

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTUDIO DE LA FIJACION DE ADP EN MEMBRANAS
MITOCONDRIALES DE HIGADO DE RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

SERGIO GONZALEZ MORENO

MEXICO, D. F.

1974



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

La presente tesis se realizó bajo la
dirección del Dr. Armando Gómez Puyou, en
el Departamento de Biología Experimental
del Instituto de Biología de la U.N.A.M.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCION	1
II. MATERIALES Y METODOS	8
III. RESULTADOS	15
IV. DISCUSION	29
V. BIBLIOGRAFIA	32

ABREVIATURAS

EDTA	Acido etilendiaminotetracético
Tris	Hidroximetil aminometano
ATP	Trifosfato de Adenosina
ADP	Difosfato de Adenosina
DOC	Desoxicolato de sodio
nmoles	nano-moles
ul	Microlitro
M	Molar
N	Normal
nm	nano-metro
Pi	Fósforo inorgánico
ug	Microgramo

I. INTRODUCCION

La mitocondria, como los demás organoides celulares, desarrolla funciones de gran importancia que mantienen el sistema celular con vida. Para que éstas puedan efectuarse, es necesaria la entrada y salida de diferentes especies moleculares y iones que deben atravesar las membranas mitocondriales.

De las dos membranas de la mitocondria, la interna es permeable al agua y algunas moléculas pequeñas como urea, glicerol y ácidos grasos de cadena corta, e impermeable a la mayoría de iones, carbohidratos, aminoácidos y nucleótidos. La impermeabilidad de esta membrana está determinada por los componentes membranales, (diferentes en proporción a los de la membrana externa) que en gran parte son lípidos y que impiden por su arreglo el flujo de moléculas con cierta polaridad.

El hecho de que este tipo de membrana no sea permeable a la mayoría de metabolitos, plantea la necesidad de conocer el mecanismo por el cual las diferentes especies moleculares y iones se transportan; y una seria limitación para conocer tal mecanismo, reside en el desconocimiento casi total de la arquitectura de las membranas, que aunque han sido estudiadas intensamente, sólo han originado algunas hipótesis. Quizá las de mayor consistencia actualmente sean las de Benson (1) y Singer (2), que de tomarse como modelo posiblemente contribuyan para la elu-

cidación de los mecanismos en los sistemas de transporte.

No obstante las limitaciones, se han propuesto modelos de sistemas de transporte, postulando que una proteína o lipoproteína con un sitio de unión para el sustrato transportado, sirve como acarreador del sustrato. Dicha molécula, situada en la membrana, une una molécula de sustrato, y por difusión o un cambio conformacional lo acarrea a través de la membrana (3).

La presencia de acarreadores en la mitocondria, se puso en evidencia principalmente con el estudio del transporte de los intermediarios del ciclo de Krebs y adenín nucleótidos; el acarreador de los adenín nucleótidos presenta una alta afinidad por el ADP y ATP, presenta fenómeno de saturación, es extremadamente específico y se inhibe selectivamente con atractilósido impidiendo así la transferencia de ADP y ATP a través de la membrana mitocondrial. (4, 5).

Klingenberg (5), ha estudiado las propiedades del acarreador de ADP in situ en la membrana mitocondrial determinando el número de sitios de acarreo, constantes de disociación, especificidad de la unión, influencia del pH, temperatura, etc..., y encontró además que este acarreador transporta una molécula de ADP al interior de la mitocondria, sólo si una molécula de ATP es transportada al exterior.

Los resultados del estudio del transporte de este nucleótido, han

establecido los criterios básicos para la investigación de moléculas con propiedades de acarreo, permitiendo que a la fecha se hayan evidenciado otras moléculas transportadoras de iones como Cl^- y SO_4 (6), Pi (7), Ca^{++} (8,9), y algunos de los ácidos dicarboxílicos y tricarboxílicos intermediarios del ciclo de Krebs (10).

Con el conocimiento de algunas propiedades de los acarreadores de diversas moléculas y iones en diferentes sistemas de membranas, varios investigadores enfocaron el problema hacia el aislamiento de ellos, así Penrose et al (11), aisló una proteína de membrana de E. coli que fija leucina, isoleucina y valina; Anraku (12), purificó de membranas de E. coli una proteína que une galactosa, Wasserman y Taylor (13), aislaron de mucosa intestinal una molécula con capacidad para unir calcio, la cual presentó fenómeno de saturación con respecto al incremento en concentración de calcio; Gómez Puyou et al (9) y Sottocasa et al (8), aislaron de mitocondrias de hígado de rata un factor insoluble con capacidad para unir calcio con alta afinidad; Cabantchick y Rothstein (6), separaron de membranas de eritrocito, una molécula de proteína que al parecer es responsable del transporte de $\text{SO}_4^{=}$ y Cl^- , y Pardee en 1966 (14) purificó una proteína que une sulfato y presentó evidencias sobre la localización de ésta en la membrana. En realidad, no se pueden definir a estas moléculas como acarreadores, ya que faltan pruebas que satisfagan los criterios ya esta-

blecidos como son: a) saturabilidad del sistema, b) inhibición específica, c) alta afinidad por el catión o molécula a transportar, d) alta especificidad.

Ya que las membranas presentan en su composición química proteínas, algunas con actividad para el transporte, se han hecho innumerables esfuerzos para conocer las interacciones intermoleculares y caracterizar las proteínas de membrana, utilizando para esto agentes solubilizantes como sales neutras, urea, guanidinas, solventes orgánicos, detergentes, caotrópicos y soluciones ácidas o básicas (15,16, 17,18), pero el problema se hace crítico debido a que estos agentes solubilizantes influyen indudablemente en la conformación y actividad de las proteínas membranales (19).

Se plantea que aún con estas desventajas, la acción solubilizante de los agentes mencionados, puede ser una herramienta para entender las fuerzas de unión lípido-lípido, proteína-proteína y lípido-proteína en las membranas.

Lenaz (20,21), ha indicado que los fosfolípidos están unidos a proteínas por medio de uniones hidrofóbicas, estableciéndose las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas no polares de los ácidos grasos con los residuos de aminoácidos no polares. Las partes apolares -- de las proteínas de membrana deben estar en estrecho contacto con -- las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, sostenidas fuertemente in situ, en tanto que otras son fácilmente desprendibles y solubles

en agua porque presentan uniones débiles posiblemente con carácter polar (22).

Entre las fuerzas que contribuyen a la estabilidad de las proteínas membranales en medio acuoso, las atracciones hidrofóbicas son las de mayor significación, y una evidencia directa de la interacción hidrofóbica entre proteínas y lípidos de membrana la de Chapman -- (23,24) con los espectros de infrarrojo y resonancia magnética nuclear en fantasmas de eritrocito. Los estudios de Kauzmann (25), indican que las proteínas contienen una proporción relativamente alta -- de aminoácidos con cadenas laterales no polares con baja afinidad -- por el agua, y así estas configuraciones polipeptídicas, las cuales -- contienen gran número de estos grupos apolares, se asocian entre sí adquiriendo la conformación más estable. Esta tendencia de los grupos no polares para asociarse entre sí en un ambiente acuoso es considerado como una unión hidrofóbica, datos que remarcan la importancia de las uniones hidrofóbicas, provienen del trabajo teórico de -- Scheraga (26), y la extracción de lípidos y solubilización de proteínas de membrana con ciertos solventes orgánicos y detergentes (27), constituyen una fuerte evidencia de las uniones hidrofóbicas entre los componentes membranales.

Los estudios hechos por Tanford (19) sobre la solubilidad de aminoácidos y péptidos en solventes orgánicos, y la desnaturalización de --

proteínas por ácidos, bases, urea y guanidinas, indican que en una fase acuosa, la mayoría de los grupos no polares de una proteína están en el interior de la molécula en tanto que los grupos cargados estarán en contacto directo con el solvente. Si el solvente es apolar, la porción apolar de la molécula estará en contacto directo con el solvente.

Micelas de fosfátidos con carga neta negativa como fosfatidil etanolamina, difosfatidil glicerol y fosfatidil inositol, pueden formar complejos iónicos con un número de proteínas (ej. protamina histonas, citocromo C, RNasa y lisozima) por abajo de su punto isoeléctrico (28, 29). Tales complejos son solubles y estables en un número de solventes orgánicos pero son separados con una fuerza iónica alta. La formación de proteolípidos solubles en solventes apolares implica que las porciones apolares de ambos componentes están en contacto con el solvente mientras que los grupos iónicos deben estar formando pares iónicos que decrecen la hidrofiliidad y neutralizan las cargas favoreciéndose con esto la solubilización en un medio hidrofóbico.

La formación de pares iónicos se establece entre los grupos catiónicos de la proteína y los grupos aniónicos del lípido, siendo esto demostrado por Higashi, Siewert y Strominger (30), al aislar e identificar de Staphylococcus aureus la fosfoquinasa isoprenoide, la cual lleva unido firmemente un fosfolípido como cofactor, que no se separa cuando se extrae con butanol acídico; y por Kadenbach (31) al aislar un péptido sintetizado por la mitocondria, el cual es insoluble en agua o acetona y so-

luble en cloroformo o metanol, además de presentar tres grupos amino libres que podrían formar union iónica en un medio lipofílico.

Gitler y Montal (32), lograron la extracción de proteolípidos compuestos de citocromo C y una mezcla de fosfolípidos acídicos utilizando como solvente apolar el decano. Los resultados indican que la solubilización en decano depende del pH y la formación de pares iónicos.

Recientemente Yonath, Burstein y Blauer (33) reportaron un sistema proteolipídico en el cual un detergente sintético reemplazó los fosfolípidos. El sistema consistió de citocromo C y lecitina, y el detergente que se utilizó fué el dodecilsulfato (SDS), y el solvente utilizado para la solubilización de citocromo C-detergente fué el isooctano.

No hubo requerimientos de alcoholes (29), cationes divalentes (34) o el uso de pH bajo (32) para la extracción efectiva en la fase orgánica.

Dada la importancia del ADP en los procesos biológicos, el desconocimiento de las características moleculares de su acarreador y la innovación hecha por Gitler y Montal (32), Yonath, Burstein y Blauer (33) en la extracción de lipoproteínas y proteínas, la presente tesis se enfoca hacia el aislamiento de moléculas de membranas mitocondriales, con capacidad para fijar ADP. Si consideramos que estas moléculas membranales son de naturaleza protéica, existirá la posibilidad de formación de pares iónicos con el ADP de la misma manera que lo hacen los fosfolípidos o el detergente aniónico con el citocromo C.

Las regiones apolares hidrofílicas de las proteínas estarán en contacto con el isobutanol, en tanto que los grupos iónicos formarán pares iónicos y de esta manera se efectuará la solubilización.

El aislamiento de proteínas o lipoproteínas de membrana, con o sin actividad para el transporte, y su caracterización son sin duda alguna una contribución al estudio de la membrana, ya que posiblemente existe una analogía entre los problemas de estructura de membranas y la estructura de proteínas.

II. MATERIALES Y METODOS.

Se obtuvieron las mitocondrias de hígado de rata por el método de Schneider y Hogeboom (35), en sacarosa 0.25 M y EDTA 0.001 M - ajustadas a pH 7.3 con Tris. Después de la segunda centrifugación a 10,000 r.p.m. en una centrífuga Sorvall (mod. RC2-B), se lavaron dos veces, se resuspendió el paquete en sacarosa 0.25 M y EDTA 0.001 M pH 7.3 y se ajustó la proteína a 15 mg/ml. por lectura de absorbancia a 215 y 225 nm. (36), en un espectrofotómetro Zeiss (mod. PMQ II). Al volumen obtenido después de ajustar a 15 mg/ml., se le agregó un volumen igual de agua bidestilada y 0.4 ml. de desoxicolato de sodio (DOC) a una concentración de 50 mg./ml., por cada 12 ml. para solubilizar las proteínas de las membranas mitocondriales. Se incubaron las mitocondrias durante 10 minutos a 25°C con agitación --

constante para una mayor solubilización.

Para sedimentar los fragmentos de membrana no solubilizados, la solución se centrifugó a 30,000 r.p.m. en una centrifuga Spinco (mod. L) con el rotor # 40. El sedimento fué eliminado, y por cada 40 ml. de sobrenadante (proteínas mitocondriales solubles), se agregaron 140 ml. de sacarosa 0.25 M y EDTA 0.001 M ajustada a pH 7.3, 40 ml. de agua bidestilada, 2 ml. de ADP 0.0047 M, 0.3 ml. de ADP¹⁴C (87,000 c.p.m.) y 200 ml. de isobutanol. Se agitó la mezcla durante 5 minutos a 25°C y se centrifugó a 10,000 r.p.m.

El objeto del procedimiento anterior fué incorporar ADP a las moléculas de proteína solubilizadas con desoxicolato, con capacidad para fijarlo y solubilizar las proteínas-ADP en el isobutanol.

De la fase isobutanólica (fase superior) se tomaron muestras de 0.2 ml., las cuales fueron colocadas en planchetas de aluminio, evaporadas bajo una lámpara de rayos infrarrojos y contadas en el contador de radioactividad Chicago (mod. IBIB).

El contenido de proteínas en la fase isobutanólica se cuantificó por el método de Lowry (37), para esto el isobutanol fué evaporado previamente con aire corriente y redissuelto en 10 ml. de isobutanol, y de esta solución se cuantificó 1 ml.

Tratando de evitar la solubilización de las proteínas de membrana mitocondrial con el detergente DOC, se utilizaron polvos acetónicos (mi

mitocondrias delipidadas con solventes orgánicos que conservan un alto porcentaje de proteínas) mantenidos en congelación a 0°C durante aproximadamente 6 meses.

Se obtuvieron los polvos acetónicos de mitocondrias de hígado de rata, de acuerdo al procedimiento descrito por Lardy y Wellman (38), excepto que el paquete de mitocondrias se homogenizó con acetona y se filtró en un buchner para luego ser lavado con butanol, acetona y éter dietílico.

La extracción en isobutanol de las proteínas y proteínas-ADP de los polvos acetónicos se hizo de la siguiente manera:

A cada tubo con 50 mg. de polvos acetónicos, se le agregó una concentración creciente (23.4 - 2000 nano moles) de ADP en solución acuosa, se complementó el volumen a 1 ml. con agua bidestilada y se agregaron 20 ul. de ADP¹⁴C (4625 c.p.m.); inmediatamente se agregaron 5 ml. de isobutanol a cada tubo, se agitaron 1 min. en el vortex y se centrifugaron a 3000 r.p.m. para separación de las dos fases.

La cantidad de nanomoles de ADP en la fase isobutanólica se determinó por conteo de ADP¹⁴C, tomando muestras de 0.2 ml. del isobutanol, evaporándolas y contada la radioactividad en el contador Geiger Chicago (mod. 181B). El resto del isobutanol de cada tubo fue evaporado con corriente de aire para hacer la determinación de proteínas con el método anteriormente señalado.

Para separar las proteínas solubles en el isobutanol, se utilizó la electroforesis en geles de acrilamida siguiendo el método de Weber y Osborn (39).

Como una técnica auxiliar para la identificación de péptidos en la fase isobutanólica, se hicieron varios corrimientos electroforéticos en papel. Las fases acuosa e isobutanólica de un extracto preparado con 200 mg. de polvos acetónicos, 936 nmoles de ADP, 4 ml. de agua y 20 ml. de isobutanol, se evaporaron con corriente de aire, se resuspendieron en 0.5 ml. de agua e isobutanol respectivamente y se aplicaron sobre papel Whatman # 1. Los corrimientos electroforéticos se efectuaron a 300 voltios, 25 mA. durante 45 minutos; en lugar de buffer se utilizó una solución de ácido fórmico al 8%.

Otro método empleado para la separación de especies moleculares solubles en isobutanol, fué la cromatografía en capa fina en placas de gel de sílice (Merck). Se utilizó como solvente isobutanol-fórmico-agua 70: 9: 21, se corrieron las muestras durante 14 horas y se revelaron los péptidos o aminoácidos con ninhidrina 0.2% en acetona (40).

Para determinar la presencia de uniones peptídicas en la fase isobutanólica, se efectuaron varias hidrólisis con HCl 6N durante 72 horas según el método de Sanger y Thompson (41).

REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados se obtuvieron en la casa Merck, excepto:

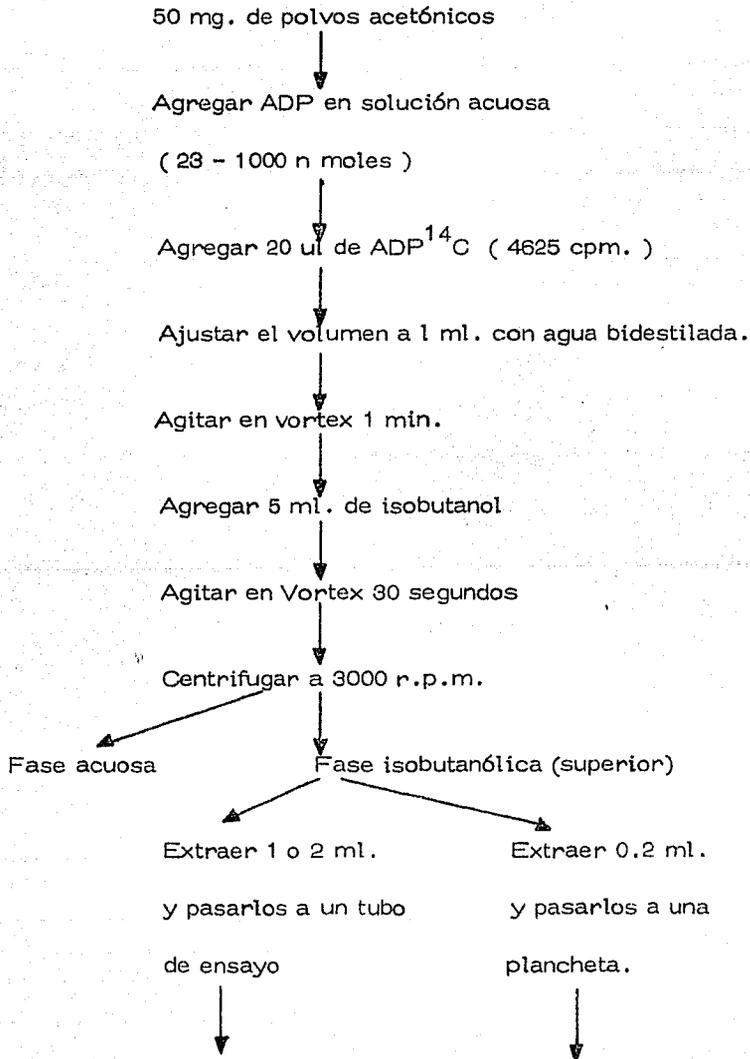
Sacarosa -----J. T. Baker.

Adenosin 5' difosfato (sal de sodio)-----Sigma.

Adenosin 8-C¹⁴ 5' difosfato (sal de amonio) ----- Amersham Searle

Alcohol isobutílico ----- Mallinckrott.

Procedimiento para solubilizar proteínas en isobutanol y cuantificar la fijación de ADP por moléculas solubles en isobutanol.



Evaporar con corriente de aire



Cuantificar proteína

Evaporar con lámpara de

infrarrojo



Contar radioactividad



Transformar c.p.m. a % de ADP y calcular las nmoles de ADP en la fase isobutanólica.

III. RESULTADOS

El presente trabajo tuvo su inicio con varios experimentos para incorporar ADP a las proteínas de membranas mitocondriales y solubilizarlas en una fase isobutanólica, ya sea por su naturaleza hidrofóbica o por la adquisición de cierta hidrofobicidad al formar los pares iónicos con el ADP. La solubilización de las membranas mitocondriales se efectuó utilizando DOC según el método descrito, y los resultados indicaron que la cantidad total de ADP que se repartía en la fase isobutanólica representaba el 10-15% de las nmoles con que se incubaron las mitocondrias.

Es importante señalar que, una vez evaporado el isobutanol para hacer la determinación de proteína por el método de Lowry, se encontró un gran porcentaje de desoxicolato el cual interfirió con la cuantificación. Para eliminar este obstáculo, una vez que se obtuvo la fase isobutanólica, se evaporó con corriente de aire, se redisolvió en 5 ml. de isobutanol y se dializó contra agua durante la noche. Al término de la diálisis se obtuvo un precipitado cuya coloración varió de experimento a experimento. Al contenido acuoso de la bolsa de diálisis se le determinó proteína por el método de Lowry, en tanto que el precipitado se descartó considerando que se trataba de desoxicolato ya que el peso no correspondió a la proteína cuantificada previamente, y presentó una consistencia de piedra.

La presencia de proteínas en la fase isobutanólica se evidenció por el reactivo de Lowry y por la absorción a 230 y 280 nm, y para separarlas se efectuaron varios corrimientos por electroforesis en geles de acrilamida, siendo los resultados negativos, ya que en ningún gel se detectó alguna banda revelada con azul de Coomassie.

Estos resultados sugirieron que posiblemente la reacción con el reactivo de Lowry y la absorción a 230 y 280 nm era debida a la presencia de péptidos, así que a una muestra de la fase isobutanólica se probó su sensibilidad a la ninhidrina, y a otra se le hidrolizó con HCl 6 N durante 72 horas para cuantificar el incremento en nanomoles de aminoácidos por ruptura de las uniones peptídicas. (tabla 1).

El hecho de que el desoxicolato se solubilizara en isobutanol y de que se encontrara ADP, $ADP^{14}C$ y proteína en la fase isobutanólica pero no hubiera una relación estequiométrica entre proteína y ADP, nos hizo suponer que posiblemente el ADP se solubilizaba en isobutanol no por la formación de pares iónicos con una proteína, sino que el fenómeno era debido a la formación de un complejo detergente-ADP-péptidos, o detergente-ADP y otro tipo de moléculas. Se evitó entonces la solubilización de las membranas con DOC por utilización de polvos acetónicos, los cuales son proteínas mitocondriales obtenidas por delipidación de mitocondrias de hígado de rata con varios solventes orgánicos.

La gráfica 1 indica que la cantidad de ADP acarreada a la fase

isobutanólica es casi proporcional al ADP en el medio de incubación y el sistema no ha alcanzado la saturación. El valor neto en nmoles de ADP que son fijadas o acarreadas se obtuvo por diferencia del experimental y el control.

La gráfica 2 muestra la cantidad neta de ADP que se transporta a la fase isobutanólica y la proteína que cuantificada por el método de Lowry se solubiliza en isobutanol. La cantidad de proteína en el isobutanol varía desde 55 ug en ausencia de ADP hasta 460 ug con 936.7 nmoles de ADP.

Al parecer, la cantidad de proteína que se registra en isobutanol depende de la concentración de ADP en el medio de incubación, y para cada punto en la curva el valor neto de proteína soluble en isobutanol (proteína acarreada) se obtiene restando 55ug que corresponden a la cantidad de proteína hidrofóbica o soluble en isobutanol no inducida por ADP.

La gráfica 3 muestra la solubilización de proteína y el transporte de ADP a la fase isobutanólica por variación de ADP en el medio de incubación. La cantidad de ADP en el medio de incubación se incrementó hasta 2341 nmoles.

Los datos indican que posiblemente existen dos sitios de saturación, uno localizado en el rango de 900-1400 nmoles de ADP en el medio, y otro entre 1800 y 2400 nmoles. El primer sitio se satura con --

500-600 nmoles de ADP y el segundo con 800-1000 nmoles.

La cantidad de proteína "acarreada" al isobutanol se correlaciona sólo en algunos puntos con la cantidad de ADP en el isobutanol, sugiriendo que no sólo existe formación de pares iónicos sino además -- otro tipo de unión u otro tipo de moléculas con capacidad para acarrear ADP.

Dado que no se encontró una saturación del sistema (gráficas 1, 2, 3) en el rango de 100 nmoles como indica Klingenberg (5), se trató de obtener una curva que reflejara la saturación con ADP, no por cuantificación de ADP en la fase isobutanólica, sino por fijación de ADP a los polvos acetónicos en fase acuosa. Se procedió según el método, -- excepto que antes de agregar el isobutanol, se centrifugó la solución y se cuantificó el ADP en la fase acuosa. La disminución de radioactividad en la fase acuosa fué el índice de unión a los polvos acetónicos. La gráfica 4 muestra la incorporación de ADP a los polvos acetónicos y los datos muestran que alrededor del 10% de ADP en el medio acuoso es incorporado sin dar indicio de saturación.

Ya que no se encontró una relación estequiométrica entre la proteína y ADP cuantificados en isobutanol, se pensó que la solubilización de ADP en isobutanol era ocasionada por una alteración en el coeficiente de partición de ADP por efecto del pH al incrementar la concentración de ADP, y la proteína era solubilizada por la interacción con el ADP o el efecto del pH, así que se efectuó un experimento en el cual --

a cada tubo con 50 mg. de polvos acetónicos se le agregó 234 nmoles de ADP, 20 μ l. de $ADP^{14}C$ (7400 c.p.m.) y se completó el volumen a 1 ml. con buffer de citratos 0.2 M a pH 3, 4, 5, 6 y buffer de carbonatos 0.2 M pH 9, 10 y 10.7 según el pH deseado para cada tubo. -- Después de la adición del buffer se agregaron 5 ml. de isobutanol y se procedió conforme el método citado.

La gráfica 5 muestra la variación de la solubilización de proteína y el transporte de ADP a la fase isobutanólica por efecto del pH. Se observa que a pH bajo se favorece la solubilización de proteína en el isobutanol, pero la cantidad de ADP transportada prácticamente no es alterada. Estos resultados sugieren que el transporte de ADP al isobutanol se efectúa sin dependencia del pH, y es transportado por otras especies moleculares no cuantificadas por el momento.

Separación de componentes protéicos solubles en isobutanol.

La figura 1 muestra un corrimiento electroforético en papel, de las fases acuosa e isobutanólica de los polvos acetónicos.

La idea de este corrimiento fué básicamente efectuada para separar las diferentes especies moleculares de ambas fases, ya que los corrimientos electroforéticos en geles de acrilamida no revelaron -- bandas positivas al azul de Coomassie. Por este método fueron reveladas 7 bandas de la fase acuosa, y 3 de la fase isobutanólica.

La figura 2 muestra un cromatograma hecho en placas de gel -

de sílice (Merck), para la separación de especies moleculares de las fases acuosa e isobutanólica. La fase acuosa presenta 7 componentes positivos a ninhidrina, la fase isobutanólica presenta 5. Dos de los componentes de la fase isobutanólica presentan una migración cercana a la de glicil-glicina, indicando esto que se trata de péptidos.

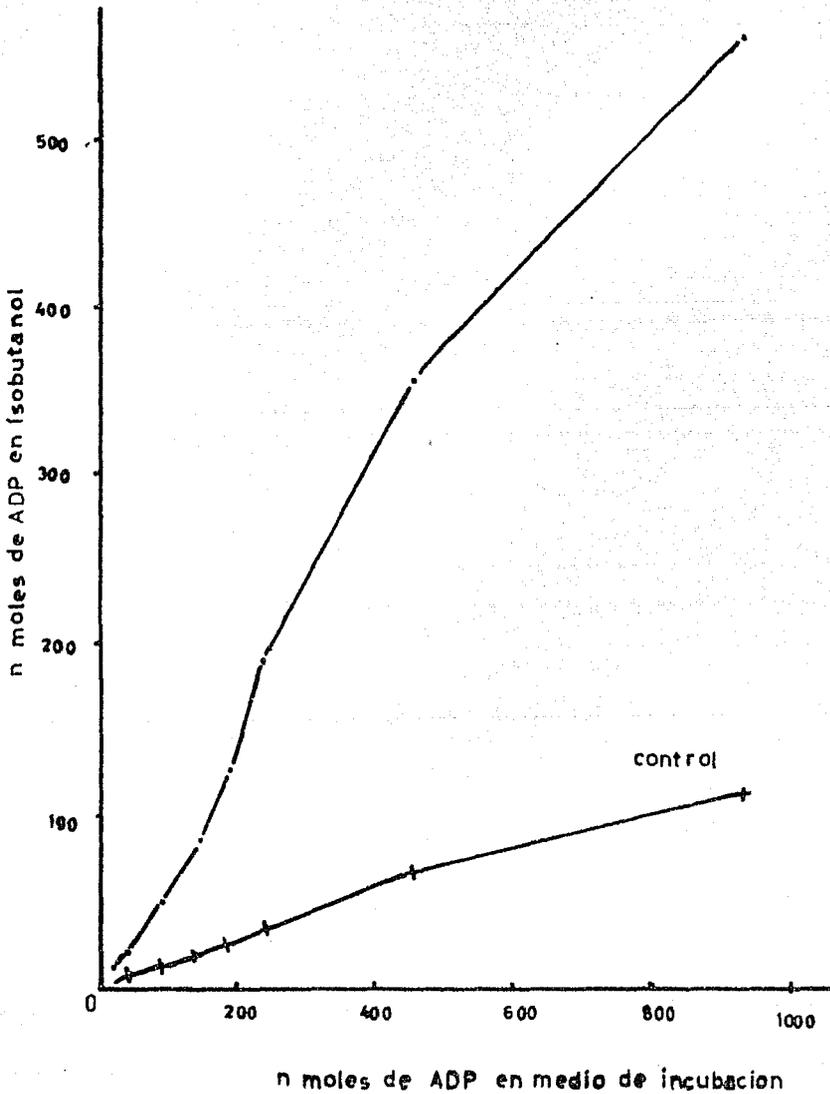
Los corrimientos electroforéticos son bastante reproducibles, en tanto que la cromatografía en capa delgada en placas de gel de sílice sólo se efectuó una vez, siendo indispensable comprobar la reproducibilidad, además de la detección de la migración del ADP.

muestra	concentracion inicial de aminoacidos. (nmoles)	concentracion de aminoacidos despues de hidrolizar. (nmoles)
standard aminoacidos	50	49
glicil-glicina	50	100
proteina de la fase isobutanolica.	57	128

Tabla 1

Incremento en nmoles de aminoácidos después de la hidrólisis con HCl 6 N durante 72 horas, de la fase -- isobutanólica.

Gráfica 1

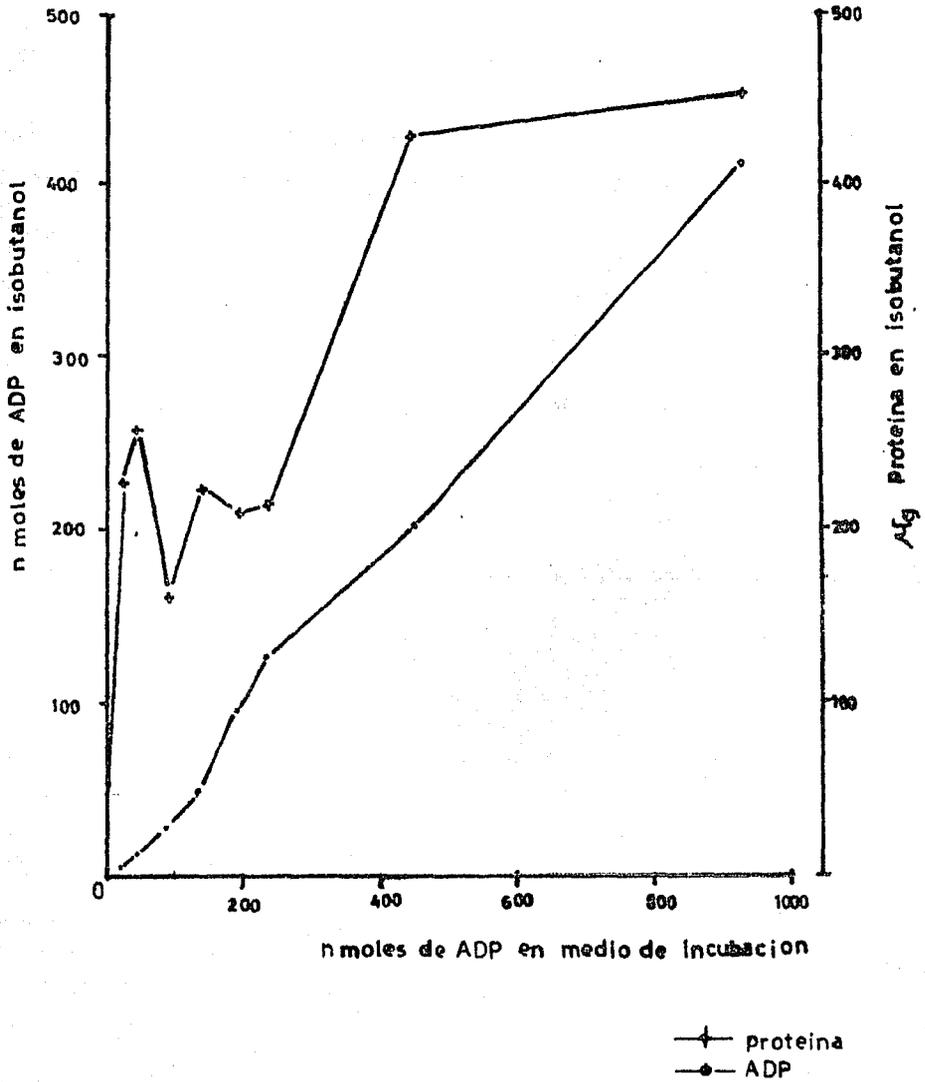


Gráfica 1

Transporte de ADP a la fase isobutanólica en presencia y ausencia de proteínas mitocondriales con relación a la cantidad de ADP en el medio de incubación. (Condiciones según el método descrito.)

Gráfica 2

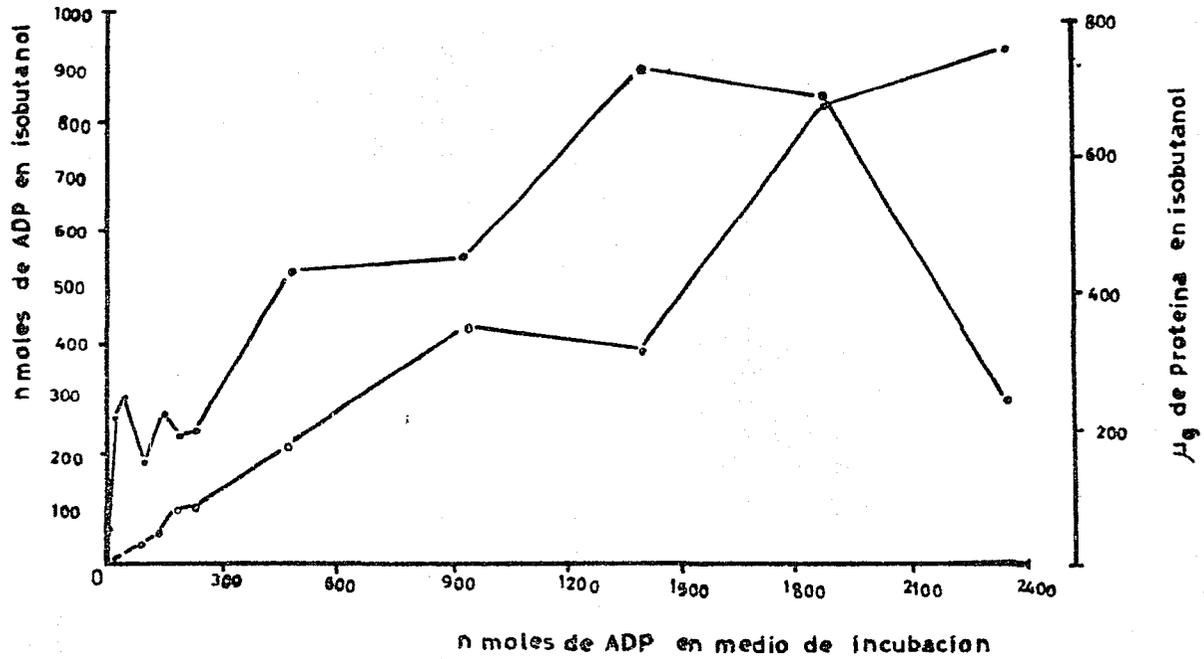
Efecto de la concentración de ADP en el medio de incubación sobre la solubilización de proteínas de polvos acetónicos a una fase hidrofóbica. (Condiciones conforme el método descrito).



Gráfica 3

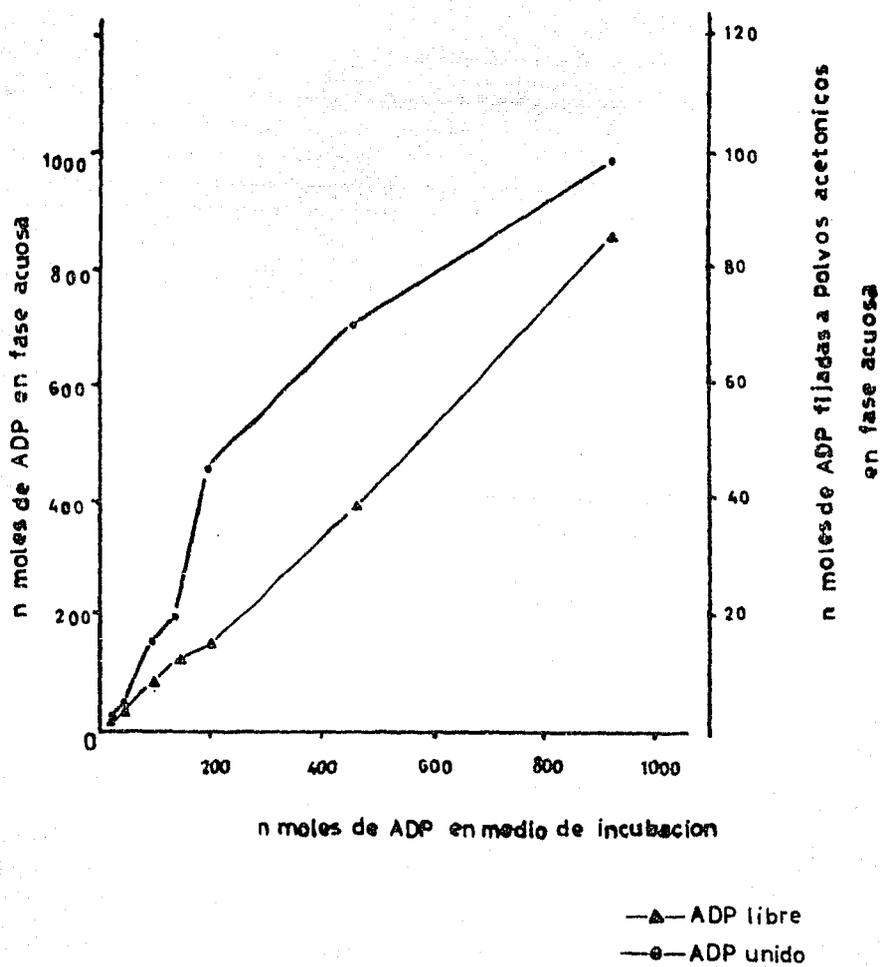
Efecto de la concentración de ADP agregado a proteínas de polvos acetónicos sobre la solubilización de éstas y transporte de ADP a la fase isobutanólica. (Condiciones conforme el método descrito).

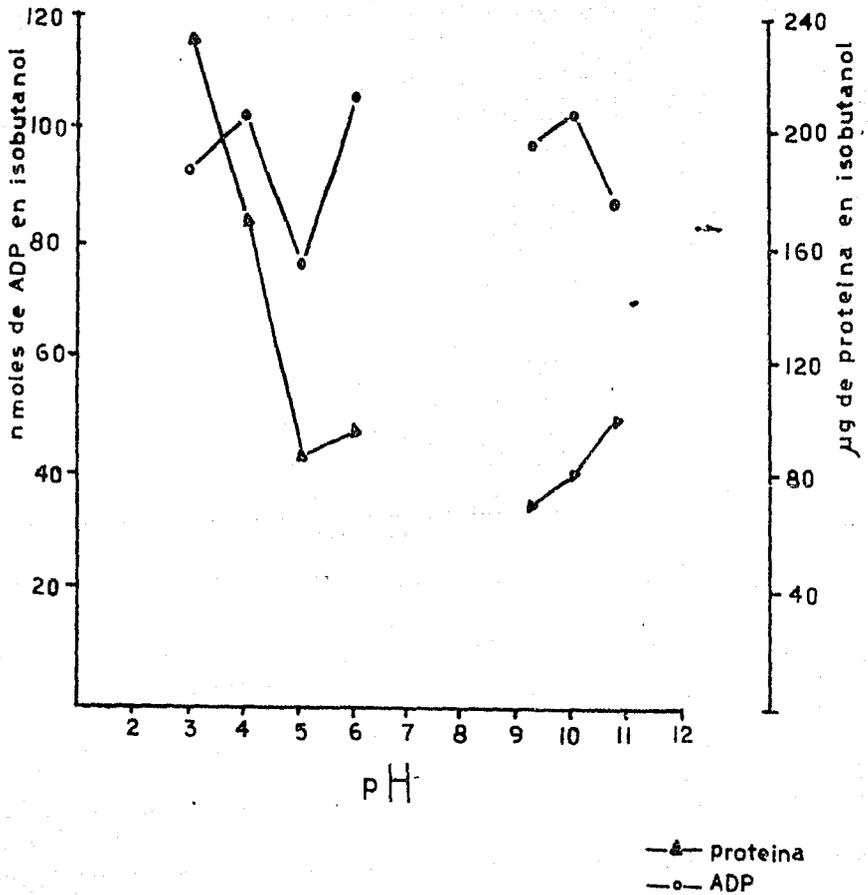
○ ADP
● Proteína



Grafica 4

Fijación de ADP a los polvos acetónicos en fase acuosa, por incremento en la concentración de ADP. (Condiciones según método descrito).





Gráfica 5

Efecto del pH sobre la solubilización de proteínas y transporte de ADP a la fase isobutanólica. (Condiciones según método descrito).

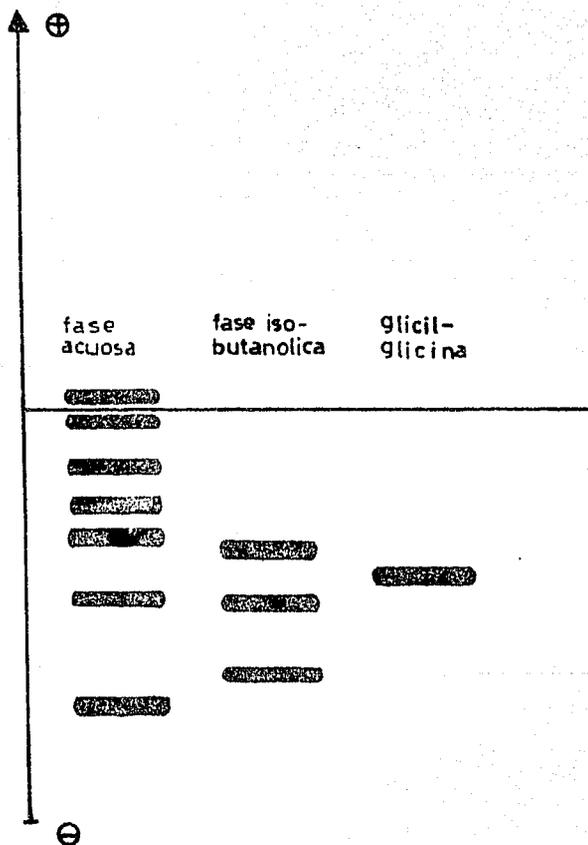


Figura 1

Corrimiento electroforético de las fases acuosa e isobutanólica.

Sistema: ácido fórmico 8%.

Base: papel Whatman #1

Tiempo: 45 minutos

Voltaje: 300, mA: 25

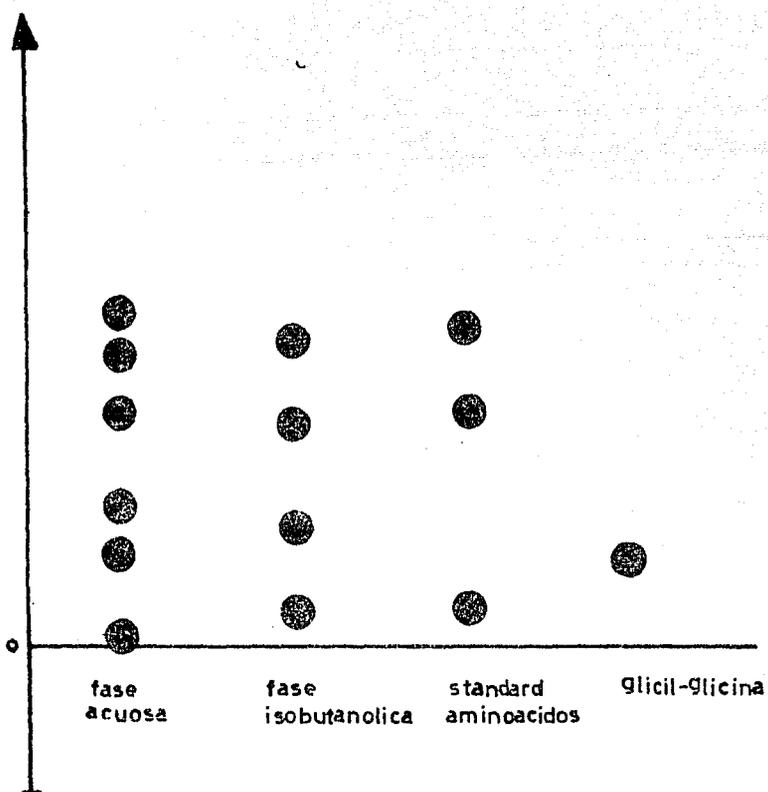


Figura 2

Cromatografía ascendente de las fases acuosa e isobutanólica contra un standard de aminoácidos y glicil-glicina.

Sistema: isobutanol-fórmico-agua (70:9:21).

Base: cromatoplasas de gel de sílice (merck).

Tiempo: 10 horas

Revelador: ninhidrina 0.2% en acetona.

IV. DISCUSION

Los resultados de esta serie de experimentos preliminares indican que:

La solubilización de proteínas o péptidos mitocondriales se efectúa por una interacción con el ADP en el medio de incubación, sin embargo dicha interacción no se lleva a cabo por formación de pares iónicos como Gitler y Montal (32) y Yonath, Burstein y Blauer (33) --- propusieron para la interacción entre el citocromo C y fosfolípidos o detergentes aniónicos, ya que no se observa una relación estequiométrica entre el ADP y proteína cuantificada en el isobutanol; además, --- tanto el ADP como la proteína muestran un comportamiento diferente en relación al pH, puesto que la solubilidad de la proteína si es afectada, pero el transporte del ADP de la fase acuosa a la fase isobutanólica no es modificado.

Aunque no hay una relación estequiométrica entre la proteína --- (de polvos acetónicos) y el ADP transportado a la fase isobutanólica, se observa que el transporte de ADP a dicha fase es del orden de 400 nmoles de ADP/500-900 ug de proteína, y 800-900 nmoles de ADP --- por 850-250 ug de proteína, lo cual no corresponde a los sitios de saturación del acarreador planteado por Klingenberg (5), el cual da un valor de 1 nmol/mg. de proteína. Esto plantea la posibilidad de que

además de la interacción de moléculas de proteínas o péptidos mitocondriales con el ADP, se encuentren otras especies moleculares de naturaleza lipídica (no cuantificadas hasta el momento) que sí interactúan formando pares iónicos.

La separación de los componentes solubles en la fase isobutanólica (por cromatografía y electroforesis en papel), muestra cuatro especies moleculares distintas, pero desconocemos si inicialmente eran hidrofóbicas, o si ellas adquirieron cierta hidrofobicidad por interactuar con el ADP. La actividad de estas moléculas para fijar ADP, será determinada en los próximos experimentos, además estudiaremos (por cromatografía en capa delgada) todas las especies moleculares que se solubilizan en el isobutanol al variar la concentración del ADP en el medio de incubación.

Comparando el sistema de polvos acetónicos y el sistema de mitocondrias de hígado de rata, solubilizadas con DOC, con respecto a la solubilización de proteínas y transporte de ADP a la fase isobutanólica, encontramos que el sistema de polvos acetónicos presenta mayor eficiencia en el transporte de ADP y solubilización de proteínas a la fase isobutanólica (35-68% de ADP por 220-900 ug de proteína), que las mitocondrias solubilizadas con DOC (15-20% de ADP/72-245 ug de proteína); esto lo podemos atribuir a la interacción del detergente (DOC) con las moléculas transportadoras de ADP de igual forma que la interacción ci-

tocromo C y SDS como lo ha demostrado Yonath et al (33), o a una alteración de la conformación y actividad de las moléculas que fijan y transportan el nucleótido (19).

Los datos obtenidos de nuestros experimentos con el sistema de polvos acetónicos, referentes a la inhibición de la fijación y transporte de ADP por efecto del atractilósido, no están aún comprobados pero sugieren que en el sistema de polvos acetónicos no está activamente presente el acarreador, puesto que no se ha obtenido inhibición en el transporte de ADP a la fase isobutanólica; no obstante que se han utilizado 1000 nmoles de atractilósido, considerando con esto un factor de exceso, ya que nuestro sistema presenta un sitio de saturación con ADP del orden de 400 nmoles, y Vignais (4) encontró que 1 mol de atractilósido desplaza 0.5-1.0 moles de ADP.

El hecho de que en el sistema de polvos acetónicos hasta el momento no se haya identificado la molécula que transporta ADP, puede deberse a que las diferentes especies moleculares que los constituyen sufren cambios por efecto de temperatura o degradación; y una forma de evitar estos factores nocivos es la utilización de polvos acetónicos frescos.

La información obtenida hasta el momento con estos experimentos preliminares, se ampliará sin duda con la utilización de nuevas técnicas de separación de moléculas como son la cromatografía por afinidad o la filtración molecular en resinas con carácter hidrofóbico.

V. BIBLIOGRAFIA

1. Benson, A.A., J. Am. Oil Chem. Soc.; 43, 265, 1966.
2. Singer, S.J., Nicolson, G.L., Science; 175, 720, 1972.
3. Lehninger, A.L., Biochemistry, Worth Publishers, Inc. N.Y. 605-627, 1970.
4. Vignats, P.V., Vignats, P.M., Lauquin, G., Morel, F., Biochimie; 55, 763, 1973.
5. Klingenberg, M. Essay in Biochem.; 6, 119, 1970.
6. Cabantchick, Z.I., Rothstein, A., J. Membrane Biol.; 10, 311, 1972.
7. Tyler, D.D., Biochem. J.; 111, 665, 1969.
8. Sottocasa, G., Sandri, G., Panfili, E., de Bernard, B., Gazzoti, P. Vasington, F.D., Carafoli, E., Biochem. Biophys. Res. Comm.; 47, 808, 1972.
9. Gómez, P.A., Tuena, M., Becker, G., Lehninger, A.L., Biochem. Biophys. Res. Comm.; 47, 808, 1972.
10. Chappel, J.B., Brit. Med. Bull.; 24, 150, 1968.
11. Penrose, W.R., Nichoalds, G.E., Oxender, D.L., Piperno, J.R. J. Biol. Chem.; 243, 5941, 1968.
12. Anraku, Y., J. Biol. Chem.; 242, 793, 1967.
13. Wasserman, R.H., Taylor, A.N., Science; 152, 791, 1966.
14. Pardee, A.B., J. Biol. Chem.; 241, 5886, 1966.
15. Tzagoloff, A., McConnell, D.G., McLennan, D.H., J. Biol. Chem. 243, 4117, 1968.

16. Steck, T.L., *Biochem. Biophys. Acta*; 255, 553, 1972.
17. Bonsall, R.W., Hunts, S., *Biochim. Biophys. Acta*; 249, 266, 1971.
18. McFarland, B.H. Inesi, G., *Arch. Biochem. Biophys.*; 145, 456, 1971.
19. Tanford, Ch., *J. Am. Chem. Soc.*; 84, 4240, 1962.
20. Lenaz, G., Sechi, A.M., Masotti, L.I., Parenti-Castelli, G. *Arch. Biochem. Biophys.*; 141, 89, 1970.
21. Lenaz, G., Sechi, A.M., Parenti-Castelli, G., Masetti, L. *Arch. Biochem. Biophys.*; 141, 79, 1970.
22. Vanderkooi, G. Green, D.E., *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*; 66, 615, 1970.
23. Chapman, D., V.D. Kamat, J. DeGier, S.A., Penkett., *J. Mol. Biol.*; 31, 101, 1968.
24. Chapman, D., V.B. Kamat, R.J. Levine, *Science*; 160, 314, 1968.
25. Kauzmann, W., *Advan. Protein Chem.*; 14, 1, 1959.
26. Scheraga, H.A., *J. Phys. Chem.*; 65, 1071.
27. Engleman, D.M., T.M., T.M. Terry, H.J. Morowitz *Biochim. Biophys. Acta*; 135, 381, 1967.
28. Das, M.L., Hack, E.D., Crane, F.L., *Biochemistry*; 4, 859, 1965.
29. Das, M.L., Meyers, D.E., Crane, F.L., *Biochim, Biophys. Acta*; 84, 618, 1964.
30. Higashi, Y., Siewert, C., Strominger, J.L. *J. Biol. Chem.* 245, 3683, 1970.

31. Kadenbach, B., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 44, 724, 1971
32. Gitler, C., Montal, M. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 47, 1486, 1972.
33. Yonath, J., Burstein, N., Blauer, G. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; 54, 507, 1973.
34. Gitler, C., Montal, M. *FEBS. Lett.*, 28, 329, 1972.
35. Schneider, W.C., Hogeboom, G.H. *J. Biol. Chem.*; 183, 123, 1950
36. Murphy, J.B., Kies, M.W., *Biochem. Biophys. Acta.* 45, 382, 1960.
37. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.I.; *J. Biol. Chem.*; 193, 265, 1951.
38. Lardy, H.A., Welman, H., *J. Biol. Chem.* 201, 357, 1953.
39. Weber, K., Osborn, M.; *J. Biol. Chem.*; 244, 4406, 1969.
40. Guest, J.R., Yanofsky, C. *J. Biol. Chem.* 241, 1, 1966.
41. Sanger, F., Thompson, E.O.P. *Biochim. Biophys. Acta*; 71, 468, 1963.