

03062
2ej. 12

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESTUDIOS SOBRE LA HIDROLISIS DEL ATP Y SU REGULACION POR LA
H⁺-ATPasa MITOCONDRIAL.**

TESIS

**que para obtener el grado de
Maestra en Investigación Biomedica
Basica**

presenta

BIOL. NORA CECILIA VAZQUEZ LASLOP

1987

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESULTADOS	25
<u>Efecto del LDAO sobre la actividad hidrolítica de partículas submitocondriales</u>	25
<u>Liberación de la acción de la proteína inhibidora</u>	28
Propiedades de los extractos de Tritón X-100 de partículas submitocondriales	28
Actividad de ATPasa de las preparaciones asociadas con el inhibidor en presencia del LDAO	28
Reversibilidad del efecto del LDAO sobre la actividad de ATPasa de un extracto de Tritón de partículas de Mg-ATP	34
Curvas de inhibición con IF ₁ en extractos de Tritón de partículas de Klein. Efecto del LDAO	37
Cinéticas de ATP para extractos de Tritón con inhibidor endógeno y exógeno. Efecto del LDAO	39
Efecto del pH y de la temperatura sobre las curvas de LDAO de la actividad hidrolítica de extractos de Tritón de partículas de Mg-ATP	41
<u>Efecto del LDAO sobre la actividad hidrolítica de preparaciones sin proteína inhibidora</u>	43
Estabilidad en el frío de un extracto de Tritón de partículas de Klein activado con LDAO	43
Efecto de la fosfatidilcolina sobre la actividad de ATPasa de un extracto de Tritón de partículas de Klein	45
<u>Efecto del colato y del CHAPS sobre la actividad hidrolítica de partículas de Mg-ATP</u>	47
<u>Efecto del LDAO sobre la F₁ soluble modificada con DCCD o con NBD-C1</u>	47
DISCUSION	52
PERSPECTIVAS	64
REFERENCIAS	66
ABREVIATURAS	71

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Efecto de detergentes sobre la F_1 de diferentes sistemas	14
Figura 1. Efecto del LDAO sobre la hidrólisis de partículas de Mg-ATP y de Klein	26
Tabla 2. Solubilización con Tritón X-100 de partículas submitocondriales. Sensibilidad a oligomicina	29
Figura 2. Efecto del LDAO sobre la hidrólisis de un extracto de Tritón de partículas de Mg-ATP	30
Figura 3. Efecto del LDAO sobre la hidrólisis de partículas de Klein o de un extracto de Tritón reconstituidos con IF_1	32
Figura 4. Efecto del LDAO sobre la hidrólisis de la F_1 soluble	33
Figura 5. Efecto de la dilución del LDAO sobre la hidrólisis de ATP de un extracto de Tritón de partículas de Mg-ATP	36
Figura 6. Curvas de inhibición con IF_1 para extractos de Tritón de partículas de Klein. Efecto del LDAO	38
Figura 7. Curvas de ATP para las reacciones de hidrólisis de ATP de los extractos de Tritón de partículas submitocondriales con IF_1 endógeno o reconstituido. Efecto del LDAO	40
Figura 8. Efecto del pH y de la temperatura sobre las curvas de LDAO para la hidrólisis de ATP de extractos de Tritón de partículas de Mg-ATP	42
Figura 9. Hidrólisis de ATP de un extracto de Tritón de partículas de Klein	44
Figura 10. Hidrólisis de ATP de extractos de Tritón de partículas de Klein o de la F_1 soluble incubados a 4°C. Efecto de la presencia de LDAO	46
Figura 11. Efecto de la fosfatidilcolina sobre la hidrólisis de un extracto de Tritón de partículas de Klein	48
Figura 12. Efecto del colato de sodio y del CHAPS sobre la actividad hidrolítica de partículas de Mg-ATP	49
Figura 13. Efecto del LDAO sobre la actividad hidrolítica de los complejos F_1 -DCCD y F_1 -NBD-Cl	51

RESUMEN

La actividad hidrolítica de la H⁺-ATPasa mitocondrial es afectada por distintas concentraciones del detergente Lauril dimetilamino óxido (LDAO). El LDAO puede modificar la actividad de ATPasa de sistemas asociados con la proteína inhibidora endógena o agregada, ya sean partículas submitocondriales, extractos de Tritón X-100 de partículas o la F₁ soluble con inhibidor. Sin embargo, también afecta la hidrólisis de sistemas carentes de la proteína inhibidora, como son las partículas submitocondriales de Klein o los extractos de Tritón X-100 derivados de las mismas. En contraste, la actividad hidrolítica de la F₁ soluble no es modificada por el detergente.

Se sugiere que, además de la proteína inhibidora, la actividad hidrolítica de la F₁ es controlada por interacciones entre subunidades, incluyendo las del canal F₀.

INTRODUCCION

Todas las actividades que realizan los seres vivos como el crecimiento, la reproducción, el desarrollo y la evolución son procesos endergónicos cuya realización depende de que estén acoplados a una fuente de energía. Las fuentes primarias de energía para los seres vivos son la energía libre de muchas transformaciones químicas y la luz solar. La bioenergética se ocupa, precisamente, de estudiar los mecanismos por los cuales la energía proveniente de la oxidación de sustratos o de la absorción de luz se conserva de manera aprovechable principalmente en forma de ATP (1, 2).

Casi todas las enzimas responsables de la síntesis del ATP se encuentran asociadas a algún tipo de membrana, como son la membrana plasmática de bacterias y cianofitas, la membrana interna de la mitocondria y la membrana tilacoidal de cloroplastos. Estas enzimas llamadas ATP sintetasas están acopladas a la serie de enzimas de la cadena respiratoria que catalizan la transferencia de electrones provenientes de diferentes sustratos hasta distintos aceptores como el oxígeno (1, 2).

De acuerdo con la hipótesis quimiosmótica de Mitchell (Mitchell, 1961), la energía liberada por la cadena respiratoria se transforma y almacena como un potencial electroquímico de protones, Δp_H^+ , que la ATP sintetasa utiliza para formar ATP. La oxidación de moléculas orgánicas provoca un flujo de electrones acompañado por un movimiento unidireccional de H^+ a través de la membrana. Como resultado se genera un gradiente de pH

(ΔpH) y de potencial eléctrico ($\Delta\psi$) a través de ella. El flujo de los H^+ en el sentido opuesto al inicial genera la energía necesaria para la síntesis del ATP catalizada por el complejo ATPasa (1-4).

ESTRUCTURA DE LA ATP SINTETASA

La ATP sintetasa de bacterias, cloroplastos y mitocondrias opera fisiológicamente tanto en la producción del ATP durante la fosforilación oxidativa como en la generación de un potencial de H^+ mediante la hidrólisis del ATP (5). Está formada por dos regiones, una soluble llamada F_1 y un sector membranal, F_0 . Por esta razón se le ha llamado F_1F_0 -ATPasa

SECTOR F_1

La F_1 -ATPasa soluble puede liberarse de las membranas al tratarlas con amortiguadores de baja fuerza iónica que no contienen Mg ; al reconstituirla en las membranas originales se recupera la actividad de fosforilación oxidativa, por lo que desde 1960 se le llamó factor de acoplamiento o F_1 (6).

La F_1 se encuentra en la superficie interna de la membrana plasmática de las bacterias o en el lado de la matriz de la membrana interna de las mitocondrias. La microscopía electrónica la revela como una partícula globular de unos 95-100 Å que se proyecta de la membrana mediante un tallo (7), teniendo sus subunidades arregladas de modo hexagonal (8).

El peso molecular de la F, se ha determinado por métodos de ultracentrifugación, por filtración en gel y con geles de poliacrilamida con SDS, y todas las preparaciones estudiadas tienen un peso molecular aproximado de 360, 000 (9).

Esta formada por 5 clases de subunidades, α , β , γ , δ y ϵ cuyos pesos moleculares están alrededor de 55 000, 50 000, 31 000, 19 600 y 15 000, respectivamente (10). Aunque algunos estudios sugieren una estequiometría de $\alpha_2\beta_2\gamma\delta\epsilon$ (11) la mayoría favorecen la proporción $\alpha_1\beta_1\gamma\delta\epsilon$. Los experimentos que se basan en marcajes *in vivo* con ^{14}C , creciendo células de E. coli en presencia de aminoácidos marcados con ^{14}C y midiendo la distribución de la radioactividad en las subunidades de la F, purificada (11), apoyan la estequiometría $\alpha_1\beta_1\gamma\delta\epsilon$. En algunos experimentos de reconstitución de las subunidades aisladas se ha obtenido la máxima actividad de ATPasa con las cantidades equimolares $\alpha_1\beta_1\gamma\delta\epsilon$ (12), pero otros experimentos de reconstitución han indicado que la estequiometría es $\alpha_1\beta_1\gamma\delta\epsilon$ (13, 14). El análisis de grupos sulfhidrilo apoya la relación $\alpha_1\beta_1\gamma\delta\epsilon$, ya que se obtienen 3 grupos -SH para un peso molecular de 380 000 en la F, de la bacteria termofilica PS, y se sabe que la subunidad α es la única que contiene cisteína (15). Utilizando la modificación química covalente con DCCD o con ^{14}C -DCCD que se une específicamente a una subunidad β , Satre et al. (99) también han concluido que la estequiometría es $\alpha_1\beta_1\gamma\delta\epsilon$. Además, debido a la homología de las secuencias del DNA de la subunidad de la F, de mitocondrias de corazón de res, la de E. coli y la de cloroplastos, se ha propuesto que todas estas enzimas tienen

la estequiometría $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$, con pesos moleculares muy similares (10).

Estudios sobre las funciones de las subunidades de la F_1

De las 5 subunidades de la F_1 , solamente α y β tienen la capacidad de unir nucleótidos (10,16), habiendo un total de 6 sitios, tanto para la F_1 de *E. coli* como para la F_1 mitocondrial (16, 17). Para la caracterización de estos sitios se han utilizado análogos químicos del ATP y el ADP, o bien, derivados fotoactivables como el 8-azido ATP o el 8-azido ADP (16, 18); la modificación localizada del sitio catalítico con inhibidores específicos de un solo aminoácido de la subunidad β , como por ejemplo, el DCCD o el NBD-Cl (19-21); y los estudios de reconstitución donde se observa que solamente los complejos que contienen β son capaces de hidrolizar el ATP (10).

Estos 6 sitios de unión para nucleótidos se han dividido en 2 clases: aquéllos que unen fuertemente ADP o ATP y por lo tanto no son catalíticos, y aquéllos que los pueden recambiar con los nucleótidos del medio, llevando a cabo la hidrólisis o la síntesis del ATP (16-18). Sin embargo, una interpretación alterna es que alguno o todos estos sitios se encuentren en las interfases de las subunidades α y β (22, 23) y que algunos de los sitios que unen fuertemente a los nucleótidos puedan ser catalíticos (23, 24).

Por otra parte se sabe que cuando α o β aisladas unen nucleótidos sufren cambios conformacionales que afectan a todo el sector F_1 , y que pueden detectarse por cambios en su coeficiente

de sedimentación (25), por modificaciones en su patrón de digestión con tripsina (26), o por alteraciones en la fluorescencia de compuestos como el 8-anilinoftaleno-1-sulfonato (27) o la aurovertina (28, 29).

La información que se tiene sobre las posibles funciones del resto de las subunidades de F_1 , proviene principalmente de experimentos de reconstitución de la F_1 de E. coli o de otras bacterias que se desagregan con sales caotrópicas, o bien, de estudios con mutantes genéticas carentes de alguna subunidad (10).

La subunidad γ se requiere para el ensamblaje del complejo ATPasa junto con α y β (13); este complejo $\alpha\beta\gamma$ puede reestablecer la fosforilación oxidativa en membranas carentes de F_1 (30). Se ha dicho que es la subunidad organizadora del complejo y que puede comportarse como puerta para los H^+ que provienen de F_0 (31).

Solamente el complejo $\alpha\beta\gamma\delta\varepsilon$ puede unirse a las membranas carentes de F_1 , por lo que se ha sugerido que δ y ε constituyen el contacto entre $\alpha\beta\gamma$ y el sector F_0 y pueden tener influencia en la transferencia de energía entre F_0 y F_1 (13, 32, 33). Además, en el caso de E. coli y de cloroplastos, la subunidad ε es un potente inhibidor de la actividad ATPasa de la F_1 , purificada (34, 35), propiedad que se tratará más adelante.

SECTOR F_0

La porción F_0 , o sector membranal facilita la translocación

pasiva de protones a través de la membrana y es responsable de la actividad ATPasa acoplada a procesos energéticos, lo que se ha podido comprobar por estudios de reconstitución del complejo F_1F_0 -ATPasa en liposomas (36,37).

La porción F_0 de E. coli posee 3 subunidades, a, b y c cuyos pesos moleculares son 24 000, 19 000 y 8 500 respectivamente (10) con una estequiometría de $a_1b_2c_1$, sugerida por estudios de incorporación de ^{14}C -glucosa y ^{35}S -sulfato (38). Para la F_0 mitocondrial la estequiometría sugerida es de $a_1b_2c_1$ debido principalmente a marcaje con ^{14}C -DCCD (ver más adelante) (39). La forma dimérica de b ha sido indicada por experimentos con entrecruzadores (40).

La actividad de ATPasa del complejo F_1F_0 y la permeabilidad a H^+ de membranas carentes de F_1 pueden ser inhibidas con el DCCD que reacciona irreversible y específicamente con un residuo de aminoácido de la subunidad c (41). A esta subunidad que une DCCD también se le conoce como proteolípido, debido a su solubilidad en cloroformo/metanol, aunque no contiene lípidos unidos covalentemente. Si el proteolípido aislado se incorpora en liposomas, éstos adquieren la propiedad de conducir H^+ y dicha conducción se puede inhibir con DCCD (42-45).

Los estudios sobre la conformación del proteolípido dentro de la membrana se han logrado utilizando el dicroísmo circular y han revelado que, en el caso de E. coli, contiene un 75% de helices y un 20% de β -plegada (46); en Neurospora crassa no se detectó β -plegada (47).

OTRAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO F_1F_0 -ATPasa

Existe otra serie de subunidades que constituyen a esta compleja enzima y cuya localización se encuentra entre el sector catalítico y el sector membranal; por esta razón se les conoce como factores del cuello o de acoplamiento.

En 1968 Mc Lennan y Tzagoloff purificaron de la mitocondria una subunidad que tenia la propiedad de hacer sensible al complejo F_1F_0 al antibiótico oligomicina, por lo que se le conoce con el nombre de proteína que confiere la sensibilidad a la oligomicina, o bien, OSCP; aparentemente constituye uno de los péptidos que unen F_1 con F_0 (48,49).

Utilizando ^{14}C -OSCP o el derivado fotoactivable azido-OSCP, se ha concluido que en la F_1 existe un sitio de alta afinidad para OSCP y que ésta interactúa tanto con la subunidad α como con la β (50,51), pero, al parecer, en el complejo F_1F_0 solamente está en contacto con la subunidad β y se une débilmente al sector F_0 . Probablemente su función es asegurar la unión F_1 - F_0 (52).

El factor 6 o F_6 también interviene en la unión de la F_1 con el canal F_0 y tiene la propiedad de reestablecer las reacciones acopladas a energía en complejos membranales tratados con silicotungstato o tripsinizados (53, 54).

Otro componente que estimula reacciones acopladas a energía, como el recambio $^{32}P_i$ -ATP, es el factor B o F_B ; es uno de los componentes mitocondriales que contienen grupos tiol esenciales para la fosforilación oxidativa, ya que, al parecer, se

requiere para la transferencia de energía desde y hacia la F_1 -ATPasa (55, 56).

Proteína inhibidora (I_F)

En 1963, Pullman y Monroy descubrieron que en la mitocondria existe una proteína que inhibe la actividad ATPasa de la F_1 (57). Es una proteína ácida, estable al calor, con un peso molecular aproximado de 10 500 (58).

Además de la hidrólisis inhibe otras reacciones dependientes de ATP, como la reducción de NAD^+ y la transhidrogenasa dependiente de ATP (59) y, en menor grado, también inhibe la reacción de recambio $^{32}P_i$ -ATP (60, 61). Por su intervención en todas estas reacciones se ha sugerido que esta proteína es uno de los principales factores reguladores del complejo ATP sintetasa/ATPasa.

Utilizando inhibidor marcado radioactivamente, o bien, con derivados fotoactivables, se ha detectado un sitio de unión de alta afinidad en la F_1 que, además, coincide con ser el sitio de inhibición (62, 63). La proteína inhibidora se une exclusivamente a la subunidad β con una estequiometría cercana a 1 (64, 65), por lo que el sitio de alta afinidad debe encontrarse en o muy cercano a una de las 3 subunidades β . Además, como se comporta como un inhibidor no competitivo se piensa que no se une a la subunidad β catalítica sino, probablemente, a una hipotética reguladora (66).

Como la subunidad ϵ de bacterias y cloroplastos tiene la

capacidad de inhibir a la F_1 -ATPasa se ha sugerido que puede tener un papel similar al inhibidor mitocondrial, ya que si estas enzimas, con actividad latente, se tratan con calor o se tripsinizan (procedimientos que inactivan a ϵ), aumentan su actividad de ATPasa (68-70, 34, 35). Sin embargo, a diferencia del inhibidor mitocondrial, ϵ es una subunidad endógena y, como ya se ha mencionado, estando aislada puede inhibir la actividad de ATPasa, aunque este fenómeno es independiente de la presencia o la ausencia de la subunidad ϵ en la F_1 . Por esta razón, el equiparar al inhibidor natural de la F_1 mitocondrial con la subunidad ϵ de bacterias todavía es tema de discusión.

EL USO DE LOS DETERGENTES EN EL ESTUDIO DEL COMPLEJO F_1F_0 -ATPasa

Los detergentes no solamente se han utilizado para extraer y purificar al complejo F_1F_0 -ATPasa sino que también han sido una herramienta para ayudar a comprender su estructura y la posible regulación de sus reacciones catalíticas, gracias a los trabajos que se basan en el estudio de las interacciones entre diferentes detergentes con la proteína.

En general, se sabe que muchas proteínas con cierto grado de hidrofobicidad poseen sitios de unión de alta afinidad que se saturan con concentraciones bajas de algún detergente. Al aumentar la concentración, la unión del detergente a la proteína empieza a ser cooperativa y es acompañada por cambios conformacionales de la proteína. Estos cambios conformacionales pueden provocar la exposición de grupos hidrofóbicos que estaban "escon-

cidos" cuando la proteína se encontraba en un medio completamente acuoso (71).

En esta sección se revisarán algunos resultados de trabajos relacionados con la interacción de distintos detergentes con el sector F_1 , tanto soluble como membranal, de diferentes sistemas: bacterias, cloroplastos y mitocondrias.

El factor de acoplamiento F_1 de cloroplastos (CF_1) es una Ca^{2+} -ATPasa de actividad latente. Su actividad puede aumentar si se le dan tratamientos con calor (72), con ditiotreitol (73), con proteasas (74), con solventes orgánicos (75-77) o con detergentes (78, 80). Una vez activada, CF_1 hidroliza ATP en presencia de Mg^{2+} pero no en presencia de Ca^{2+} . El detergente neutro octilglucósido puede aumentar la actividad Mg -ATPasa o Ca -ATPasa de CF_1 , dependiendo de las condiciones de incubación (78). Por arriba de su CMC (15 mM) activa a la Mg -ATPasa y si se diluye por abajo de su CMC activa a la Ca -ATPasa. Esto sugiere que el detergente puede modificar reversiblemente las propiedades catalíticas de CF_1 , sugerencia apoyada, además, por estudios cinéticos en los que se observa que en la CF_1 activada con octilglucósido disminuye el efecto inhibitor del Mg^{2+} libre (78).

Utilizando el detergente Lauril-dimetilamino-óxido (LDAO), Montero-Lomelí y Dreyfus (79) también observaron que el detergente cambia los requerimientos de cationes de la H^+ -ATPasa, en este caso, de Rhodospirillum rubrum. Mientras la enzima está en solución se comporta preferentemente como una Ca -ATPasa, pero en presencia del detergente mejora su actividad de Mg -ATPasa.

Según los trabajos de Yu y Mac Carty (80) uno de los pasos

clave de estas activaciones es la remoción de la subunidad ϵ cuando CF_1 se pone en contacto con alquilglucósidos, aunque para la expresión de la actividad Mg-ATPasa es necesaria la presencia del detergente. Si la cadena hidrocarbonada del detergente es de 9 o 10 carbonos se remueve también la subunidad δ de CF_1 . Lötscher y colaboradores (81) observaron que la F_1 de E. coli, ECF_1 o ECF_1F_0 , también aumenta su actividad hidrolítica en presencia del detergente LDAO. El LDAO en una concentración activadora libera a ECF_1 de F_0 como una enzima de 4 subunidades, α , β , γ y ϵ . Sin embargo, la actividad de la ECF_1 aislada es prácticamente la misma que la de ECF_1F_0 , lo que indica, según los autores, que no es solo la separación de ECF_1 de F_0 y la pérdida de δ lo que incrementa la actividad de ATPasa. Ellos sugieren que debe haber un rearrreglo estructural de ECF_1 , basando su hipótesis en los experimentos donde se observa una disminución del entrecruzamiento entre β y ϵ cuando está presente el detergente.

De modo similar, Norling (82), Andreu y Muñoz(83) y Molli-
nedeo y colaboradores (84) también han sugerido que el efecto de los detergentes sobre la F_1 puede deberse a cambios en las interacciones hidrofóbicas de la molécula de enzima. Norling (85) mostró que los detergentes colato y desoxicolato pueden activar a la F_1 -ATPasa (TF_1) de la bacteria termofilica PS_2 , que tiene la particularidad de no alcanzar su actividad máxima sino hasta los $75^\circ C$. Estos detergentes aniónicos, a $30^\circ C$, pueden activar a la TF_1 -ATPasa hasta actividades similares a las que posee estando a $75^\circ C$; se propone que estos detergentes inducen una conformación en la enzima que le permiten alcanzar estas actividades hidrolí-

ticas.

Por su parte, Andreu y Nuñez (83) y Mollinedo et al. (84) han mostrado que las subunidades α y β aisladas o la F_1 -ATPasa completa de Micrococcus lysodeikticus interaccionan con detergentes marcados radioactivamente, como el desoxicolato o el octilglucósido, lo que sugiere, como se mencionó antes, que esta enzima contiene dominios hidrofóbicos que se hacen evidentes con la presencia del detergente.

En el presente trabajo (86) se estudia el efecto del LDAO sobre la actividad de ATPasa de la F_1 mitocondrial, tanto en solución como incluida en membrana. Los resultados muestran que los efectos del detergente sobre la hidrólisis en los diferentes sistemas son dependientes del contenido de inhibidor natural en las preparaciones y de la presencia del canal F_0 y que, además, el detergente puede modificar ciertas características catalíticas de la enzima.

Parte de la información de los reportes anteriores y de este trabajo se encuentra resumida en la tabla 1.

TABLA 1.
 EFECTO DE DETERGENTES SOBRE LA F_1 DE DIFERENTES SISTEMAS.

Detergente	Sistema	CMC (mM)	Concentración (mM)	Efecto	Refs.
OG	CF_1	15	30	- Activa Hg -ATPasa - disminuye inhibición por Hg^{2+}	79
AG (7,8 C)	CF_1	85,23	90,23	- activa Ca -ATPasa - remueve ϵ	80
AG (9,10 C)	CF_1	7.5, 2.2	8, 2	- activa Ca -ATPasa - Remueve δ - Se expresa Hg -ATPasa	80
OG		15			
Co	CF_1	13-15	60	- remueven δ y ϵ	80
DCo		4-6			
Co	TF_1	13-15	14	- activa TF_1 -ATPasa - pierde estabilidad al frío	82
		4-6	3.8		
OG	CF_1 preactivada con calor	15	10	- activa Hg -ATPasa	85
DCo	F_1	4-6	6	- libera ϵ	86
OG	<i>M. lysodeikticus</i>	15	6	- inhibe Ca -ATPasa	
LDAO	ECF_1F_0	0.125	25	- activa ATPasa - separa F_1 de F_0 - libera δ - reorganiza β - ϵ	81
LDAO	F_0F_1 <i>Rs. rubrus</i>	"	60	- activa Hg -ATPasa - mejora efecto de Hg^{2+} - mejora V_0 de Cotillisis de un sitio	79
LDAO	F_1		1-10	No hay efecto	
	F_1 - IF_1	"	1-3	activa ATPasa	86
	F_1 - F_0				
	F_1 - IF_1		5-10	inhibe ATPasa	
	F_1 - F_0				

OG = octilglucósido

AG (7,8 C) = alquilglucósidos de cadena corta

AG (9,10 C) = alquilglucósidos de cadena mediana

Co = colate

DCo = desoxicolate

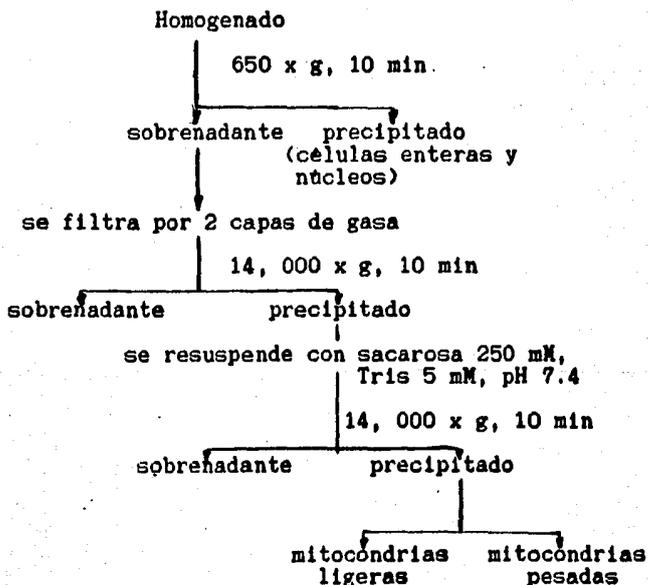
LDAO = lauril dimetilamino óxido

MATERIALES Y METODOS

1. PREPARACIONES BIOLÓGICAS

a) Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias se aislaron por el método de Löw y Vallin (87). Se parte de corazones de res frescos, mantenidos a 4°C. Se elimina la grasa y el tejido conjuntivo y una vez molidos se suspenden en sacarosa 250 mM, EDTA 15 mM, Tris 5 mM, pH 7.4 en una cantidad aproximada de 200 g de carne por cada litro de buffer. La suspensión se homogeneiza en una licuadora industrial durante 1 min, manteniéndose el pH de 7.4 con adiciones de una solución saturada de Tris. Las etapas de centrifugación se pueden resumir con el siguiente esquema:



Las fracciones de mitocondrias ligeras y pesadas se separan por decantación. Se resuspenden con sacarosa 250 mM, Tris 5 mM, pH 7.4. Se almacenan a -70°C hasta su uso.

b) Preparación de partículas submitocondriales

- Partículas submitocondriales de Mg-ATP

Se prepararon según el método de Lee y Ernster (88).

Las mitocondrias pesadas se diluyen a una concentración de proteína de 20 mg/ml con sacarosa 250 mM, ATP 1 mM, MgCl₂ 15 mM. Se sonicán en fracciones de 20 ml durante 4 períodos de 45 s con 2 Amp en un sonicador MSE 30542. El vaso con las fracciones se mantiene durante el tratamiento en un baño de agua y hielo. Las mitocondrias así tratadas se centrifugan a 4°C durante 15 min a 15, 000 x g. El sobrenadante se vuelve a centrifugar, esta vez durante 60 min a 100, 000 x g. El precipitado, que contiene las partículas submitocondriales, se homogeneiza con sacarosa 250 mM, Tris 5 mM, pH 7.4.

La principal característica de estas partículas es que tienen una actividad hidrolítica aproximada de 0.5 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ debido a su alto contenido de proteína inhibidora.

- Partículas submitocondriales de Klein

Para preparar estas partículas, cuya característica es su bajo contenido de proteína inhibidora endógena (actividad hidrolítica aproximada de 6 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) se siguió el método de Klein et al. (89).

Las mitocondrias se diluyen a 20 mg/ml con un medio que contiene KCl 250 mM, sacarosa 75 mM, EDTA 2 mM, Tris-SO₄ 30 mM, pH 8.0. Se sonicán del mismo modo que las partículas de Mg-ATP. Las mitocondrias sonicadas se centrifugan a 15, 000 x g a 4°C durante 15 min. El sobrenadante se incuba a 30°C durante 1 h y posteriormente se centrifuga durante 45 min a 100, 000 x g. El sobrenadante de esta segunda centrifugación se guarda a -70°C y se utiliza para la purificación de la proteína inhibidora (ver más adelante); el precipitado se resuspende con sacarosa 250 mM, Tris-Cl 5 mM, pH 7.4.

- Partículas submitocondriales de EDTA (90)

Se disuelven las mitocondrias a una concentración de 20 mg/ml de proteína en un medio de sacarosa 250 mM, EDTA 2 mM. El pH se ajusta hasta 8.7 con adiciones de una solución saturada de Tris. Se sonica de la misma forma anteriormente indicada. Se centrifuga a 4°C durante 15 min a 15, 000 x g. El sobrenadante se centrifuga a 4°C durante 45 min a 100, 000 x g. Este segundo sobrenadante se descarta y el precipitado se resuspende con un pequeño volumen de sacarosa 250 mM. Se ajusta la concentración de proteína a 10 mg/ml; esta solución se vuelve a sonicar por un periodo de 50 s en un baño con agua. Todos los pasos siguientes se realizan a 25°C. La solución de partículas sonicadas se centrifuga nuevamente a 100, 000 x g durante 45 min y el precipitado se resuspende con un volumen pequeño de sacarosa 100 mM.

Estas partículas submitocondriales son las que se utilizan para la purificación de F₁, como se describe a continuación.

c) Purificación de la F₁ mitocondrial

Esta proteína se purificó según los métodos reportados en las referencias 90 y 91 con algunas modificaciones.

Las partículas submitocondriales de EDTA, resuspendidas en sacarosa 100 mM, se llevan a una concentración de 30 mg/ml con un medio que contiene sacarosa 250 mM, ATP 4 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4. El pH de esta suspensión se ajusta a 9.2 agregando NH₄OH 1 N y se deja incubando durante 12-15 h a 25°C. Después de esta incubación se reajusta el pH a 9.2. Las partículas así tratadas se sonicán durante 10 min, cuidando que la temperatura no sobrepase los 40°C. Se centrifuga durante 45 min a 100, 000 x g y el pH del sobrenadante se lleva a 5.4 con ácido acético 3 N. Inmediatamente después se centrifuga 5 min a 15, 000 x g y el pH del sobrenadante se ajusta rápidamente a 8.0 utilizando una solución saturada de Tris.

Este sobrenadante, donde se encuentra la F₁, se pasa por una columna de sefarosa hexilamónio (3 x 1 cm), previamente equilibrada con medio de ATP que contiene sacarosa 100 mM, ATP 4 mM, EDTA 2 mM, pH 8.0 (91). La columna se lava con 60 ml del medio de ATP y posteriormente la proteína retenida se eluye adicionando KCl 1 M al medio de ATP.

Las fracciones con actividad de ATPasa (ver sección de Técnicas) se precipitan al 50% con una solución saturada de sulfato de amonio. Después de incubar 30 min a 4°C se centrifugan durante 15 min a 15 000 x g. Finalmente, la proteína precipitada se resuspende con el medio de ATP y se agrega 1 volumen de

solución saturada de sulfato de amonio, dejando una concentración aproximada de proteína de 5-7 mg/ml. Se almacena a 8°C.

F₁ con inhibidor endógeno.- El complejo F₁-IF₁ preparado según el método reportado en la ref. 114, fue donado amablemente por Rebeca Jaloma del laboratorio del Dr. Gómez-Puyou.

d) Preparación del inhibidor natural de la ATPasa

Se siguió el método de Horstman y Racker (92) modificado por Klein et al. (89). Los pasos de purificación son:

1. Se inicia con los sobrenadantes provenientes de la preparación de las partículas de Klein. A cada 100 ml de estos sobrenadantes se les agregan 29 g de sulfato de amonio, agitando lentamente durante 25 min y manteniendo la temperatura a 4°C.
2. Se centrifuga durante 10 min a 15, 000 x g. A cada 100 ml del sobrenadante de esta centrifugación se le agregan 19.4 g de sulfato de amonio y se agita y centrifuga como se describió en el paso anterior.
3. El precipitado se resuspende con 7 ml de sacarosa 250 mM por cada gramo de proteína mitocondrial inicial.
4. Una vez resuspendido y manteniendo la temperatura a 4°C se precipita con ácido tricloroacético al 50% (6 ml de ácido por cada 70 ml de la solución anterior), e inmediatamente después se centrifuga durante 5 min a 15 000 x g.
5. El precipitado se homogeneiza agregando 5 ml de agua bidestilada por cada 7 ml de la solución del paso número 3.
6. Se ajusta el pH a 5.0 haciendo adiciones de una solución 1

1 M de KOH y se centrifuga 5 min a 15 000 x g.

7. El pH del sobrenadante se ajusta a 7.4, adicionando nuevamente de la solución de KOH 1 M. Se agrega sacarosa suficiente para obtener una concentración de 250 mM.

8. Se agrega sulfato de amonio a una concentración de 0.83 M, ajustando la conductividad de la solución.

9. Se agita en baño de hielo y se precipita con etanol al 95%, agregando 1.7 ml de alcohol por cada mililitro de solución. Se centrifuga 5 min a 15, 000 x g y el precipitado se homogeneiza con sacarosa 250 mM, Tris-SO₄ 10 mM, pH 7.4 (0.4 ml por cada gramo de mitocondria inicial). El etanol se evapora a temperatura ambiente con una bomba de vacío.

10. La solución resultante se calienta en baño María hasta 85°C durante 3 min, agitando constantemente. Una vez enfriada, se centrifuga durante 20 min a 100 000 x g.

11. El sobrenadante se dializa contra Tris-Cl 5 mM, pH 7.4; se liofiliza y se almacena a -70°C.

e) Preparación del complejo F₁F₀ en extractos de Tritón X-100 (86).

Estos extractos se preparan partiendo de partículas de Mg-ATP, o bien, de partículas de Klein. Las partículas submitocondriales se llevan a una concentración de 3 mg/ml con sacarosa 150 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4. La extracción se hace a temperatura ambiente agregando un volumen de una solución de Tritón X-100 al 0.8%. La mezcla se centrifuga inmediatamente durante 30 min a 100 000 x g; el sobrenadante es la fracción que se utiliza para

los experimentos que se describen en Resultados.

2. TECNICAS UTILIZADAS

Cuantificación de proteínas

a) Método del biuret

Se siguió el método descrito en la ref. 93 para cuantificar la proteína de las mitocondrias y de las partículas submitocondriales.

A una fracción que contenga de 1 a 2 mg de proteínas se le agregan 0.2 ml de desoxicolato de sodio al 1%, 0.8 ml de agua y 2.0 ml de una solución que contiene colato de sodio al 4%, NaOH al 10% y CuSO_4 al 1%. Después de agitar e incubar durante 15 min se lee en el espectrofotómetro a 540 nm contra un tubo "blanco" sin proteínas. Para la curva estándar se utiliza una solución de albúmina de bovino, en la cual 1 mg de albúmina produce una absorbancia de 0.085.

b) Método del azul de Coomassie

El método de Bradford (94) se utilizó para cuantificar las proteínas del material soluble y es válido hasta para 10 μg de muestra.

La solución colorante se prepara agregando 100 mg de azul de Coomassie a 50 ml de etanol al 95%; se mezcla con 100 ml de ácido fosfórico al 85% y se lleva a 1 l con agua. Se filtra y se

conserva a 20°C en un frasco ámbar.

Dos mililitros de esta solución se adicionan a la muestra de proteína y después de 2 min se lee en el espectrofotómetro a 595 nm. Para la curva estándar se utiliza albúmina de bovino. Para las muestras que contienen detergentes se agrega la concentración correspondiente en los tubos de la curva estándar, para así evitar posibles interferencias.

Preparación de γ - 32 P-ATP

Se utiliza 32 P proporcionado por New England Nuclear para sintetizar γ - 32 P-ATP según el método de Glynn y Chappell (95). Cinco μ Ci de 32 P se dejan reaccionar durante 60 min a 26°C con la siguiente mezcla de reacción: Tris-Cl 50 mM, pH 8.1, MgCl₂ 6 mM, cisteína 2 mM, 3-fosfoglicerato 1 mM, ATP 5 mM, NADH 0.4 mM, EGTA-K 1 mM, 0.1 ml de β -mercaptoetanol, 200 μ g de gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y 140 μ g de 3-P-gliceratocinasa. Una vez incubado se añaden 50 ml de etanol y se agregan otros 10 ml de etanol al 17% al tubo de reacción. Se evapora el alcohol con una temperatura máxima de 40°C y se pasa por una columna de 3.5 x 0.5 cm que contiene 1 g de resina AG 1x8 (Bio-Rad). Se carga la columna después de filtrar el líquido a través de papel Whatman 1, lavándolo con 10 ml de agua. Para eliminar de la columna el AMP, el ADP y el P_i, se eluye con 40 ml de NH₄Cl 20 mM en HCl 0.02 N; se lava con agua para eliminar el NH₄⁺ y finalmente el γ - 32 P-ATP se suelta con HCl 0.25 N. Este volumen (de 15-17 ml) se colecta en hielo y se le ajusta el pH a 6.8 con una solución 1 M de Tris (de 3 a 3.4 ml).

Cuantificación del fosfato liberado

La actividad hidrolítica tanto de las partículas submitocondriales como de la enzima solubilizada (F₁ o extractos de Tritón) se cuantificó por el ³²P, liberado a partir de una alícuota de γ -³²P_i-ATP presente en el medio de hidrólisis. A 0.7 ml de la muestra (ver más adelante) se le adicionan 1.0 ml de agua, 0.3 ml de acetona y 1.0 ml de reactivo de molibdato (5 g de heptamolibdato de amonio, 40 ml de ácido sulfúrico 10 N y agua hasta completar 100 ml), con lo que se forma un complejo de fosfomolibdato, soluble en solventes orgánicos. Después de agitar, se agrega 1 ml de acetato de butilo y se agita en un mezclador Vortex durante 2 min; se centrifuga 2 min a 1, 500 rpm para separar la fase orgánica de la fase acuosa. Se coloca una muestra de 0.4 ml de la fase orgánica en un papel filtro (2.5 x 8.0 cm) que, una vez seco, se cuenta en viales que contienen la mezcla de centelleo de Bray (5.5 g de PPO, 0.125 g de POPOP y tolueno para completar 1 l). Este método está reportado en la ref. 96.

La presencia de detergentes en las muestras, en las concentraciones utilizadas, no modifica la partición del ³²P_i ni del γ -³²P_i-ATP en la fase orgánica.

Determinación del efecto del LDAO sobre la actividad de ATPasa de las diferentes preparaciones

El efecto del LDAO se prueba adicionando a 0.3 ml de la

enzima distintas cantidades de una solución 1 M o 0.1 M del detergente. Después de incubar 5 min se añaden 0.3 ml de una mezcla de reacción que contiene, en concentraciones finales, Tris-acetato 50 mM, pH 7.8, MgCl₂ 3 mM, ATP 2 mM, fosfoenolpiruvato 5 mM y 150 µg de piruvato cinasa, además de un volumen de γ -³²P-ATP que contenga 2 x 10⁶ cpm. La incubación con el medio de reacción es de 3 min a 30°C. La reacción se detiene con la adición de 0.2 ml de ácido tricloroacético al 30% a 4°C. Las muestras se centrifugan durante 10 min y este sobrenadante es el que se utiliza para determinar el γ -³²P-ATP hidrolizado, como se describió anteriormente.

En la sección de "Resultados" se muestra un experimento representativo de por lo menos 4 de cada uno.

Determinación de la actividad inhibidora de IF₁ (4)

La inhibición de la actividad de ATPasa por el IF₁ se determina incubando a 30°C, 30 µg de partículas submitocondriales de Klein, 7 µg de extracto de Tritón de partículas de Klein o 1 µg de F₁-ATPasa con 0.5 µg de IF₁, en 0.3 ml de medio de inhibición. Este medio contiene sacarosa 250 mM, MOPS 2 mM, pH 6.3, Tris-SO₄ 10 mM, pH 6.7, MgCl₂ 1 mM y Na-ATP 0.8 mM, pH 6.0; el pH final de la solución debe ser de 6.5. Después de 10 min de incubación se cuantifica la actividad de ATPasa como ya se ha descrito.

RESULTADOS

La actividad de ATPasa de la F₁ se modifica de diferente manera con la presencia del LDAO, dependiendo de si se encuentra o no asociada a la proteína inhibidora y/o al sector F₀. Se probó el efecto de este detergente sobre la actividad hidrolítica de partículas submitocondriales, de extractos de Tritón X-100 y de la F₁ en solución.

Efecto del LDAO sobre la actividad hidrolítica de partículas submitocondriales.

Al agregar a las partículas de Mg-ATP y de Klein cantidades crecientes de LDAO existe una pequeña inhibición con concentraciones menores a 5 mM, pero la actividad hidrolítica empieza a incrementarse desde 10 hasta 50 mM de LDAO, para posteriormente disminuir (fig. 1). En el caso de las partículas de Mg-ATP (fig. 1A) la activación máxima es de 3 veces con 50 mM de LDAO, regresando después, con LDAO 100 mM, a una actividad de ATPasa similar a la inicial ($0.4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). En contraste, las partículas de Klein (fig 1B) presentan, en las concentraciones bajas de detergente, una inhibición de la actividad más marcada que la observada en las partículas de Mg-ATP y, aunque existe un incremento de la actividad, el nivel máximo en 50 mM de LDAO no llega a sobrepasar la actividad en ausencia del detergente; posteriormente la actividad disminuye.

El distinto comportamiento de ambos tipos de partículas ante las diferentes concentraciones de detergente y el hecho de

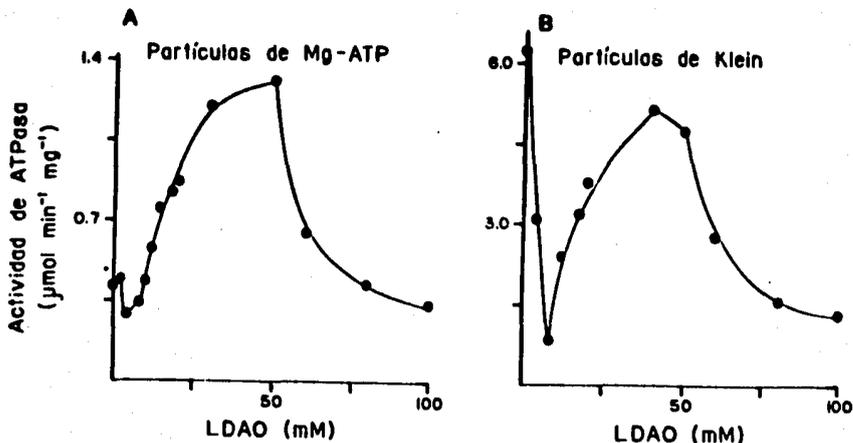


Fig. 1 Efecto del LDAO sobre la hidrólisis de partículas de Mg-ATP y de Klein. Se preincubaron partículas submitocondriales (200 μg/ensayo) con cantidades crecientes de LDAO en 0.3 ml de sacarosa 250 mM, Tris-Cl 5mM, pH 7.4 y FCCP 1 μM, durante 5 min. La reacción de hidrólisis de ATP se inició al agregar 0.3 ml del medio de reacción (descrito en "Materiales y Métodos"). A, partículas de Mg-ATP; B, partículas de Klein.

que la diferencia principal entre las partículas de Mg-ATP y las de Klein sea su alto y bajo contenido de proteína inhibidora endógena, respectivamente, sugiere que un efecto del LDAO sobre la actividad hidrolítica de la enzima podría estar relacionado con la presencia del inhibidor. Sin embargo, además de este efecto, podría existir otro diferente ya que el LDAO también afecta la actividad de ATPasa de las partículas de Klein. Por esta razón, los resultados que se presentan a continuación están divididos en los efectos del LDAO sobre las preparaciones con inhibidor y los efectos del LDAO que no están relacionados con esta proteína.

Liberación de la acción de la proteína inhibidora

- Propiedades de los extractos de Tritón X-100 de partículas submitocondriales

Para probar que el LDAO no solamente afecta la actividad de la enzima incluida en la membrana, se prepararon extractos de Tritón X-100 tanto de partículas de Mg-ATP como de Klein. La enzima solubilizada con el Tritón posee tanto el sector F_1 como la porción F_0 , ya que la actividad hidrolítica es sensible a la oligomicina, como puede observarse en los datos de la Tabla 2.

Por otra parte, la actividad del extracto proveniente de las partículas de Mg-ATP es más bajo en comparación con la actividad de la proteína solubilizada de las partículas de Klein, lo cual correlaciona con las actividades de las preparaciones originales. Como el extracto de Tritón de las partículas de Mg-ATP tiene una actividad hidrolítica baja, se puede sugerir que este complejo F_1F_0 está todavía asociado con el inhibidor endógeno.

- Actividad de ATPasa de las preparaciones asociadas con el inhibidor en presencia del LDAO.

En la figura 2 puede observarse que el LDAO es capaz de aumentar 9 veces la actividad hidrolítica del extracto de Tritón de las partículas de Mg-ATP. Con concentraciones más altas de LDAO la actividad disminuye gradualmente hasta llegar a valores similares a los iniciales.

Por otro lado, la cantidad de LDAO requerida para activar la hidrólisis es menor que en el caso de las partículas, ya que la cantidad de proteína utilizada es también mas

TABLA 2

Solubilización con Tritón X-100 de Partículas Submitocondriales
Sensibilidad a Oligomicina.

Partículas	Actividad Específica ^a				Proteína Solubilizada (%)	
	Mg-ATP	+ Oligo- micina ^b	Klein	+ Oligo- micina ^b	Mg-ATP	Klein
Preparación inicial	0.42	0.0	4.4	0.0		
Extracto de Tritón	1.48	0.5	8.5	2.0	46	56

a Expresada como μmol de ATP hidrolizado $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína.

b Se hicieron preincubaciones con 5 μg de oligomicina durante 15 min a 0°C en un volumen de 0.3 ml.

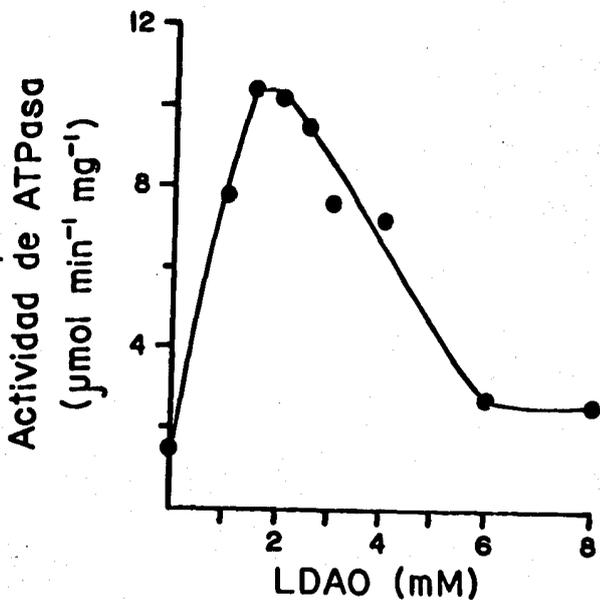


Fig. 2 Efecto del LDAO sobre la hidrólisis de un extracto de---
Triten de partículas de Mg-ATP Se preincubaron con ---
 LDAO muestras del extracto (preparado como se describió
 en "Materiales y Métodos") con un volumen de 0.3 ml que
 contenía 7 µg de proteína. El medio de incubación es
 igual que el descrito en el pie de la fig. 1 pero sin
 FCCP. Se agregaron 0.3 ml del medio de reacción para
 iniciar la hidrólisis.

baja. Al disminuir a 7 μg de proteína la cantidad de partículas submitocondriales, se utilizan concentraciones de detergente entre 0 y 5 mM para obtener las curvas de actividad hidrolítica correspondientes (resultados no mostrados).

Al reconstituir con inhibidor exógeno tanto partículas de Klein como extractos de Tritón de estas mismas se obtiene una activación de la hidrólisis debida a la presencia del LDAO (fig. 3). En el caso de las partículas reconstituidas (fig. 3A) existe una inhibición con concentraciones de LDAO menores a 1 mM. Al aumentar la concentración del detergente a 2-3 mM, la hidrólisis se activa unas 4 veces, activación parecida a la de las partículas de Mg-ATP. Sin embargo, debe notarse que las actividades hidrolíticas máximas alcanzadas con LDAO por los sistemas reconstituidos (1.1 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para las partículas y 2.0 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para el extracto de Tritón) no llegan a los valores de las actividades óptimas de las partículas de Mg-ATP o del extracto de las mismas en presencia de LDAO (1.4 y 10 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectivamente). Esto podría indicar que las interacciones del inhibidor endógeno y el exógeno con la F_1 ATPasa podrían tener diferencias importantes.

En la figura 4 se muestra que las concentraciones menores a 1 mM de LDAO pueden disminuir ligeramente la actividad de ATPasa de una F_1 asociada con inhibidor endógeno (fig. 4A) previamente incubada con inhibidor exógeno (fig. 4b), pero concentraciones cercanas a 1 mM de LDAO aumentan la actividad de las mismas; posteriormente la actividad vuelve a disminuir con concentraciones más alta del detergente. De modo similar a los casos de las partículas y los extractos de Tritón, la F_1 con

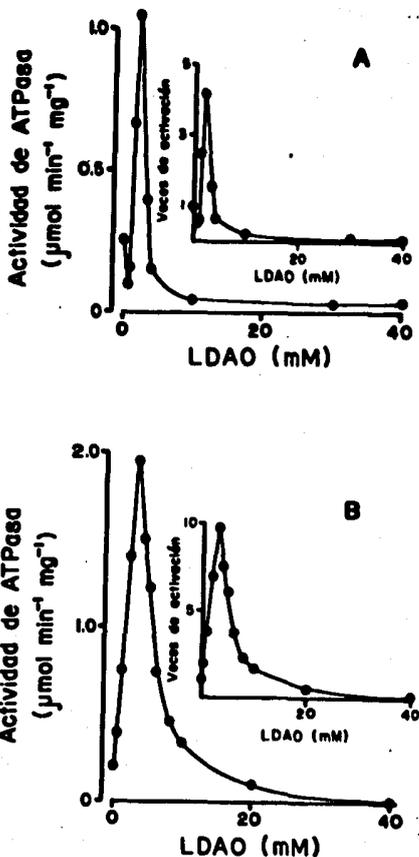


Fig. 3 Efecto del LDAO sobre la hidrólisis de partículas de Klein o de un extracto de Tritón reconstituido con IF₁. Después de incubar con IF₁ (como se indicó en "Materiales y Métodos") se agregaron las cantidades indicadas de LDAO y la reacción de hidrólisis se llevó a cabo como está descrito anteriormente. En el caso de las partículas se agregó FCCP en el medio de preincubación. A, partículas de Klein; B, extracto de Tritón de partículas de Klein.

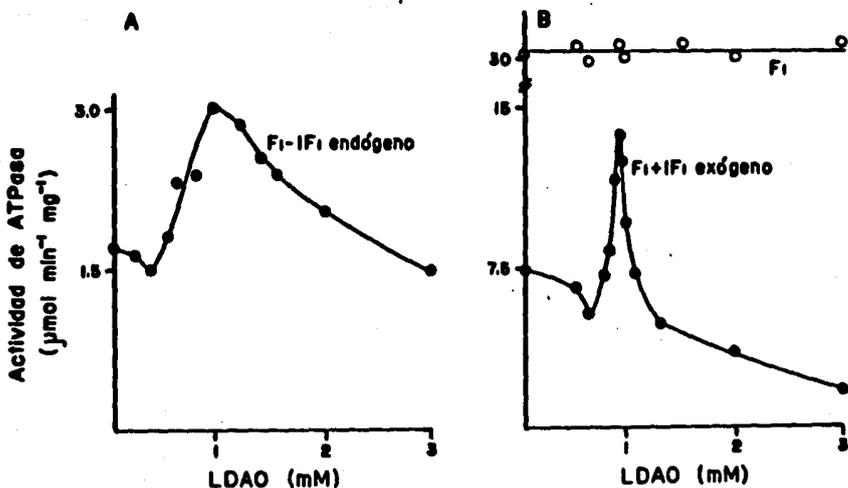


Fig. 4 Efecto del LDAO sobre la hidrólisis de la F₁ y del complejo F₁-IF₁ natural o reconstituido. Se agregaron las cantidades indicadas de LDAO a 0.3 ml del medio de preincubación que contenía 1 μg de F₁. Para el caso de la F₁ reconstituida, la incubación con IF₁ se llevó a cabo previamente, como se indicó en "Materiales y Métodos". A, F₁ con IF₁ endógeno; B, ○—○ F₁ soluble, ●—● F₁ con IF₁ reconstituido.

inhibidor endógeno y exógeno no alcanzan las mismas actividades máximas (3 y 14 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectivamente), aunque en ambos casos se observa un aumento al doble de la actividad.

Para resumir los resultados presentados hasta este momento, puede decirse que el LDAO, en distintas concentraciones, aumenta o disminuye la actividad de ATPasa de sistemas solubles (extractos sensibles a oligomicina y F_1 -ATPasa) o membranales que contienen proteína inhibidora tanto endógena como exógena.

- Reversibilidad del efecto del LDAO sobre la actividad de ATPasa de un extracto de Tritón de partículas de Mg-ATP.

Un posible mecanismo para explicar el efecto del LDAO sobre estos sistemas, podría ser la modificación de la interacción entre el inhibidor y la F_1 . Si esta modificación involucrara la liberación del inhibidor hacia el medio, probablemente el efecto de activación y el de inhibición por el detergente sería irreversible. La figura 5 muestra, por el contrario, que un extracto de Tritón de partículas de Mg-ATP preincubado con LDAO 20 mM (concentración que disminuye la actividad hidrolítica) puede no sólo reactivarse al diluir el detergente a concentraciones cercanas a 3 mM (concentración que aumenta la hidrólisis), sino volver a sus actividades iniciales cuando se llega a cantidades de LDAO menores a 1 mM.

El hecho de que los efectos del LDAO sobre la actividad hidrolítica de esta preparación sean reversibles, sugiere que la proteína inhibidora no se libera al medio con las concentraciones de LDAO activadoras de la hidrólisis (alrededor de 3 mM) sino que

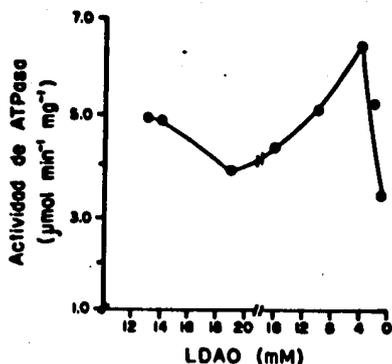


Fig. 5 Efecto de la dilucion del LDAO sobre la hidrolisis de ATP de un extracto de Triton de particulas de Ag-ATP. Se parti6 de muestras de 0.1 ml con 36 µg de proteina, que se preincubaron con LDAO (12→20 mM). Posteriormente, a un medio con sacarosa 150 mM, Tris-Cl, pH 7.4, Trit6n al 0.2 %, se adicionaron alicuotas con un volumen suficiente para diluir el LDAO a las concentraciones indicadas (16→1 mM). El volumen final fue de 0.1 ml por ensayo.

solo se modifica su unión con la enzima y que al diluir el detergente hasta concentraciones menores a 1 mM, el inhibidor puede regresar a su sitio de inhibición, por lo que se obtienen actividades hidrolíticas parecidas a las iniciales.

- Curvas de inhibición con IF₁ en extractos de Tritón de partículas de Klein. Efecto del LDAO.

Una manera por la cual el LDAO podría afectar la interacción inhibidor-F₁ sería el modificar la afinidad de la proteína inhibidora por su sitio de unión en la F₁. Para probar esta posibilidad se hicieron curvas de inhibición (fig. 6) para un extracto de Tritón de partículas de Klein en ausencia de LDAO o en presencia de LDAO 3 mM (concentración activadora de la hidrólisis) o de LDAO 7 mM (concentración que disminuye la hidrólisis). En los 3 casos las K_i se calcularon a partir de las pendientes de las rectas obtenidas de las gráficas de 1/i contra 1/1-i, con la ecuación

$$1/i = K_i + 1 - i$$

donde I es la concentración total del inhibidor, i es el grado de inhibición y K_i es la constante de inhibición (97). La K_i obtenida para el extracto sin LDAO fue de 12 nM y de 70 y 210 nM para los extractos en presencia de LDAO 3 y 7 mM, respectivamente. Por lo tanto se puede concluir que el detergente disminuye la afinidad de IF₁ por la F₁ presente en el extracto de Tritón.

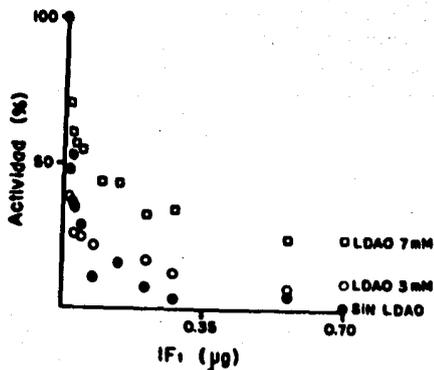


Fig. 6 Curvas de inhibición para un extracto de Tritón de partículas de Klein. Efecto del LDAO. Las incubaciones con las cantidades indicadas de IF₁ se realizaron en 0.3 ml, como se describió previamente. El LDAO 3 o 7 mM se agregó antes de iniciar la reacción de ATPasa con 0.3 ml del medio de reacción. ●-----● Extracto de Tritón de partículas de Klein; ○-----○ Extracto con LDAO 3 mM; □-----□ Extracto con LDAO 7 mM.

- Cinéticas de ATP para extractos de Tritón con inhibidor endógeno y exógeno. Efecto del LDAO.

Se hicieron curvas de concentraciones crecientes de ATP para los extractos de Tritón asociados con la proteína inhibidora (extractos de Tritón de partículas de Mg-ATP y extractos de Tritón de partículas de Klein reconstituidas con IF₁) para compararlos con las curvas de los mismos extractos pero activados con LDAO (fig. 7), y de esta forma determinar si un modo de acción del detergente es a través de la modificación de las constantes cinéticas de la enzima para su sustrato ATP. La presencia del LDAO no modifica de manera importante la afinidad de F₁F₀ por el sustrato, ya que las K_m calculadas son de 0.66 mM para los extractos de partículas de Mg-ATP y de Klein y de 0.20 y 0.40 mM, respectivamente, para estos mismos pero con LDAO (recuadros fig. 7). La v_{max} para los extractos con inhibidor endógeno y reconstituido es de 0.28 μmol min⁻¹ mg⁻¹ y para los extractos activados con LDAO la v_{max} aumenta a 1.0 μmol min⁻¹ mg⁻¹ para el extracto de partículas de Klein reconstituido con IF₁, y a 2.5 μmol min⁻¹ mg⁻¹ para el extracto de partículas de Mg-ATP (recuadros fig. 7). Así, al parecer el detergente no modifica directamente el sitio catalítico de la F₁, ya que la K_m no se afecta de manera importante, pero sí permite que la enzima pueda hidrolizar el ATP con mayor velocidad.

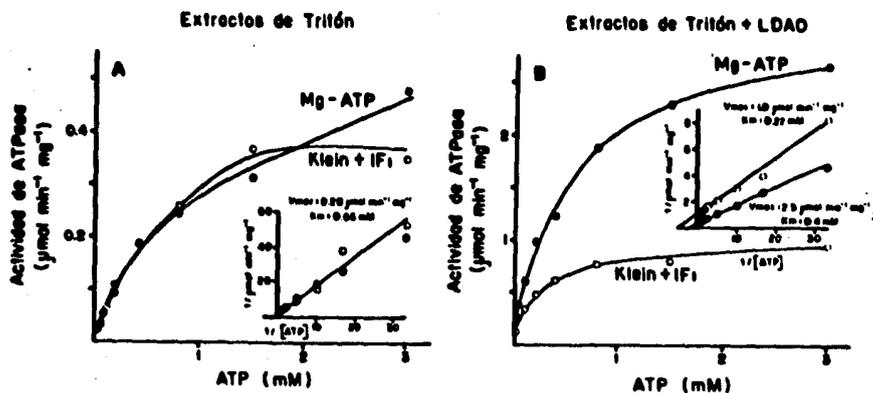


Fig 7 Curvas de ATP para las reacciones de hidrólisis de los extractos de Tritón de partículas con IF₁ endógeno o reconstituido. Efecto del LDAO. Las preincubaciones con IF₁ se realizaron como está descrito en "Materiales y Métodos". Se utilizaron 30 μg de partículas por ensayo. El medio de reacción para la hidrólisis contenía ATP en las concentraciones indicadas. ●—● Extracto de Tritón de partículas de Mg-ATP; ○—○ extracto de Tritón de partículas de Klein reconstituidas con IF₁. A, sin LDAO; B, con LDAO 3 mM.

- Efecto del pH y de la temperatura sobre las curvas de LDAO de la actividad hidrolítica de extractos de Tritón de partículas de Mg-ATP.

De acuerdo con la ref. 4, la asociación de la proteína inhibidora con la F_1 es afectada por el pH y la temperatura. Se probó el efecto de estos dos factores sobre la actividad de ATPasa de extractos de Tritón de partículas de Mg-ATP en presencia de concentraciones crecientes de LDAO (fig. 8).

En la figura 8A se muestra que, al parecer, el pH no modifica la forma general de las curvas de LDAO ni afecta de manera importante los valores máximos de activación de la hidrólisis con concentraciones de LDAO cercanas a 2-3 mM.

En cambio, la temperatura sí modifica estos valores máximos (fig. 8B), siendo el menor a 0°C ($2.2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) y el mayor a 37°C ($8.7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Otro efecto de la temperatura es que después del punto de máxima actividad hidrolítica, con concentraciones de LDAO mayores a 2 mM, la disminución de los valores de hidrólisis es poco marcada a 0°C y más brusca a 30°C y a 37°C. En la curva de LDAO a 37 °C, puede observarse que la actividad disminuye desde $8.7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ hasta $3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ con LDAO 2 y 3 mM, respectivamente, mientras que en la curva a los 30°C sólo disminuye de 5 a $3.5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ con las mismas concentraciones del detergente. Sin embargo con estos experimentos no se puede diferenciar si el efecto del LDAO sobre la hidrólisis a las diferentes temperaturas de preincubación, está relacionado directamente con la F_1 , con el inhibidor o con ambos.

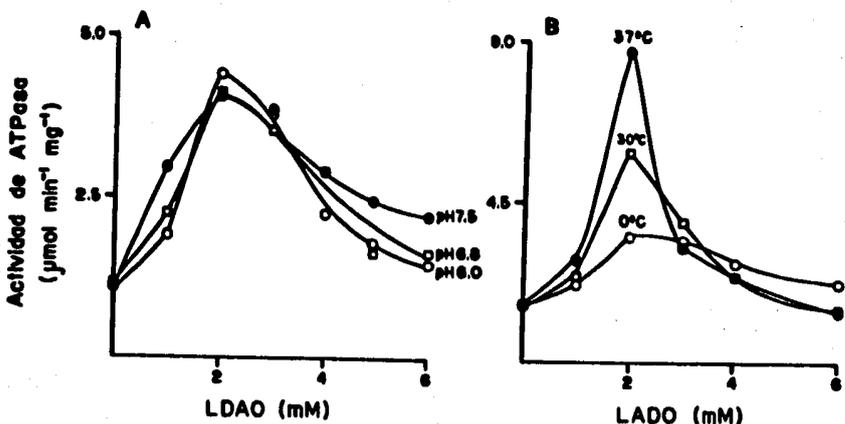


Fig. 8 Efecto del pH y de la temperatura sobre las curvas de LDAO para la hidrólisis de un extracto de Triton de partículas de Mg-ATP. Las incubaciones con el LDAO y la reacción de hidrólisis se realizaron como ya se ha indicado. Se utilizaron 7 μg de proteína por ensayo. Para las curvas a pH de 6.0 y de 6.8 se utilizó MOPS 5 mM en lugar de Tris-Cl 5 mM. A, ○—○ pH 6.0; □—□ pH 6.8; ●—● pH 7.5. B, ○—○ 0°C; □—□ 30°C; ●—● 37°C.

Efecto del LDAO sobre la actividad hidrolítica de preparaciones sin proteína inhibidora.

Como se mostró en la figura 1B el LDAO afecta la actividad hidrolítica de partículas de Klein, a pesar de su falta de IF_1 . Su actividad puede, entonces, estar controlada por factores distintos a esta proteína.

En el caso del extracto de Tritón de partículas de Klein existe una activación desde 8 hasta aproximadamente $30 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (casi 4 veces de activación) al ir aumentando las concentraciones de LDAO (fig. 9). La actividad máxima alcanzada es muy alta para tratarse de un sistema sensible a oligomicina.

De modo interesante, el LDAO no tiene ningún efecto sobre la actividad hidrolítica de la F_1 -ATPasa soluble (fig. 4B). Es decir, el LDAO no aumenta ni disminuye la actividad de ATPasa de un sistema no asociado a membrana (partículas submitocondriales) ni al canal F_0 (extractos de Tritón) ni al inhibidor endógeno o exógeno.

- Estabilidad en el frío de un extracto de Tritón de partículas de Klein activado con LDAO.

Como el efecto del LDAO sobre los sistemas no asociados al IF_1 depende de que la enzima esté asociada al canal F_0 (fig. 1B, fig. 9), un posible mecanismo de acción del detergente sería la disociación del sector F_1 del canal, mecanismo que explicaría la alta actividad hidrolítica alcanzada por el extracto de Tritón de partículas de Klein en presencia de LDAO 3 mM (fig. 10).

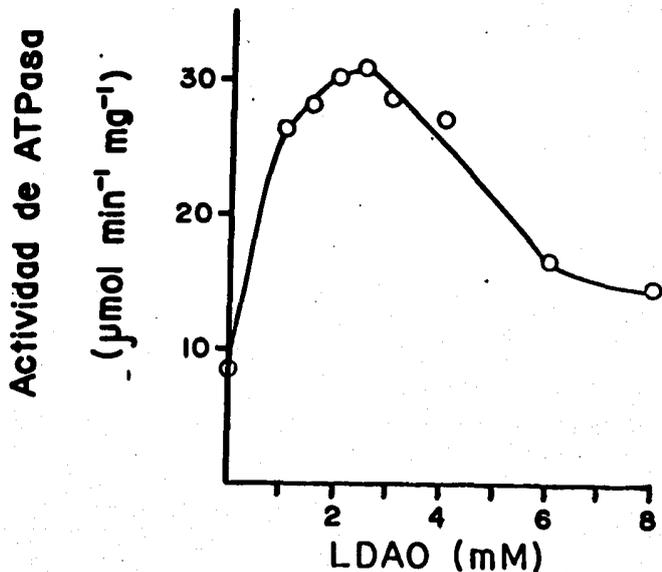


Fig. 9 Hidrólisis de ATP de un extracto de Tritón de partículas de Klein. El extracto de Tritón se obtuvo como está descrito en "Materiales y Métodos". El LDAO se adicionó a muestras de 0.3 ml con 7 μg de proteína. La reacción se inició al agregar 0.3 ml del medio de hidrólisis.

Si esto fuera así, la actividad de ATPasa de un extracto de Tritón de partículas de Klein activado con LDAO podría disminuir bruscamente al incubarlo a 4°C, ya que, como se sabe, la F_1 soluble pierde rápidamente su actividad a bajas temperaturas (107). En la figura 10 se muestra el porcentaje de la actividad hidrolítica a lo largo de 4 horas de incubación a 4 °C de la F_1 soluble, de una F_1 soluble con LDAO 1 mM y de un extracto de Tritón de partículas de Klein en presencia y en ausencia de LDAO 3 mM. Al parecer por estos resultados, la presencia del LDAO no disocia a la F_1 del F_0 , ya que el extracto de Tritón mantiene su actividad de ATPasa a lo largo de las 4 horas de incubación en el frío, independientemente de que se encuentre activado por el LDAO. En cambio, la actividad hidrolítica de la F_1 -ATPasa con o sin LDAO es solamente del 5% de la original a las 2 horas de incubación. Debe mencionarse, sin embargo, que la actividad de ATPasa de estos extractos en presencia de las concentraciones estimuladoras de LDAO no es sensible a la oligomicina (los resultados no se muestran).

- Efecto de la fosfatidilcolina sobre la actividad de ATPasa de un extracto de Tritón de partículas de Klein.

Muchas preparaciones de F_1F_0 extraídas con detergentes exhiben una baja actividad hidrolítica hasta que se recombinan con fosfolípidos exógenos (107-112). La activación de la hidrólisis por el LDAO podría deberse a un efecto similar al de algunos fosfolípidos sobre el complejo. Para explorar esta posibilidad se probaron cantidades crecientes de fosfatidilcolina sobre un extracto de Tritón de partículas de Klein sin LDAO y activado

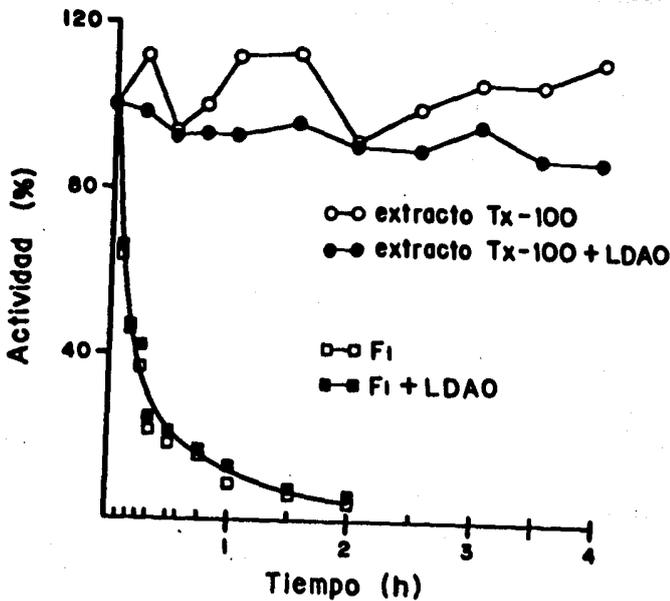


Fig. 10 Hidrólisis de ATP de un extracto de Tritón de partículas de Klein y de la F₁ soluble, incubados a 4°C. Efecto de la presencia de LDAO. La incubación a 4°C de un extracto de Tritón de partículas de Klein o de la F₁ soluble se hizo en sacarosa 150 mM/Tris 5 mM, pH 7.4; para el extracto, la concentración final de Tritón en este medio fue de 0.06% y para el caso de la F₁ soluble se agregó Tritón para obtener esta misma concentración. En los tiempos indicados se tomaron alícuotas que contenían 7 µg de la proteína en el extracto ó 1 µg de F₁ soluble y se midió la reacción de ATPasa como se ha indicado anteriormente. o----o Extracto de Tritón; ●----● extracto de Tritón + LDAO 3 mM; □----□ F₁ soluble; ■----■ F₁ soluble con LDAO 1 mM.

con LDAO 2 mM. Con los resultados mostrados en la figura 11 puede decirse que estos fosfolípidos no mejoran significativamente la actividad de ATPasa del extracto y que, aún en presencia de los fosfolípidos esta actividad puede ser estimulada por el detergente.

Efecto del colato y del CHAPS sobre la actividad hidrolítica de partículas de Mg-ATP.

Se probó el efecto de otros detergentes sobre la actividad hidrolítica de partículas submitocondriales de Mg-ATP. En la figura 12 puede observarse que el colato no tiene ningún efecto sobre la actividad de ATPasa de estas partículas, en tanto que el CHAPS tiene un efecto inhibitor en todas las concentraciones probadas. Así otros detergentes que interaccionan con el complejo F_1F_0 , ya que se han utilizado para solubilizarlo (125, 126), pueden tener muy diferentes efectos sobre sus actividades catalíticas. El LDAO debe tener ciertas características especiales que le permiten no sólo interaccionar con el complejo F_1F_0 -ATPasa, sino estimularlo o inhibirlo, dependiendo de la concentración del detergente.

Efecto del LDAO sobre la F_1 soluble modificada con DCCD o con WBD-CI

Se realizaron otra serie de experimentos para estudiar los posibles mecanismos de activación por LDAO sobre preparaciones inhibidas. Se sabe, por un lado, que el sitio de unión de IF_1 se encuentra en una de las subunidades β de F_1 (62, 63) y, por

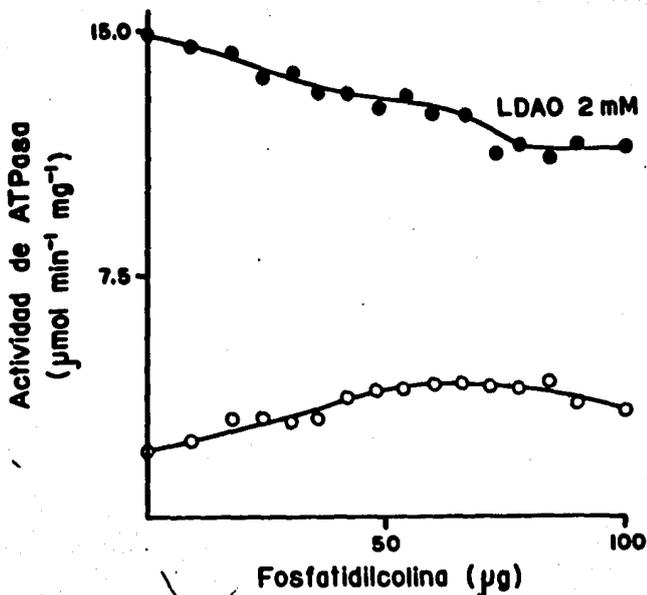


Fig. 11 Efecto de la fosfatidilcolina sobre la hidrólisis de un extracto de Tritón de partículas de Klein. Una muestra de 0.3 ml del extracto de Tritón con 7 µg de proteína se incubó durante 5 min con cantidades crecientes de fosfatidilcolina; posteriormente se midió la actividad de ATPasa. La adición de LDAO fue posterior a la incubación con el fosfolípido. ○-----○ Extracto de Tritón de partículas de Klein; ●-----● extracto de Tritón con LDAO 3 mM.

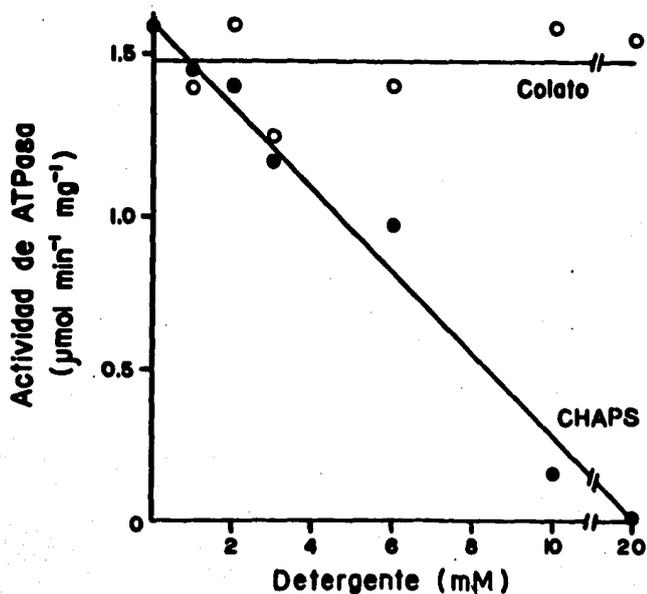


Fig. 12 Efecto del colato de sodio y del CHAPS sobre la actividad hidrolítica de partículas de Mg-ATP. Una muestra de 0.3 ml con 30 μg de partículas submitocondriales se incubaron con cantidades crecientes de colato de sodio o de CHAPS. La hidrólisis se inició agregando 0.3 ml del medio de reacción.

otro lado, que existen inhibidores no naturales que tambien interaccionan con esta misma subunidad. Dos de ellos, el DCCD y el NBD-Cl, se unen covalentemente a β , inhibiendo la actividad hidrolitica de la enzima (98-106). A pesar de que esta unión es covalente, el LDAO es capaz tanto de aumentar como de disminuir la actividad de ATPasa de la F₁ modificada tanto con DCCD como con NBD-Cl (figura 13).

Es interesante notar que la actividad de ATPasa de la F₁ soluble es insensible a las distintas concentraciones de LDAO (fig. 4B) y que sólo cuando se encuentra asociada al inhibidor natural (figs. 4A y 4B) o a inhibidores artificiales como el DCCD o el NBD-Cl (fig. 13) es estimulada alrededor de 2-3 veces por concentraciones de LDAO cercanas a 1 mM y es inhibida por concentraciones mayores (2-5 mM).

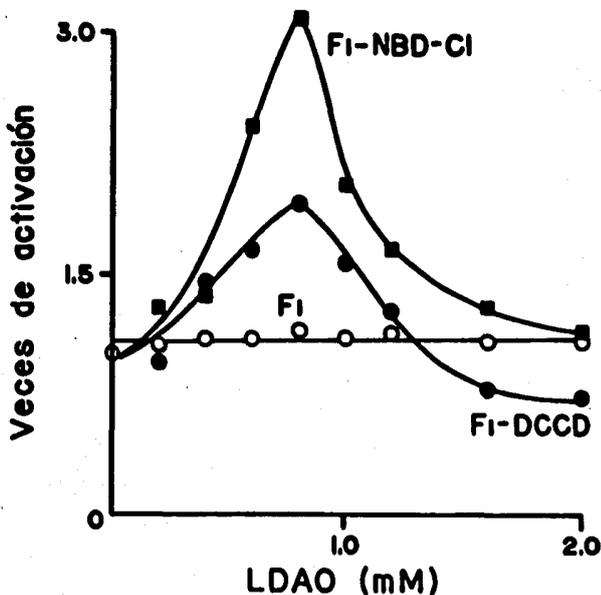


Fig. 13 Efecto del LDAO sobre la actividad hidrolítica de los complejos F_1 -DCCD y F_1 -NBD-Cl. La inhibición con DCCD se hizo en 0.3 ml de sacarosa 150 mM, Tris-Cl 5 mM, pH 7.4 a 37°C durante 1 h, con 1 μ g de F_1 ; la concentración final de DCCD fue de 400 μ M. La inhibición con NBD-Cl se realizó de la misma manera, pero durante 30 min y con luz tenue; la concentración final de NBD-Cl fue de 100 μ M. El LDAO se agregó después de las incubaciones con los inhibidores y se inició la reacción de ATPasa. \circ — \circ F_1 soluble; \bullet — \bullet F_1 -DCCD; \blacksquare — \blacksquare F_1 -NBD-Cl.

DISCUSION

Efecto del LDAO sobre la actividad de ATPasa de la F₁ mitocondrial

Existen varios detergentes que son capaces no solamente de interactuar con regiones hidrofóbicas de la F₁ de varios sistemas, sino también de modificar su actividad catalítica: los alquilglucósidos de cadena corta o mediana que estimulan la actividad Ca-ATPasa o Mg-ATPasa de CF₁, según las condiciones de incubación (78, 80); el colato y el desoxicolato que activan a la TF₁-ATPasa (85); el octilglucósido que puede inhibir la actividad Ca-ATPasa de la F₁ de M. lysodeikticus (83) y el LDAO que mejora la actividad ATPasa de ECF₁ (81) y la Mg-ATPasa de Rs. rubrum (79).

En este trabajo se muestra que el efecto del LDAO sobre la F₁-ATPasa mitocondrial no es solamente estimulador sino que a concentraciones altas puede inhibir esta misma actividad (figs. 1-5). Además, en el caso de las partículas las concentraciones menores a 1 mM de LDAO tienen también un efecto inhibitorio sobre la hidrólisis (fig.1). Este resultado es similar al obtenido por Löscher et al. (81) que observan que la actividad de ATPasa de preparaciones de membranas de ECF₁ es inhibida con concentraciones menores al 0.01% de LDAO (aproximadamente 0.4 mM). Hasta el momento no se tiene ninguna explicación para este fenómeno. No obstante, el hecho de que existan efectos contrarios del mismo detergente sobre la actividad hidrolítica de la F₁, puede sugerir que éste interacciona con distintas regiones hidrofóbicas de la

proteína, que controlan de manera distinta la expresión de su actividad hidrolítica. El estudio de la ATPasa con este detergente puede ayudar a hacer evidentes estos distintos factores de control.

Efecto del LDAO sobre los sistemas con proteína inhibidora

Se ha postulado que el efecto de varios detergentes como los alquilglucósidos de cadena corta o el LDAO está relacionado con la remoción o el rearrreglo de la subunidad ϵ de F_1 (79-82). Este hecho explicaría la estimulación de la actividad hidrolítica por el detergente, ya que, de acuerdo con varios autores, la subunidad ϵ actúa como un factor regulador de la F_1 -ATPasa (34, 35, 68-70).

Parte del efecto del LDAO sobre la F_1 mitocondrial puede estar relacionado con la presencia de la proteína inhibidora. Cuando se adiciona IF_1 a partículas submitocondriales de Klein, a un extracto de Tritón derivado de las mismas o a la F_1 soluble, la curva de actividad hidrolítica obtenida con concentraciones crecientes de LDAO (figs. 3 y 4B) es comparable a la que resulta de los sistemas con inhibidor endógeno (figs. 1A, 2 y 4A), no solo en cuanto a la forma general de la curva sino en cuanto a las veces de activación de la hidrólisis: aproximadamente 4 veces para las partículas (figs. 1A y 3A), unas 10 veces para los extractos de Tritón (figs. 2 y 3B) y dos veces para el complejo F_1 - IF_1 (fig. 4).

Posibles diferencias entre el inhibidor endógeno y el inhibidor reconstituido

A pesar de la similitud entre las veces de activación de la hidrólisis de los sistemas con inhibidor nativo o reconstituido, la actividad hidrolítica máxima en presencia de LDAO alcanzada por el extracto de Tritón de partículas de Klein reconstituido con IF_1 ($2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (fig. 3B) o de la F_1 de con IF_1 endógeno ($3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (fig. 4A) es varias veces menor que la actividad máxima alcanzada por el extracto de partículas de Mg-ATP ($10 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (fig. 2) o de la F_1 reconstituida con inhibidor ($15 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) (fig. 4B). Esto podría reflejar diferencias entre la unión y/o los efectos sobre la F_1 del inhibidor endógeno y exógeno. La idea anterior ha sido propuesta anteriormente por varios autores. Por ejemplo, Warsaw et al. (115) mostraron que el inhibidor adicionado a la F_1 puede removerse parcialmente al precipitar al complejo F_1 - IF_1 con sulfato de amonio, hecho que no ocurre con el IF_1 endógeno; por lo tanto los autores sugieren que el modo de unión del IF_1 endógeno y el exógeno con la enzima es diferente.

Por otro lado, Galante et al. (116) también han propuesto que el IF_1 agregado puede ser diferente del endógeno, tanto en su estructura como en su modo de interacción con la F_1 , ya que tienen diferentes efectos sobre la hidrólisis del ATP y el recambio ATP- P_i del complejo V mitocondrial. Mientras que el IF_1 endógeno no afecta el recambio ATP- P_i y sólo inhibe a la actividad de ATPasa en un 50%, con el IF_1 agregado existe un 93% de inhibición de la hidrólisis y un 60% de inhibición en el recambio ATP- P_i .

Más recientemente, Valdés y Dreyfus (117) utilizando anticuerpos que reconocen principalmente a las subunidades α y β de la F_1 mitocondrial, han detectado diferencias estructurales de estas subunidades dependientes de si la enzima contiene IF_1 endógeno o reconstituido. Mas aún, estas diferencias también se reflejan en las propiedades catalíticas de la F_1 de partículas submitocondriales: los anticuerpos contra la F_1 estimulan la hidrólisis del ATP en las partículas de Mg-ATP pero inhiben la actividad de ATPasa de las partículas con IF_1 reconstituido; en cambio, el recambio ATP-P_i es inhibido por los anticuerpos en el caso de las partículas de Mg-ATP y es estimulado en las partículas con IF_1 agregado. Los autores sugieren la existencia de un cambio en la estructura de la F_1 inducido por la naturaleza de la interacción del inhibidor, nativo o adicionado, con la enzima.

De acuerdo con los autores anteriores, el hecho de que el LDAO tenga efectos diferentes sobre las veces de activación de los sistemas con inhibidor endógeno o agregado, apoya las evidencias que existen sobre las diferencias entre el control de la expresión de la actividad de ATPasa que ejerce el inhibidor natural y el exógeno.

El LDAO remueve al IF_1 de su sitio inhibidor en la F_1 , pero no lo libera al medio

Esta propuesta acerca del modo en que actúa el LDAO sobre las preparaciones inhibidas se basa en los siguientes hechos:

a) aunque el LDAO estimula la actividad de ATPasa de las preparaciones inhibidas los valores alcanzados no llegan a ser los de las preparaciones carentes de inhibidor. Posiblemente esto se debe a que el inhibidor no llega a liberarse hacia el medio y sigue teniendo cierto efecto sobre las distintas preparaciones,

b) tanto el efecto estimulador como el inhibidor del LDAO sobre la ATPasa son reversibles (fig. 5). Al diluir lo suficiente el detergente se obtiene una actividad similar a la inicial, lo que puede indicar que cuando se vuelve a las condiciones de baja concentración del detergente el inhibidor removido regresa a su sitio inhibidor

c) los experimentos para obtener las curvas de inhibición de la figura 6 se realizaron como se indica en el pie de figura correspondiente, agregando el LDAO después de la incubación con IF_1 . Se repitieron los mismos experimentos pero adicionando el detergente durante la incubación, obteniéndose los mismos resultados en cuanto a la actividad porcentual y las K_i determinadas (ya que se trataba de extractos de Tritón de partículas de Klein con actividad ATPasa estimulada o inhibida). Esto indica que la presencia del LDAO en el medio de inhibición no evita la interacción del IF_1 con la F_1 .

El LDAO modifica la afinidad de IF_1 por su sitio de unión en la F_1

La afinidad del inhibidor por la F_1 en extractos de Tritón de partículas de Klein (fig. 6) es mayor en ausencia ($K_i = 12$ nM) que en presencia de LDAO 3 mM ($K_i = 70$ nM) o LDAO 7 mM ($K_i = ---$

210 mM). Aunque con estas dos concentraciones del detergente disminuyen la afinidad del inhibidor, el efecto sobre la actividad hidrolítica de la enzima es contrario, ya que el LDAO 3 mM estimula la actividad en tanto que el LDAO 7 mM hace que disminuya. Esto puede llevar a pensar que el modo como este unida la proteína inhibidora a la F_1 tiene distintas consecuencias sobre la expresión de la hidrólisis del ATP.

En relación con lo anterior, para el caso de la F_1 soluble, es interesante notar que cuando se libera la acción del IF_1 de la F_1 -ATPasa, ésta se hace sensible a la presencia del detergente (figs. 4A y 4B), fenómeno que no ocurre cuando una F_1 soluble está expuesta a las mismas concentraciones del detergente (fig. 4B, curva superior). Nuevamente, con esto se podría proponer la existencia de una conformación de la enzima diferente a la de la F_1 o a la F_1 asociada con el IF_1 , que se presenta cuando el inhibidor está unido pero sin ejercer su acción inhibidora.

Efecto del LDAO sobre la K_m y la v_{max} de preparaciones inhibidas

Al parecer el LDAO en concentraciones activadoras no actúa directamente sobre el sitio catalítico de la F_1 en extractos de Tritón con inhibidor endógeno o exógeno (fig. 7), ya que el valor de la K_m no se modifica significativamente con la presencia del detergente (0.22 y 0.66 mM, respectivamente). En cambio la v_{max} es mayor en presencia (1-2.5 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) que en ausencia (0.28 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) del LDAO. Este hecho puede sugerir que el detergente modifica la conformación de la enzima de tal forma que

le permite hidrolizar con mayor velocidad sin que se afecte de modo importante su afinidad por el sustrato.

Es interesante notar, además, que las constantes cinéticas de los extractos de partículas con inhibidor endógeno o exógeno son muy similares, aunque, nuevamente, la v_{max} alcanzada en presencia del LDAO de los extractos de partículas de Mg-ATP es más de 2 veces mayor que la v_{max} de los extractos de partículas de Klein reconstituidos con F_1 (2.5 y 1 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectivamente).

La actividad de ATPasa de sistemas carentes de F_1 , también es modificada por el LDAO

Las concentraciones bajas de LDAO inhiben en un 80% la actividad hidrolítica de las partículas de Klein, para posteriormente, con cantidades mayores del detergente, recuperar casi un 70% de su actividad inicial (fig. 1B). A pesar de que no existe un efecto activador neto del detergente sobre la hidrólisis de estas partículas con bajo contenido de F_1 , su actividad se ve muy modificada por la presencia del LDAO. Este efecto de activación se hace más evidente en los extractos de Tritón de las partículas de Klein, que con LDAO 3 mM llegan a actividades tan altas como 30 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$. Las evidencias que se tienen para sugerir que el alcanzar estos valores de la hidrólisis no se debe a la disociación de la F_1 del sector F_0 , son principalmente:

- a) la estabilidad a bajas temperaturas de un extracto de Tritón de partículas de Klein activado con LDAO (fig. 10);
- b) se ha reportado el aislamiento del complejo F_1F_0 mitocondrial,

solubilizando partículas de Klein con LDAO 7.5 mM (123); este complejo F_1F_0 puede reconstituirse en liposomas y llevar a cabo reacciones acopladas a una membrana (123, 124).

Por su parte, Lötcher y colaboradores (81) afirman que el LDAO en concentraciones activadoras libera a ECF_1 de F_1 como una enzima que contiene α , β , γ y ϵ , pero que esta no es la causa del aumento de la actividad de ATPasa, sino mas bien proponen que efecto del detergente es a través de un rearrreglo estructural de ECF_1 .

La activación de la hidrólisis por el LDAO sobre sistemas sin F_1 , probablemente no está relacionada con un efecto similar al de los fosfolípidos

La actividad de ATPasa de los extractos de Tritón de partículas de Klein es ligeramente estimulada cuando se ponen en contacto con fosfatidilcolina exógena (fig. 11). Sobre esta actividad aun puede observarse el efecto estimulador del LDAO sobre la hidrólisis, así que al parecer, el modo de acción del detergente no está relacionado con los mecanismos activadores que ejercen diversos fosfolípidos sobre preparaciones de F_1F_0 . (107-112).

Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que otras clases de fosfolípidos puedan estimular en mayor grado la actividad hidrolítica en estos extractos de Tritón.

La actividad de ATPasa de la F₁ soluble no es modificada por la presencia del LDAO

Cuando la F₁ no se encuentra asociada ni a la proteína inhibidora ni al sector F₀, ya sea en solución o membranar, entonces el detergente ni estimula ni disminuye la actividad hidrolítica de la F₁-ATPasa (fig. 4B, parte superior). Esto podría sugerir que la F₁ soluble o no interacciona con el detergente, o bien, que las regiones hidrofóbicas que se encuentran en contacto con el LDAO no ejercen ningún control sobre su actividad. Cuando la F₁ se encuentra asociada a su proteína inhibidora o al canal F₀, probablemente quedan expuestas regiones distintas que al estar en contacto con el detergente se pone de manifiesto su papel regulador sobre la hidrólisis.

Además, un punto interesante es que no solamente la proteína inhibidora controla la hidrólisis de la F₁, sino que el mismo sector F₀, o interacciones entre subunidades que se establecen cuando éste se asocia, pueden también constituir factores que controlan esta actividad. La idea de que las alteraciones que ocurren en el sector membranar pueden tener influencia sobre los eventos catalíticos y los cambios conformacionales que ocurren en la F₁, ha sido expuesta por Penefsky (127), por Matsuno-Yagi et al. (122) y por Li y colaboradores (128). En este trabajo, estos posibles factores de control se hacen evidentes al hacer las titulaciones con el LDAO.

El LDAO puede estimular la actividad de ATPasa de la F₁ modificada con DCCD o con NBD-Cl

Existen varios modelos que tratan de explicar la fosforilación oxidativa y la hidrólisis del ATP. En el modelo de Boyer (118) se propone que los tres sitios catalíticos de la F₁ en las subunidades β son idénticos y que actúan de modo alternante y secuencial a través de tres pasos de la reacción hidrolítica: la unión del ATP, la conversión del ATP fuertemente unido en ADP y P_i y la liberación de estos productos. En el modelo propuesto principalmente por Wang (119, 120) se supone la existencia de una sola subunidad β catalíticamente activa y dos subunidades con sitios catalíticos latentes.

Como ya se ha mencionado, la actividad de ATPasa puede inhibirse por modificación covalente de una de las tres subunidades β con DCCD o con NBD-Cl (98-106, 121, 122).

Soong y Wang (101) y Matsuno-Yagi y Hatefi (122) encontraron que cuando una F₁ modificada con DCCD se reconstituye en partículas carentes de F₀, es capaz de catalizar la síntesis del ATP. Más aún, si estas partículas reconstituidas se tratan con un procedimiento que simula la fosforilación oxidativa, existe una reactivación lenta de la hidrólisis, sin perder la marca covalente. Soong y Wang interpretan estos resultados de la siguiente manera: la F₁ soluble puede rearrreglar sus subunidades pero de un modo tan lento que la hidrólisis del ATP se realiza en el mismo sitio activo de la subunidad β que tiene una posición especial. Cuando uno de los grupos funcionales de esta subunidad se marca selectivamente, la consecuencia es la inactivación total de la enzima. En las partículas reconstituidas con F₁ o con F₁-DCCD,

el rearreglo intramolecular puede acelerarse de tal forma que una subunidad β en estado activo puede interconvertirse a un estado latente y una subunidad sin marca se puede convertir al estado activo. De esta forma, aunque la enzima no pierde su marca covalente puede recuperar algo de su actividad catalítica.

Por su parte, Kandpal et al. (106) encontraron que la F_1 modificada con DCCD o con NBD-Cl puede recuperar algo de su capacidad catalítica por tratamiento con solventes orgánicos. Los nucleótidos formados se liberan de un modo muy lento pero dependiente de la presencia de ATP en el medio, lo cual, según los autores, es una evidencia de que las enzimas, a pesar de estar modificadas, retienen su cooperatividad entre los sitios catalíticos que actúan secuencialmente. Además, el hecho de que la inhibición por NBD-Cl o por DCCD no se evite por la presencia del ATP (101) indica que estos reactivos no se unen a grupos del sitio catalítico, por lo que queda abierta la posibilidad de que las tres subunidades β mantengan su capacidad de catálisis.

Como se mostró en la figura 9, el LDAO puede hacer que una F_1 modificada con NBD-Cl o con DCCD recupere parte de su actividad hidrolítica, al igual que la F_1 modificada reconstituida en las partículas o la F_1 modificada reactivada con solventes orgánicos. No se tienen datos que pudieran apoyar alguna de las dos explicaciones expuestas anteriormente, así que el detergente podría estar actuando a través de acelerar la interconversión entre la subunidad β activa y las latentes, o bien, podría estar haciendo más efectiva la cooperatividad entre ellas, en el caso de que sean equivalentes.

Recientemente, Montero-Lomeli y Dreyfus (79) mostraron que el LDAO, además de estimular la actividad de Mg-ATPasa, mejora la fase inicial de la catalisis en un solo sitio del complejo F_1F_0 de Ra. rubrum. En ausencia del detergente la v_i es de 5.5×10^{-4} moles de P_i por mol de F_1F_0 por segundo y en presencia del detergente esta v_i mejora en casi un orden de magnitud (3.5×10^{-3} moles de P_i por mol de F_1F_0 por segundo). Por tanto, en el caso de la F_1F_0 de Ra. rubrum se ha podido probar que el LDAO no solo mejora la interacción entre las subunidades, como en la F_1 mitocondrial, sino que afecta las propiedades intrínsecas del sitio catalítico en la subunidad .

Como se había mencionado por los datos de la figura 7, el LDAO no afecta la K_m de la enzima por su sustrato, pero la v_{max} sí mejora con la presencia del detergente. Esto apoya la proposición acerca de que el LDAO modifica la conformación de la enzima de tal modo que al hacer más efectiva la interacción entre sus subunidades puede hidrolizar con mayores velocidades.

PERSPECTIVAS

Con los resultados presentados en este trabajo se ha mostrado que el detergente LDAO es capaz de modificar la actividad catalítica de distintas preparaciones de ATPasa. Esta modificación es dependiente tanto de la presencia del IF, asociado a al F_1 , como de la presencia del canal F_0 , en las preparaciones. Los diferentes efectos de este detergente revelan las distintas regiones hidrofóbicas expuestas en la F_0 , o en los complejos F_1 -IF, y F_1 - F_0 . Además, las distintas actividades hidrolíticas que se obtienen en cada caso en presencia del LDAO sugieren que en estas conformaciones de la enzima operan diferentes mecanismos de control.

Aunque se conocen los efectos de la proteína inhibidora sobre las reacciones catalíticas de la F_1 , aún está abierta la discusión de su papel en la regulación de la hidrólisis y la síntesis del ATP en la mitocondria. Por consiguiente, será de interés estudiar las reacciones de hidrólisis de ATP y de recambio ATP-P, en una preparación de F_1 - F_0 , con inhibidor endógeno reconstituida en liposomas. En la actualidad estamos trabajando en la obtención de esta preparación, debido a que existen varios métodos reportados para el aislamiento del complejo F_1 - F_0 , mitocondrial, pero en ellos no se ha determinado la presencia de IF, endógeno.

Por otra parte, desde hace algunos años se ha propuesto que la porción F_0 puede regular algunas propiedades catalíticas de la F_1 , no solamente a través de la translocación de protones, sino

mediante cambios conformacionales que se transmiten por la interacción entre ambos sectores. Por esta razón, también se ha iniciado un proyecto en el que se pretende determinar el efecto de la asociación del sector F₁ de partículas submitocondriales carentes de F₀ sobre la señal de fluorescencia de la aurovertina unida a la F₁ soluble, ya que este antibiótico se ha utilizado como una herramienta para detectar cambios conformacionales de esta enzima.

REFERENCIAS

1. Nicholls, D. G. *Bioenergetics*. Academic Press. 1982, 1-24.
2. Harold, F. M. *The Vital Force: A Study of Bioenergetics*. W.H. Freeman. 1987. 577 pp.
3. Greville, G. D. en *Curr. Top. in Bioenerg.* Vol. 3. D. R. Sanadi, ed. Academic Press, N.Y. 1969. 1-78.
4. Klein, G. Tesis Doctoral. Lyon, Francia, 1981.
5. Maloney, P. C. 1982. *J. Membr. Biol.* 67: 1-12.
6. Penefsky, H. S., Pullman, M. E., Datta, A., Racker, E. 1960. *J. Biol. Chem.* 232: 3330-3336.
7. Hinkle, P.C., Mc Carty, R. E. 1978. *Sci. Am.* 238: 104-123.
8. Bragg, P.D., Hou, C. 1980. *Bur. J. Biochem.* 106: 495-503.
9. Senior, A.E. 1973. *Biochem. Biophys. Acta.* 301: 249-277.
10. Senior, A.E., Wise, J. G. 1983. *J. Membr. Biol.* 73: 105-124.
11. Vogel, G., Steinhart, R. 1976. *Biochemistry.* 15: 208-216.
12. Bragg, P. D., Hou, C. 1975. *Arch. Biochem. Biophys.* 167: 311-321.
13. Sternweis, P.C. 1978. *J. Biol. Chem.* 253: 3123-3128.
14. Dunn, S. D., Futai, M. 1980. *J. Biol. Chem.* 255: 113-118.
15. Yoshida, M., Sone, N., Hirata, H., Kagawa, Y., Ui, N. 1979. *J. Biol. Chem.* 254: 9525-9533.
16. Cross, R. L. Malin, C. M. 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 2874-2881.
17. Issartel, J.-P., Lunardi, J., Vignais, P.V. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 895-901.
18. Vignais, P. V., Lunardi, J. 1985. *Annu. Rev. Biochem.* 54: -- 977-1014.
19. Fergussan, S. J., Lloyd, W. J., Radda, G. K. 1975. *Bur. J. Biochem.* 54: 127-135.
20. Pougéois, R., Satre, M., Vignais, P.V. 1979. *Biochem.* 17: -- 3018-3023.
21. Kohlbrenner, W. E., Cross, R. L. 1978, *J. Biol. Chem.* 253: -- 7609-7613.
22. Gromet-Elhanan, Z., Khananshvili, D. 1984. *Biochemistry.* 23: 1022-1028.
23. Kironde, F. A. S., Cross, R. L. 1987. *J. Biol. Chem.* 262: 3488-3495.
24. Harris, D. A. 1978. *Biochem. Biophys. Acta.* 463: 245-273.
25. Paradies, H. H. 1980. *FEBS Lett.* 120: 289-292.
26. Senda, M., Kanazawa, H., Tsuchiya, T., Futai, M. 1983. *Arch. Biochem. Biophys.* 220: 398-404.
27. Hirano, M., Takeda, K., Kanazawa, H., Futai, M. 1984. *Biochemistry.* : 1652-1656.
28. Chang, T., Penefsky, H. S. 1973. *J. Biol. Chem.* 248: 2746-2754.
29. Issartel J. B., Klein, G., Satre, M., Vignais, P. V. 1983. *Biochemistry.* 22: 3485-3492.
30. Dunn, S. D., Futai, M. 1980. *J. Biol. Chem.* 255: 113-118.
31. Yoshida, M., Okamoto, H., Sone, N., Hirata, H., Kagawa, Y. 1977. *PNAS. USA.* 74: 936-940.
32. Dunn., S. D., Hepel, L. A. 1981. *Arch. Biochem. Biophys.*

210: 421-436.

33. Smith, J. B., Sternweis, P. C. 1977. *Biochemistry*. 16: 306--311.
34. Sternweis, P. C., Smith, J. B. 1980. *Biochemistry*. 19: 526-531.
35. Dreyfus, G., Satre, M. 1984. *Arch. Biochem. Biophys.* 229: --212-219.
36. Serrano, R., Kanner, B. I., Racker, E. 1976. *J. Biol. Chem.* 251: 2453-2458.
37. Foster, D. L., Fillingame, R. H. 1979. *J. Biol. Chem.* 254: -8230-8234.
38. Fillingame, R. H. en *Curr. Top. in Bioenerg.* Vol. 11. D. R. Sanadi, ed. Academic Press, New York. 1981. 35-106.
39. Sebald, V., Graf, T., Lukins, H. B. 1979. *Eur. J. Biochem.* -93: 587-599.
40. Hoppe, J., Sebald, V. 1984. *Biochem. Biophys. Acta.* 768: 1--27.
41. Sebald, V., Nachleidt, W., Wachter, E. 1980. *PNAS. USA.* 77:-785-788.
42. Konishi, T., Packer, L., Criddles, R. *Meth. Enzymol.* 1979. -55-414.
43. Calis, H. 1980. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 92: 26-31.
44. Sigrist-Nelson, K., Azzi, A. 1980. *J. Biol. Chem.* 255: 10638-10643.
45. De Pinto, V., Tommasino, M., Benz, R., Palmieri, F. 1985. *Biochim. Biophys. Acta.* 813: 230-242.
46. Sebald, V., Hoppe, J. en *Curr. Top. in Bioenerg.* Vol. 12. D. R. Sanadi, ed. Academic Press, New York. 1981. 2-59.
47. Mao, D., Wachter, E., Wallace, B. A. 1982. *Biochemistry*. 21: 4960-4968.
48. Mc Lennan, D. H., Tzagoloff, A. 1968. *Biochemistry*. 7: 1603-1610.
49. Mc Lennan, D. H., Tzagoloff, A. 1968. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 33: 441-447.
50. Dupuis, A., Issartel, J.-P. Vignais, P.V. 1985. *Biochemistry*. 24: 728-733.
51. Dupuis, A., Lunardi, J., Issartel, J.-P., Vignais, P. V. --- 1985. *Biochemistry*. 24: 734-739.
52. Dupuis, A., Vignais, P. V. 1987. *Biochem.* 26: 410-418.
53. Glasser, E., Norling, B., Ernster, L. 1980. *Eur. J. Biochem.* 110: 225-235.
54. Kanner, K. I., Serrano, R., Kandrach, M. A., Racker, E. 1976. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 69: 1050-1056.
55. Sanadi, D. R. 1982. *Biochim. Biophys. Acta.* 683: 39-56.
56. Yagi, T., Hatefi, Y. 1984. *Biochemistry*. 23: 2449-2455.
57. Pullman, M. E., Monroy, G. C. 1963. *J. Biol. Chem.* 238: ---3762-3769.
58. Brooks, J. C., Senior, A. E. 1971. *Arch. Biochem. Biophys.* 147: 467-470.
59. Asami, K., Juntti, K., Ernster, L. 1970. *Biochim. Biophys.-Acta.* 205: 307-311.
60. Tuena de Gómez-Puyou, M., Muller, U., Dreyfus, G., Ayala, G., Gómez-Puyou, A. 1983. *J. Biol. Chem.* 258: 13680-13684.
61. Gómez-Puyou, A., Beltrán, C., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. 1984 en *H⁺-ATPase Synthase: Structure, Function,*

- Regulation. S., Papa, K., Altendorf, L. Packer, eds. Adriatica Editrice, Bari, 1984. 371-386.
62. Klein, G., Vignais, P. V. 1983. *J. Bioenerg. Biomembr.* 15: 347-362.
 63. Powers, J., Crofts, R. L., Harris, D. A. 1983. *Biochim. --- Biophys. Acta.* 724: 128-141.
 64. Klein, G., Satre, M., Dianoux, A. C., Vignais, P. V. 1980. -- *Biochemistry.* 19: 2919-2925.
 65. Klein, G., Satre, M., Dianoux, A. C., Vignais, P. V. 1981. *Biochemistry,* 20: 1339-1344.
 66. Cintron, W. M., Hüllihen, J., Schwerzmann, K., Pedersen, P. L. 1982. *Biochemistry.* 21: 1878-1885.
 67. Amzel, L. M., Pedersen, P. L. 1983. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 801-824.
 68. Nelson, M., Nelson, H., Racker, E. 1972. *J. Biol. Chem.* 247: 7657-7662.
 69. Nieuwenhuis, P. J. R. M., Van de Drift, J. A. M., Voet, A. - B., Van Dam, K. 1974. *Biochem. Biophys. Acta.* 368: 461-463.
 70. Smith, J. B., Sternweis, P. C. 1977. *Biochemistry.* 16: 306-311.
 71. Helenius, A., Simons, K. 1975. *Biochim. Biophys Acta.* 415: 29-79.
 72. Farron, F., Racker, E. 1970. *Biochemistry.* 9: 3828-3836.
 73. Malin, C. M., Mac Carty, R. E. 1984. *J. Biol. Chem.* 259: 7281-7285.
 74. Moroney, J. V., Mc Carty, R. E. 1982. *J. Biol. Chem.* 257: 5910-5914.
 75. Selman-Reimer, S., Merchant, S., Selman, B. R. 1981. *Bio-- chemistry.* 20: 5476-5482.
 76. Richter, M. L., Patrie, W. J., Mc Carty, R. E. 1984. *J. - Biol. Chem.* 259: 7371-7373.
 77. Finel, M., Rubenstein, M., Pick, U. 1984. *FEBS Lett.* 166: 85-89.
 78. Pick, U., Bassilian, S. 1982. *Biochemistry.* 21: 6144----- 6152.
 79. Montero-Lomeli, M., Dreyfus, G., 1987. *Arch. Biochem. Biophys.* 257: 345-351.
 80. Yu, F., Mac Carty, R. E. 1985. *Arch. Biochem. Biophys.* 238: 61-68.
 81. Lötscher, H.-R., De Jong, C., Capaldi, R. A. 1984. *Bio----- chemistry.* 23: 4140-4143.
 82. Norling, B. 1986. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 136: 899-905.
 83. Andreu, J. M., Munoz, E. 1979. *Biochemistry.* 18: 1836-1844.
 84. Mollinedo, F., Munoz, E., Andreu, J. M. 1986. *Biochim. ----- Biophys. Acta.* 848: 230-238.
 85. Norling, B., Kelemen, G., Ernster, L. 1986. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*
 86. Vazquez-Laslop, N., Dreyfus, G. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: -- 7807-7810.
 87. Low, H., Vallin, I. 1963. *Biochim. Biophys. Acta.* 69. 361-374.
 88. Lee, C. P., Ernster, L. 1967. *Meth. Enzymol.* 10: 543-548.
 89. Klein, G., Satre, M., Zaccari, G., Vignais, P. V. 1982. ----- *Biochim. Biophys. Acta.* 681: 226-232.
 90. Knowles, A. F., Penefsky, H. S. 1972. *J. Biol. Chem.* 247:---

6617-6623.

91. Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. 1977. Arch. Bio---chem. Biophys. 162: 82-86.
92. Horstman, L. L., Racker, E. 1970. J. Biol. Chem. 245: 1336-1344.
93. Gornall, A. G., Bardawill, C. J., David, M. M. 1949. J. Biol. Chem. 177: 751-766.
94. Bradford, M. M. 1976. Anal. Biochem. 72: 248-254.
95. Glynn, I. M., Chappell, J. B. 1964. Biochem. J. 90: 147-149.
96. De Neis, L., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. 1983. Biochem. Biophys. Res. Comm. 111: 274-279.
97. Webb, J. L. en Enzymes and Metabolic Inhibitors. Vol. I. Academic Press, New York. 1963. 71-74, citado en la ref. 35.
98. Esch, F. S., Bohlen, P., Otsuka, A. S., Yoshida, M., Allison, W. S. 1981. J. Biol. Chem. 256: 9084-9089.
99. Satre, M., Bof, M., Issartel, J.-P., Vignais, P. V. 1982. -- Biochemistry. 21: 4772-4776.
100. Andrews, V. W., Hill, F. C., Allison, W. S. 1984. J. Biol. - Chem. 259: 8219-8225.
101. Soong, K. S., Wang, J. H. 1984. Biochemistry. 23: 136-141.
102. Wang, J. H. 1984. Biochem. 23: 6350-6354.
103. Tommasino, M., Capaldi, R. A. 1985. Biochemistry. 24. 3972-3976.
104. Sutton, R., Fergusson, S. J. 1985. FEBS Lett. 179: 283-288.
105. Wang, J. H. 1985. J. Biol. Chem. 260: 1374-1377.
106. Kandpal, R. P., Melese, T., Stroop, S. D., Boyer, P. D. 1985. J. Biol. Chem. 260: 5542-5547.
107. Pullman, M. E., Monroy, G. C., 1963. J. Biol. Chem. 238: -- 3762-3769.
108. Kagawa, Y., Racker, E. 1966. J. Biol. Chem. 241: 2467-2474.
109. Dabbeni-Sala, F., Furian, R., Pitotti, A., Bruni, A. 1974. Biochim. Biophys. Acta. 347: 77-86.
110. Brown, R., Montgomery, R., Spach, P., Cunningham, C. 1985. Biochem. J. 225: 597-608.
111. Montecucco, C., Smith, G., Dabbeni-Sala, F., Johannson, A., Galante, Y., Bisson, R. 1982. FEBS Lett. 144: 145-148.
112. Laird, D. M., Smith Eble, K., Cunningham, C. C. 1986. J. -- Biol. Chem. 261: 14844-14850.
113. Laird, D. M., Wallace Parce, J., Montgomery, R. I., Cunnin-gham, C. C. 1986. J. Biol. Chem. 261: 14851-14856.
114. Adolfsen, R., Mac Clung, J. A., Noudrianakis, E. N. 1975. Biochemistry. 14: 1727-1735.
115. Warshaw, J. B., Lam, K. W., Nagy, b., Sanadi, D. R. 1968. Arch. Biochem. Biophys. 123: 385-396.
116. Galante, Y. M., Wong, S.-Y., Hatefi, Y. 1981. Biochemistry. 20: 2671-2678.
117. Valdes, A. M., Dreyfus, G. 1987. Biochem. Int. 15: 459-466.
118. Gresser, J. J., Myers, J. A., Boyer, P. D. 1982. J. Biol. Chem. 257: 12030-12038.
119. Tamura, J. K., Wang, J. H. 1983. Biochemistry. 22: 1947---1954.
120. Cross, R. L., Grubmeyer, C., Penefsky, H. S. 1982. J. Biol. Chem. 257: 12101-12105.
121. Cross, R. L. 1981. Annu. Rev. Biochem. 50: 681-714.
122. Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y. 1984. Biochemistry. 23: 3508--

3514.

123. Dreyfus, G., Celis, H., Ramirez, J. 1984. Anal. Biochem. -- 142: 215-220.
124. Dreyfus, G. 1985. J. Biol. Chem. 260: 12112-12117.
125. Friedl, P., Friedl, C., Schairer, H. U. 1979. Eur. J. Biochem. 100: 175-180.
126. McEnery, M. W., Buhle, E. L., Aebi, U., Pedersen, P. L. 1984. J. Biol. Chem. 259: 4642-4651.
127. Penefsky, H. s. 1985. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 1589-1593.
128. Li, S., Zhang, Y., Lin, Z. 1987. J. Bioenerg. Biomembr. 19: 273-283.

ABREVIATURAS

ADP- adenosin difosfato.
AMP- adenosin monofosfato.
ATP- adenosin trifosfato.

CF₁- F₁-ATPasa de cloroplastos.
CHAPS- 3-((3-colamidopropil-dimetilamonio)-1-propanosulfonato).
CMC- concentración micelar critica.

DCCD- N, N'-Diciclohexilcarbodiimida.

ECF₁, ECF₁F₀- F₁ o F₁F₀ de E. coli.

E. coli- Escherichia coli.

EGTA- ácido etilen glicol bis-(β -aminoetil éter)-N, N, N', N'-tetra-acético.

F₀- sector membranal, canal de H⁺ del complejo ATPasa/ATP sintetasa.

F₁- sector soluble, catalítico, del complejo ATPasa/ATP sintetasa.

F₆- factor 6 del complejo ATPasa/ATP sintetasa.

FCCP- carbonil cianuro p-trifluorometoxifenilhidrazona.

F₄- factor 4 del complejo ATPasa/ATP sintetasa.

IF₁- proteína inhibidora de la F₁.

LDAO- lauril dimetilamino óxido.

M. lysodeikticus- Micrococcus lysodeikticus.

WOPS- ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico.

NADH- nicotinamida adenin dinucleótido (forma reducida).

NBD-Cl- 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

OSCP- proteína que confiere la sensibilidad a la oligomicina.

P_i- fosfato inorgánico.

POPOP- 1,4-bis(2-(5-feniloxazolil))benceno.

PPO- 2,5-difeniloxazol.

Re. rubrum- Rhodospirillum rubrum.

SDS- dodecil sulfato de sodio.

TF₁- F₁ de la bacteria termofilica PS.

Tris- Tris(hidroximetil) aminometano.

Tritón- Tritón X-100.