productos de hidrólisis no fluorescentes (137). Ya que se considera que se produce una inactivación y no una destrucción irreversible por hidrólisis (136), tales productos podrían disminuir la capacidad inhibitoria del derivado fluorescente.

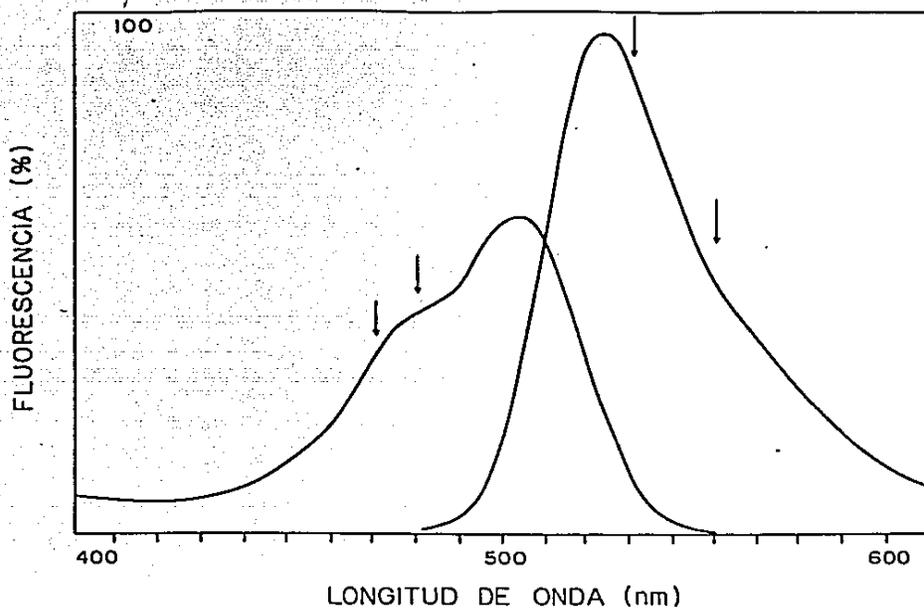
A pesar de las desventajas mencionadas, el derivado inhibitor-Fluram, ofrece posibilidades de estudio posteriores, utilizando las características del cambio de intensidad de la fluorescencia producido por F_1 y la posibilidad de detectarlo en geles de poliacrilamida con SDS.

A la luz de los resultados obtenidos con el Fluram, decidimos utilizar otro marcador fluorescente que nos permitiera completar el estudio posterior a la interacción del inhibidor con la enzima.

II. Marcaje y Caracterización de un derivado fluorescente de la proteína inhibidora con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

El isotiocianato de fluoresceína ha sido extensivamente usado para el marcaje covalente de proteínas debido a las ventajas que ofrece, como altos rendimiento cuántico y absorvencia, así como la estabilidad de los derivados formados (124). Incluso ha sido utilizado para medir distancias entre dos ligandos por transferencia de energía con otro fluoróforo que sirva como

Figura 17. Espectros de excitación y emisión no corregidos del inhibidor marcado con FITC.



Las flechas señalan las longitudes de onda elegidas para los experimentos: 470 y 530 nm de excitación y emisión respectivamente para medir intensidad y 480 y 550 nm de excitación y emisión respectivamente para medir polarización de la fluorescencia. Condiciones de marcaje: inhibidor /NaHCO₃ 50 mM pH 8.2 a concentración de proteína de 0.85 mg/ml (88.5 μ M), FITC 0.385 mM en metanol seco 3.8% final. La obtención de los espectros se realizó después de filtrar el derivado fluorescente por Sefadox G-50 equilibrado con Mes-Tris 50 mM pH 6.5, como se detalla en la sección de materiales y métodos, manteniendo constantes las longitudes de onda de emisión y excitación a 560 y 470 nm para obtener los espectros de excitación y emisión respectivamente.

donador o aceptor, según sus características espectrales.

La figura 17 muestra los espectros de excitación y emisión no corregidos del inhibidor marcado con FITC.

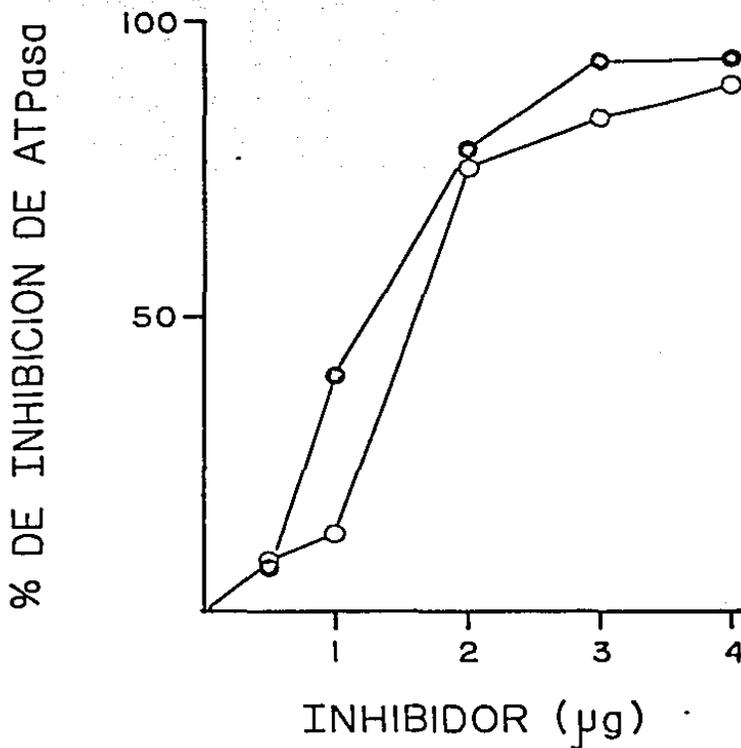
El espectro difiere de los reportados para otros derivados fluorescentes (138,122), ya que la altura del pico de excitación suele coincidir con la del pico de emisión esto se debe a que la longitud de onda de emisión escogida para obtener el espectro de excitación, no correspondía al máximo.

La capacidad inhibitoria del derivado fluorescente de la proteína inhibidora con el FITC, se ilustra en la figura 18, en la que puede observarse que la actividad inhibitoria del derivado fluorescente no se modifica con respecto al control, y que permaneció estable después de 5 días de congelamiento a 0°C. Por otro lado, las características de los espectros de fluorescencia no se afectaron en las mismas condiciones (no ilustrado).

A diferencia de lo observado con el Fluram y con muchos otros fluoróforos (124,125) la intensidad de la fluorescencia de los derivados de la fluoresceína es insensible al medio en el que se encuentra el fluoróforo. Sin embargo, la interacción de la proteína inhibidora marcada con la F₁ puede ser monitoreada registrando cambios en la polarización de la fluorescencia, lo cual permite observar eventos de fijación medidos como cambios en el coeficiente de difusión rotacional de una molécula pequeña marcada, como la proteína inhibidora, con una de mayor tamaño, como es la ATPasa. La polarización ofrece una técnica directa y simple para medir la interacción de ambas proteínas en tiempos cortos y en solución.

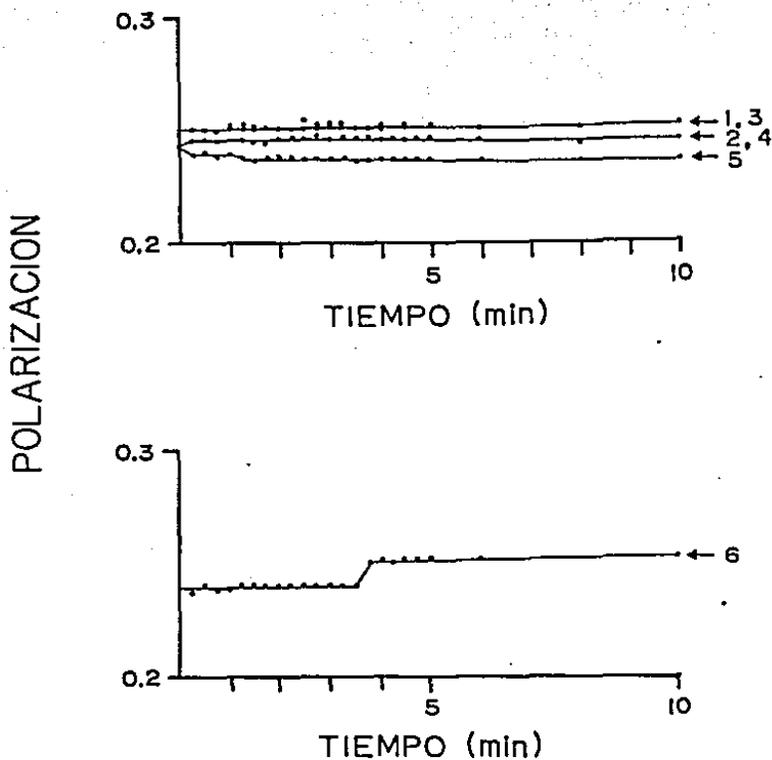
En la figura 19, se muestra un experimento en el que se midió

Figura 18. Curva de actividad del inhibidor marcado con FITC.



Se usaron 2 Hg de F_1 con actividad ATPasa específica de 59 $\mu\text{moles Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ y las cantidades indicadas de inhibidor marcado con FITC (O) y sin marcar (O) que se mantuvieron 5 días a 0°C en la oscuridad. Las condiciones de marcaje corresponden a las señaladas en la figura 17.

Figura 19. Polarización del inhibidor marcado con FITC en presencia de nucleótido y F_1 .



La polarización de la fluorescencia se midió a intervalos de 15 seg durante los primeros 5 min y a los 6, 8 y 10 min después de cada adición. Se usaron las siguientes concentraciones finales: inhibidor $6.9 \mu\text{M}$: en los trazos 1, 2 y 5 y 5.5 M en los trazos 3, 4 y 6; Mg-ATP y EDTA-ATP , 8.33 mM en los trazos 3 y 5 respectivamente y 6.7 mM en los trazos 4 y 6 en un volumen final de 0.12 ml de $\text{Mes-Tris } 50 \text{ mM pH } 6.5$ en los trazos 1, 3 y 5 y 0.15 ml en los trazos 2, 4 y 6; F_1 , $2.66 \mu\text{M}$ en los trazos 4 y 6 (Ver tabla 3).

la polarización de la fluorescencia del inhibidor marcado con FITC en presencia de F_1 en condiciones de asociación (i.e. pH 6.5 y Mg-ATP). Como puede verse, la polarización de la fluorescencia del inhibidor se mantuvo constante en el intervalo de tiempo registrado con 2 concentraciones distintas de inhibidor: $6.9 \mu\text{M}$ en el trazo 1 y $5.5 \mu\text{M}$ en el trazo 2, en presencia de Mg-ATP (trazo 3) y en presencia de Mg-ATP y F_1 (trazo 4).

La adición de F_1 en presencia de EDTA-ATP indujo un aumento en la polarización con respecto al control a los 3 min. con 45 seg. después de la adición de la enzima (trazo 6), lo que no sucede en presencia del nucleótido sin F_1 (trazo 5). Sin embargo, en presencia de Mg-ATP, la adición de la enzima produjo un cambio rápido, de menor magnitud y de sentido contrario al que se observó en presencia de EDTA-ATP (trazo 4).

Este experimento demuestra que es factible observar cambios en la polarización debidos a la interacción del inhibidor marcado con fluoresceína con la enzima en condiciones en las que se tiene EDTA-ATP en el medio, en las que la posible hidrólisis del sustrato se lleva a cabo a velocidades bajas pero suficientes para detectar la asociación de las proteínas. Sin embargo el hecho de que con Mg-ATP, que es el verdadero sustrato de la enzima, no se observe cambio en la polarización, podría explicarse si la reacción hidrolítica a cabo tan rápidamente, que no permitió la inhibición de la enzima por la proteína inhibidora debido a que la conformación hidrolítica de la enzima a la que se une el inhibidor (BO) hubiera sido fugaz; mientras que la hidrólisis lenta, en EDTA-ATP, pudo favorecer la acumulación de tal conformación hidrolítica en un número suficiente de enzimas.

En la figura 19 pudo observarse además, que la dilución del inhibidor marcado con FITC con el buffer produce una ligera depolarización (trazo 2) que no se observa cuando se diluye con Mg-ATP y que se acentúa mucho con EDTA-ATP. La actividad inhibitoria del inhibidor marcado usado en este experimento se ilustró en la figura 18 y no mostró diferencias con el control. Esto se muestra en la tabla 3, que contiene los resultados presentados gráficamente en la figura 19.

Con la finalidad de trabajar en un rango de concentración de proteína en el que al diluir por la adición de la enzima, la polarización no se viera modificada, se monitoreó el efecto de dilución. La tabla 4 ilustra el efecto de la dilución con buffer sobre la polarización de la fluorescencia del inhibidor marcado. Se observa que la polarización se mantuvo constante con concentraciones del inhibidor entre 2.8 y 1.8 μM .

En la tabla 5 se ilustra el efecto de depolarización inducido por la adición de F_1 en un experimento similar al de la figura 19 pero en el que la relación F_1 :inhibidor se incrementó al doble con la finalidad de amplificar el efecto observado. La concentración final de enzima se redujo 1.7 veces para evitar que se terminara el sustrato por hidrólisis.

En la tabla 5 se aprecia el efecto de depolarización previamente observado (tabla 3) por la adición de EDTA-ATP y el subsiguiente aumento en la polarización al añadir la enzima. Esta vez el aumento se observó desde el tiempo cero, que corresponde a la primera lectura tomada inmediatamente después de la adición y mezclado por inversión de la cubeta (aproximadamente 15

Tabla 3. Polarización de la fluorescencia del inhibidor marcado con FITC en presencia de nucleótido y F_1 .

	I (μ M)	Mg-ATP (mM)	EDTA-ATP (mM)	F_1 (μ M)	Polarización	n
1)	6.9	----	----	----	0.2505 ± 0.0006	24
2)	5.5	----	----	----	0.2450 ± 0.0011	23
3)	6.9	8.3	----	----	0.2510 ± 0.0008	24
4)	5.5	6.7	----	2.7	0.2442 ± 0.0008	24
5)	6.9	----	8.3	----	$t_1) 0.2394 \pm 0.0010$	14
6)	5.5	----	6.7	2.7	$t_2) 0.2514 \pm 0.0011$	8

Las unidades de polarización corresponden al promedio de los valores graficados en la figura 19. n es el número de datos. El intervalo de tiempo t_1 corresponde a las medidas tomadas hasta los 3 min 30 seg y t_2 desde 3 min 45 seg hasta 10 min.

Tabla 4. Efecto de dilución sobre la polarización de la fluorescencia del inhibidor marcado con FITC.

Inhibidor (μM)	Polarización	n
3.48	0.2189 \pm 0.0012	24
2.78	0.2121 \pm 0.0009	24
2.32	0.2128 \pm 0.0010	24
1.82	0.2106 \pm 0.0009	24

Se registró la polarización del inhibidor marcado a diferentes diluciones con Mes-Tris 50 mM pH 6.5 cada 15 seg durante 5 min y a los 6,7 y 10 min (la polarización es un promedio de todas las lecturas observadas), n corresponde al número de datos.

Tabla 5. Polarización de la fluorescencia del inhibidor marcado con FITC en presencia de nucleótido y F_1 .

Inhibidor (μ M)	EDTA-ATP (mM)	Mg-ATP (mM)	F_1 (μ M)	Polarización
1) 2.8	----	----	----	0.2121 \pm 0.0009
2) 2.8	10	----	----	0.1773 \pm 0.0017
3) 1.8	7.4	----	2	0.1928 \pm 0.0010
4) 2.8	----	10	----	0.2180 \pm 0.0006
5) 1.8	----	7.4	2	0.2277 \pm 0.0007

Se registró la polarización de la fluorescencia del inhibidor marcado cada 15 seg. durante los primeros 5 min después de la adición y a los 6.7 y 10 min. En todos los casos, las lecturas corresponden al promedio de 24 datos.

segundos). Suponemos que lo anterior se debe a que en las condiciones de este experimento se tenía aproximadamente una molécula de inhibidor por molécula de F_1 , mientras que en el de la tabla 3 la relación era de 2 moléculas de inhibidor por molécula de enzima. Estas nuevas condiciones debieron favorecer un aumento en la velocidad de la interacción por ley de acción de masas.

Es importante señalar que en ambos casos (figura 19 y tabla 5), la formación del complejo enzima-inhibidor, se supone que estaba favorecida según las constantes cinéticas reportadas: la k_a (constante de disociación) reportada por Gómez-Fernández y Harris (80) es de $10^{-9}M$ y de $9.6 \times 10^{-9}M$ la reportada por Power y col. (110) para el inhibidor exógeno reconstituido en partículas submitocondriales carentes de inhibidor endógeno (psm-AS).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que es posible obtener un derivado fluorescente del inhibidor natural de la ATPasa mitocondrial activo tanto con Fluram (figuras 10, 11 y 12), como con FITC (figura 18). Ambos permiten monitorear la asociación de las proteínas independientemente de la medida de actividad de la enzima, el derivado de la fluorescamina por cambios en la intensidad de la fluorescencia (tablas 1 y 2) y el de la fluoresceína por cambios en la polarización (tablas 3 y 5, figura 19).

Según los resultados expuestos, concluimos que la utilización de FITC para la obtención del derivado fluorescente, ofrece mayores ventajas que la de Fluram. Por un lado, la dificultad metodológica para reproducir el grado de marcaje tanto como la actividad inhibitoria del derivado fluorescente de la

fluorescamina (figuras 11 y 12) colocan en desventaja a éste reactivo marcador con respecto a la fluoresceína. No obstante, la estabilidad que presenta el derivado de la fluorescamina al ser almacenado a 0°C (figura 14) ofrece una solución al problema planteado.

Por otro lado, la fluoresceína ofrece la posibilidad de obtener un derivado fluorescente con las características deseadas tanto con respecto a la fluorescencia, cuya intensidad es de 5 a 10 veces mayor que la de los derivados del fluram como a la actividad inhibitoria, que puede preservarse totalmente inalterada (figura 18). El presente trabajo aporta el esquema metodológico optimizado para obtener un derivado de la fluoresceína con tales características (figura 7).

Los resultados presentados en este trabajo, demuestran que existe una interacción rápida entre el inhibidor y la enzima, que se lleva a cabo en un lapso de tiempo menor a 15 segundos en condiciones adecuadas y que puede detectarse mediante el cambio en la intensidad de la fluorescencia del inhibidor marcado con fluorescamina (tabla 3) o bien mediante el cambio en la polarización de la fluorescencia del inhibidor marcado con FITC (tabla 5).

El aumento en la intensidad de la fluorescencia observado por la interacción del inhibidor marcado con fluorescamina, sugiere que el microambiente que rodea al fluoróforo cuando el inhibidor está unido a la enzima es de una naturaleza más apolar que cuando se encuentra el inhibidor en solución. Esto parece indicar que el o los grupos lisina de la proteína inhibidora

modificados por la fluorescamina, se localizan en o cerca del sitio de fijación a la enzima.

Cuando una muestra fluorescente se excita por luz polarizada, la luz emitida será también polarizada. Sin embargo, la emisión puede ser depolarizada por distintos fenómenos entre los que se cuenta la difusión rotacional de los fluoróforos. Las medidas de polarización de estado estable, son un promedio del desplazamiento angular del fluoróforo que ocurre entre la absorción y la subsecuente emisión de un fotón.

La disminución de la polarización de la fluorescencia del inhibidor marcado con FITC tanto por efecto de dilución, como por la adición de EDTA-ATP en el medio sugiere que ambos factores aumentan la movilidad del inhibidor en solución. Esto podría ser correlacionado con la tendencia a formar agregados en soluciones acuosas saturadas de sales, que presenta la proteína inhibidora, fenómeno previamente descrito por Klein y col. (95). Por el contrario, el aumento que se observa en la polarización de la fluorescencia del inhibidor marcado con FITC al añadir F_1 , sugiere una movilidad más restringida del fluoróforo debida a la unión de ambas proteínas. Cabe hacer notar que si los grupos lesina de la proteína inhibidora modificados por la fluoresceína se localizaran en o cerca del sitio de fijación a la enzima, cabría esperar un mayor aumento en la polarización de la fluorescencia por la interacción que si los grupos modificados se localizaran lejanos al sitio de fijación; siempre y cuando no existiera una causa extrínseca de depolarización como el movimiento local del fluoróforo, independiente de la difusión rotacional de la proteína a la que está unido. La magnitud del

cambio de la polarización del inhibidor marcado observado en este trabajo, podría explicarse por la ocurrencia de cualquiera de estos fenómenos e incluso de ambos. Los grupos lisina modificados por la fluoresceína pueden no corresponder a los modificados por la fluorescamina que parece poco probable, ya que cabría esperar que ambos reaccionaran con los grupos lisina más expuestos, que deben ser los mismos en los 2 casos puesto que el marcaje se lleva a cabo al mismo pH. Por otro lado, puede haber depolarización por libertad de rotación del fluoróforo unido a la proteína, lo que disminuye la magnitud de los cambios observados en la polarización cuando disminuye la movilidad de la proteína marcada. Este ha demostrado ser el caso en otras proteínas marcadas con fluoresceína (138).

Es interesante señalar que la velocidad de interacción entre las proteínas detectada mediante el aumento en la polarización de la fluorescencia del inhibidor marcado con FITC se incrementó en condiciones de hidrólisis lenta (EDTA-ATP) cuando la relación de inhibidor:enzima se disminuyó de 2:1 a 1:1, (tablas 3 y 5 respectivamente) lo que equivale a aumentar los sitios de fijación para el inhibidor. Esto demuestra que es posible manipular en el tiempo la interacción primaria que sucede entre ambas proteínas y tener así la reacción "en cámara lenta".

Por último, es conveniente señalar la importancia de la obtención de un derivado fluorescente de la proteína inhibidora. La interacción primaria que se produce entre el inhibidor y la enzima en condiciones de asociación, no ha sido caracterizada como tampoco la disociación por activación de la enzima. A esto

respecto, se desconoce aún el sitio al que es desplazado el inhibidor, es decir si existe un sitio no inhibitorio en la enzima, como ha sido sugerido por trabajos previos y actuales de nuestro grupo de trabajo.

Por otro lado, no se cuenta con información acerca de la ubicación del sitio inhibitorio de la proteína inhibidora sobre la enzima. Es posible determinar la cercanía que existe entre éste y el sitio catalítico de la enzima u otros sitios específicos de ésta en los que se puedan unir reactivos fluorescentes capaces de transferir energía singuleto-singuleto con la fluoresceína.

REFERENCIAS

- 1) Schneider, W.C. y Potter, V.R. (1947) J. Biol. Chem. 177, 893-903.
- 2) Kennedy, E.P. y Lehninger, A.L. (1949) J. Biol. Chem. 179, 957-972.
- 3) Friedkin, M. y Lehninger, A.L. (1949) J. Biol. Chem. 178, 611-623.
- 4) Racker, E. ed. (1970) Membranes of Mitochondria and Chloroplasts A.C.S. (Amer. Chem. Soc.) Monogr. 165. 322 pp.
- 5) Sjostrand, F.S. (1953) Nature (Lond.) 171, 30-32.
- 6) Nas, S., Nass, M.M.K. (1963) J. Cell. Biol. 19, 613-629.
- 7) Evans, I.H. (1963) en Yeast Genetics (Springer Series in Molecular Biology) Springer-Verlag N.Y.Inc. Spencer y col. eds. pp 627-370.
- 8) Ernster, L. y Kuylenstierna, B. (1970) en Membranes of Mitochondria and Chloroplasts. Racker, E. ed. Van Nostrand Reinhold N.Y. pp 172-212.
- 9) Parsons, D.F., Williams, B.R. y Chance, B. (1966) Ann. N.Y. Acad. Sci. 137, 643-666.
- 10) Parsons, D.F. y Yano, Y. (1967) Biochim. Biophys. Acta 135, 362-364.
- 11) Ernster, L. y Kuylenstierna B. (1969) FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Symp. 17, 5-31.
- 12) Schnaitman, C. y Breznauait, J.W. (1968) J. Cell. Biol. 38, 158-175
- 13) Stoffel, W. y Schlofer, H.G. (1968) Hoppe Seyler's Z.

- Physiol. Chem. 347, 1017-1026.
- 14) Colombini, M. (1979) Nature (Lond.) 279, 643-645.
 - 15) Zalman, L.S., Nikaïdo, H. y Kagawa Y. (1980) FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Symp. 17, 5-31.
 - 16) Ito, A. (1971) J. Biochem. (Tokyo) 70, 1061-1064
 - 17) Maccocchini, M.L., Rudin, Y. y Schatz, G. (1979) J. Biol. Chem. 254, 7468-7471.
 - 18) Palade, G.E. (1952) Anat. Rec. 114, 427-451.
 - 19) Klingenberg, M. y Pfaff, E. (1966) Biochem. Biophys. Acta (Libr.) 7, 180-200.
 - 20) Wrigglesworth, J.M., Packer, L. y Branton D. (1970) Biochim. Biophys. Acta 205, 125-135.
 - 21) Racker, E. (1970) en Membranes of Mitochondria and Chloroplasts. Racker E. ed. Van Nostrand Reinhold N.Y. pp 127-155.
 - 22) Ernster, L. y Schatz, G. (1981) J. Cell. Biol. 91 (3), 227e-255s.
 - 23) Norum, K., Farstadt, M. y Bremer, J. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 24 (5), 797-804.
 - 24) Mc Kay, R., Druyan, R. y Rabinowitz, M. (1962) Fed. Proc. 27, 774.
 - 25) De Pierre, J.W. y Ernster, L. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 201-262.
 - 26) Uzzell, T. y Spoleky, Ch. (1974) American Scientist 62, 334-343.
 - 27) Margulis, L. (1971) Sci. Am. 255 (2), 48-57.
 - 28) Mitchell, P. (1979) Am. Assoc. Adv. Sci. 206, 1148-1157.
 - 29) Nicholls, D.G. (1982) "Bioenergetics" Academic Press Inc.

(Lond.) L.T.D. 191 pp

- 30) Ansel, H.L. y Pedersen, P.L. (1983) *Ann. Rev. Biochem.* 52, 601-624.
- 31) Knowles, A.F. y Penefsky, H.S. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6624-6630.
- 32) Senior, A.G. y Brooks, J.C. (1971) *FEDS Lett.* 17 (2), 327-329.
- 33) Huberman, M. y Salton, M.R.J. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 547, 230-240.
- 34) Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H., Kagawa, Y. y Ui, N. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 9525-9533.
- 35) Todd, R.D., Griesenbeck, T.A. y Douglas, M.G. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 5461-5467.
- 36) Sutterheim, E., Henneke, N.A.C. y Berden, J.A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 634, 271-278.
- 37) Catterall, W.A., Coty, W.A. y Pedersen, P.L. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 7427-7431.
- 38) Wagenvoort, R.J., Van der Kraan, I. y Kemp, A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 460, 17-24.
- 39) Harris, D.A., Gómez-Fernández, J.C., Klungsoyr, L. y Radda, G.K. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 504, 361-393.
- 40) Garret, N.E. y Penefsky, H.S. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 6640-6647.
- 41) Senior, A.E. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 11319-11322.
- 42) Cross, R.L. y Malin, C.M. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 2871-2881.
- 43) Futai, H. y Kanazawa, H. (1980) *Curr. Top. Bioenerget.* 10,

- 44) Kagawa, Y., Ohta, S., Yoshida, M. y Sone, N. (1980) Ann. N.Y. Acad. Sci. 358, 103-117.
- 45) Koslov, I.A. y Milgrom, Y.H. (1980) Eur. J. Biochem. 106, 457-462.
- 46) Dunn, S.D., Heppel, L.A. (1981) Arch. Biochem. Biophys. 210, 421-436.
- 47) Esch, F.S. y Allison, W.S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10740-10746.
- 48) Yoshida, M., Poser, J.W., Allison, W.S. y Esch, F.S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 148-153.
- 49) Esch, F.S., Bohlen, P., Otsuka, A.S., Yoshida, M. y Allison, W.S. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9084-9089.
- 50) Budker, V.G., Koslov, J.A., Kurbatov, V.A. y Milgrom, Y.H. (1977) FEBS Lett. 83, 11-14.
- 51) Drutsa, V.L., Koslov, I.A., Milgrom, Y.H., Shabarova, Z.A. y Sokolova, N.I. (1979) Biochem. J. 182, 617-619.
- 52) Lauquin, G., Fugoois, R. y Vignais, P.V. (1980) Biochemistry 19, 4620-4626.
- 53) Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H. y Kagawa, Y. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74(3), 936-940.
- 54) Tena de Gómez-Puyou, M., y Gómez-Puyou, A. (1981) Arq. Biol. Tecnol. 24 (2), 207-221.
- 55) Mac Lennan, D.H. y Tsagoloff, A. (1968) Biochemistry 7(4), 1603-1610.
- 56) Knowles, A.F., Guillery, R.J. y Racker, E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2672-2679.
- 57) Fossenden-Raden, J.N. (1972) J. Biol. Chem. 247, 2351-2357.

- 58) Glasser, E., Morling, B. y Ernster, L. (1980) Eur. J. Biochem. 110, 225-235.
- 59) Sanadi, D.R. (1982) Biochim. Biophys. Acta 683, 39-56.
- 60) Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Nordenbrand, K. y Ernster, L. (1977) en Function and Molecular Aspects of Biomembrane Transport (Qualiariello y col. eds.) Elsevier/North Holland Biomedical Press. pp 119-133.
- 61) Weiss, M.A. y McCarty, R.E. (1977) J. Biol. Chem. 252, 8007-8012.
- 62) Pullman, M.E. y Monroy, G.C. (1963) J. Biol. Chem. 238, 3762-3769.
- 63) Chan, S.H.P. y Barbour, R.L. (1976) Biochim. Biophys. Acta 430, 426-433.
- 64) Satre, M., de Jerphanion, M.B., Huet, J. y Vignais, P.V. (1975) Biochim. Biophys. Acta 387, 241-255.
- 65) Ebner, E. y Maier, K.L. (1977) J. Biol. Chem. 252, 671-676.
- 66) Smith, J.B., Sternuris, P.C. y Heppel, L.A. (1975) J. Supramol. Struct. 3, 248-255.
- 67) Adolfsen, R. y Moudrianakis, E.N. (1976) Biochemistry 15, 4163-4170.
- 68) Mileykovskaya, E., Tikhonova, G.V., Kondrashin, A.O. y Koslov, I.A. (1976) Eur. J. Biochem. 62, 613-617.
- 69) Nelson, N., Nelson, H. y Packer, E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 7657-7662.
- 70) Fillingame, R.H. (1981) Curr. Top. Bioenerget. 11, 35-106.
- 71) Nelson, N. (1981) Curr. Top. Bioenerget. 11, 1-33.
- 72) Senior, A.E. (1979) en Energy Transduction (Capaldi, R.O.

ed.) pp 233-278. Marcel Dekker N.Y.

- 73) Alfonzo, M. y Racker, E. (1979) Can. J. Biochem. 57, 1351-1358.
- 74) Wilson, D.F., Stubbs, M., Veech, R.L., Erecińska, M. y Krebs, H.A. (1974) Biochem. J. 140, 57-64.
- 75) Ernster, L., Juntti, K. y Asami, K. (1973) J. Bioenergetics 4, 149-159.
- 76) Van de Stadt, R.J., de Boer, R.L. y Van Dam, K. (1973) Biochim. Biophys. Acta 292, 338-349.
- 77) Gómez-Puyou, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Ernster, L. (1979) Biochim. Biophys. Acta 547, 252-257.
- 78) Harris, D.A., von Tscharnner, V. y Radda, G.K. (1979) Biochim. Biophys. Acta 548, 72-84.
- 79) Tuena de Gómez-Puyou, M., Gavilanes, M., Gómez-Puyou, A. y Ernster, L. (1980) Biochim. Biophys. Acta 592, 393-405.
- 80) Gómez-Fernández, J.C. y Harris, D.A. (1978) Biochem. J. 176, 967-975.
- 81) Horstman, L.L. y Racker, E. (1970) J. Biol. Chem. 245, 1336-1344.
- 82) Tuena de Gómez-Puyou, M., Nordenbrand, K., Hüller, U., Gómez-Puyou, A. y Ernster, L. (1980) Biochim. Biophys. Acta 592, 385-395.
- 83) Pedersen, P.L., Schwertmann, K. y Cintrón, N. (1981) Curr. Top. Bioenerg. (Sanadi, R. ed.) 11, 149-177.
- 84) Pullman, M.E. y Garber, E.R. (1961) Abstr. Commun. Int. Congr. Biochem. 5th 1961 p. 470.
- 85) Cintrón, N. y Pedersen, P.L. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3439-3443.

- 86) Dreyfus, G. y Satre, M. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 229, 212-217.
- 87) Cantley, L.C. (1981) Curr. Top. Bioenerg. 11, 201-237.
- 88) Hasselbach, W. (1977) Biophys. Struct. Mech. 3, 43-
- 89) Carafoli, E. y Turini, M. (1982) Biochim. Biophys. Acta 683, 279-301.
- 90) Frangione, B., Rossenwasser, E., Penefsky, H. y Pullman, M.E. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7403-7407.
- 91) Matsubara, H., Hase, T., Hashimoto, T. y Tagawa, K. (1981) J. Biochem. 90, 1157-1165.
- 92) Muñoz, E. (1982) Biochim. Biophys. Acta 650, 233-265.
- 93) Kanner, B.I., Serrano, R., Kandrach, M.A. y Racker, E. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 69 (4) 1050-1056.
- 94) Brooks, J.C. y Senior, A.E. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 147, 467-470.
- 95) Klein, G., Satre, M., Zaccari, G., y Vignais, P. (1982) Biochim. Biophys. Acta 681, 226-232.
- 96) Harris, D.A. (1984) en H⁺-ATPase (ATP-synthase): Structure, Function, Biogenesis. The F₀-F₁ Complex of Coupling Membranes. (Papa, S., Altendorf, K., Ernster, L. y Packer, L. eds.) Adriatica Editrice. Bari.
- 97) Tuena de Gómez-Puyou, M., Müller, U., Devans, S., Nava, A. y Dreyfus, G. (1982) FEBS Lett. 146, 169-172.
- 98) Hasebe, H., Yamazaki, S., Aizawa, A.M., Tamura, Y., E Inada, Y. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 7 (3) 932-938.
- 99) Klein, G., Satre, M. y Vignais P. (1977) FEBS Lett. 84, 129-

134.

- 100) Klein, G., Satre, M., Dianoux, A.C. y Vignais, P.V. (1980) Biochemistry 19, 2919-2925.
- 101) Klein, G., Satre, M., Dianoux, A.C., y Vignais, P.V. (1981) Biochemistry 20, 1337-1344.
- 102) Ernster, L., Asami, K., Juntti, K., Coleman, J. y Nordenbrand, K. (1977) Struct. Biol. Membr. Proc. Nobel Symp. 34th pp 135-155
- 103) Juntti, K., Asami, K. y Ernster, L. (1971) FEBS Meet. 7th Abstract No. 660
- 104) Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Salmon, M. (1977) Biochim. Biophys. Acta 461, 101-108.
- 105) Klein, G. y Vignais, P.V. (1983) J. Bioenerg. Biomembr. 15, 347-362.
- 106) Krull, K.W. y Schuster, S.M. (1981) J. Biol. Chem. 256, 6641-6645
- 107) Galante, Y.M., Nong, S-Y. y Hatofi, Y. (1982) Biochemistry 21, 680-687. Exp. Biol. 39, 1844 (abstr.)
- 108) Beltrán, C., Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puyou, A. y Daraszon, A. (1984) Eur. J. Biochem. 144, 151-157.
- 109) Van de Stadt, R.J. y Van Dam, H. (1974) Biochim. Biophys. Acta 347, 240-252
- 110) Power, R., Cross, R.L. y Harris, D.G. (1983) Biochim. Biophys. Acta 724, 128-141
- 111) Farron, F. y Racler, E. (1970) Biochemistry 9, 3829-3836
- 112) Feinstein, D.L. y Moudiatakis, E.N. (1984) J. Biol. Chem. 259, 4230-4236.
- 113) Bruni, A. y Bigon, E. (1974) Biochim. Biophys. Acta 357,

333-343.

- 114) Klein, G., Lunardi, J. y Vignais, P.V. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 636, 185-192.
- 115) Schuerzmann, K. y Pedersen, P.L. (1981) *Biochemistry* 20, 6305-6311.
- 116) Dreyfus, G., Gómez-Puyou, A., y Gómez-Puyou, M.T. (1981) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 100, 400-406
- 117) Van de Stadt, R.J., De Boer, D.L. y Van Dam, K. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 292, 338-349
- 118) Hussein, I., Jackson, P. y Harris, D.A. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 806, 64-74
- 119) Satre, M., de Jerphanion, M-B., Huet, J. y Vignais, P.V. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 387, 241-255
- 120) Klein, G., Satre, M. y Vignais, P.V. (1977) *FEDS Lett.* 81 129-134
- 121) Wong, S-Y., Galante, Y.M. y Hatofi, Y. (1982) *Biochemistry* 21, 5781-5787.
- 122) Fairclough, R.H. y Cantor, Ch.R. (1978) *Methods. Enzymol.* Vol. XLVIII,17, 347-379.
- 123) Chen, R.F. (1974) *Anal. Lett.* 7 (1), 65-77
- 124) Lackowickz, J.R. (1983) "Principles of Fluorescence Spectroscopy" Plenum Press N.Y.
- 125) Pick, U. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102(1), 165-171
- 126) Smith, A.L. (1967) *Methods. Enzymol.* Vol. X Estabrook, R. y Pullman, M.P. (eds.) Academic Press 81-86.
- 127) Racker, E. y Horstman, L.L. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 2547-

2551.

- 128) Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 182, 82-86.
- 129) Pullman, M.E., Penefsky, H.S., Datta, A. y Racker, E. (1960) J. Biol. Chem. 235, 3322-3329.
- 130) Sumner, J.B. (1944) Science (Wash, D.C.) 100, 413-415.
- 131) Penefsky, H.S. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2871-2899.
- 132) Nickoff, W., Rodbard, D. y Chrambach, A. (1977) Anal. Biochem. 78, 459-482.
- 133) Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.
- 134) Gornall, A.G., Bardawill, C.J. y David, M.M. (1949) J. Biol. Chem. 177, 751-766.
- 135) Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254.
- 136) De Bernardo, S., Weigle, M., Toome, V., Manhart, K., Leimgruber, W., Bohlen, P., Stein, S. y Udenfriend, S. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 163, 390-399.
- 137) Udenfriend, S., Stein, S., Bohlen, P., Dairman, W., Leimgruber, W. y Weigle, M. (1972) Science 178, 871-872.
- 138) Chen, R.F. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 133, 263-276.